

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

HODNOCENÍ TESTŮ BUNĚČNÉ VIABILITY *IN VITRO*
DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Petra Boudková

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

KONZULTANT: Mgr. Jan Čapek

2019

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

EVALUATION OF CELL VIABILITY TESTING *IN VITRO*
THESIS

AUTHOR: Bc. Petra Boudková

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

CONSULTANT: Mgr. Jan Čapek

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Petra Boudková
Osobní číslo: C17430
Studijní program: N3912 Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Bioanalytik
Název tématu: Hodnocení testů buněčné viability *in vitro*
Zadávací katedra: Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování:

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na hodnocení cytotoxicity *in vitro* se zaměřením na uvedení přehledu viabilitních testů, jejich principů, hodnocení specifity a senzitivity či frekvenci jejich využití. V rámci teoretické části se detailně zaměřte na popis změn buněčné viability ve vztahu ke změnám koncentrace glutathionu, jako hlavního nitrobuněčného anti-oxidantu. Vztah viability a glutathionu se následně pokuste popsat nap příkladech působení několika modelových toxických látek, včetně cisplatiny, tBHP, diethylmaleátu, či dalších. Ke zpracování tohoto literárního přehledu využijte elektronické databáze (*ScienceDirect*, *NCBI Pubmed*, *Web of Science*).
- 2) V rámci praktické části:
 1. využijte práci s buněčnými liniemi (např. buňky Jurkat, A549) k optimalizaci stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu;
 2. zavedené metody využijte k charakterizaci vztahu buněčné viability a glutathionové deplece při studiu cytotoxicity u cisPt, diethylmaleátu, Cd, či tBHP.
- 3) Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Výsledky práce následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

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

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1.5.2019

.....

Petra Boudková

Poděkování:

Tímto bych chtěla především poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D., Mgr. Janu Čapkovi, Mgr. Janě Báčové a paní laborantce Bc. Ivaně Fousové za odborné vedení, konzultace, vstřícný přístup a cenné rady, které mi při zpracování této diplomové práce věnovali. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu, vstřícnost a zázemí, které mi během studia poskytla.

ABSTRAKT

Práce se zabývá studiem vztahu buněčné viability a koncentrace glutathionu po působení toxinů s různým mechanismem účinku. U buněčných linií A549 a Jurkat byl studován účinek CDDP, DEM, DMSO a tBHP. Ke studii byl využit WST-1 test pro sledování životaschopnosti buněk po expozici toxinům. Hladina intracelulárního glutathionu byla stanovena pomocí fluorescenční sondy monochlorobiman s fluorometrickou detekcí.

Buněčné linie A549 a Jurkat byly inkubovány 1, 3, 6, 18, 21 a 24 hodin s vybranými toxiny o různé koncentraci. Bylo zjištěno, že u buněčné linie Jurkat dochází k poklesu viability před poklesem koncentrace intracelulárního glutathionu po expozici DMSO a tBHP. U působení toxinu DEM na buňky Jurkat a ovlivnění buněk A549 všemi vybranými toxiny předchází pokles GSH poklesu buněčné viability. Z celkových výsledků vyplývá, že buněčná linie A549 je k působení námi vybraných toxických látek méně citlivá než buněčná linie Jurkat.

KLÍČOVÁ SLOVA:

A549 buňky, Jurkat buňky, buněčná viabilita, glutathion, cytotoxicita.

ABSTRACT

The thesis deals with studying cell viability and glutathione concentration after treatments with toxins of different mechanism of action. CDDP, DEM, DMSO and tBHP treatments were studied on A549 and Jurkat cell lines. The WST-1 test was used for monitoring cell viability after toxin exposure in this study. A level of intracellular glutathione was determined by a fluorescence probe monochlorobimane followed by fluorometric detection.

The A549 and Jurkat cell lines were incubated for 1, 3, 6, 18, 21 and 24 hours with selected toxins at various concentrations. We found that a decrease of cell viability is preceded by depletion of intracellular glutathione after exposure to DMSO and tBHP in Jurkat cells. The reduction of GSH levels is preceded by reduction of cell viability after exposition of DEM to Jurkat cells and after treatment of A549 cells with all selected toxins. In conclusion, the A549 cells are less sensitive to the acting of selected toxins than the Jurkat cells.

KEY WORDS:

A549 cells, Jurkat cells, cell viability, glutathione, cytotoxicity.

OBSAH

ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1 Typy buněčné smrti.....	15
1.1.1 Apoptóza.....	16
1.1.2 Nekróza.....	17
1.1.3 Autofagie	18
1.2 Oxidační poškození buněk.....	21
1.2.1 Oxidanty a antioxidanty	21
1.2.2 Reaktivní formy kyslíku (ROS).....	22
1.2.3 Volné radikály (VR).....	22
1.3 Antioxidační systém buněk.....	24
1.3.1 Superoxiddismutasa (SOD)	24
1.3.2 Glutathionperoxidasa (GPx).....	25
1.3.3 Glutathion-S-transferasa (GST).....	25
1.3.4 Neenzymatické antioxidanty	25
1.4 Glutathion	26
1.4.1 Syntéza glutathionu a jeho degradace	27
1.4.2 Metabolismus glutathionu	29
1.5 Viabilita buněk	30
1.5.1 Přehled testů a hodnocení viability.....	31
1.5.1.1 Testy na základě barvení buněk	31
1.5.1.2 Počítání buněk.....	32
1.5.1.3 Testy na základě detekce metabolitů.....	32
1.6 Toxické poškození buněk.....	35
1.6.1 Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu	35
1.6.2 Toxicita tBHP	37
1.6.3 Toxicita dimethylsulfoxidu (DMSO)	38
1.6.4 Toxicita cisplatiny (CDDP).....	39
1.6.5 Toxicita diethylmaleátu (DEM)	40

2	CÍL PRÁCE.....	42
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	43
3.1	Pomůcky a přístroje.....	43
3.2	Seznam použitých chemikálií.....	43
3.3	Kultivace buněk A549.....	43
3.4	Kultivace buněk Jurkat.....	44
3.5	Příprava roztoků.....	45
3.6	Testování cytotoxicity daných toxinů.....	46
3.6.1	Fluorometrické stanovení hladiny glutathionu.....	47
3.6.2	WST-1 test.....	47
4	VÝSLEDKY.....	48
4.1	Modelové stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu.....	48
4.1.1	Stanovení cytotoxicity - 3 h inkubace.....	48
4.1.2	Stanovení cytotoxicity - 24 h inkubace.....	50
4.2	Charakterizace vztahu buněčné viability a koncentrace glutathionu.....	53
4.2.1	Toxicita dimethylsulfoxidu.....	53
4.2.2	Toxicita tert-butylhydroperoxidu.....	55
4.2.3	Toxicita diethylmaleátu.....	57
5	DISKUZE.....	61
6	ZÁVĚR.....	67
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	68

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Enzymatický antioxidační systém buňky	24
Obrázek 2: Struktura GSH a GSSG	27
Obrázek 3: γ-glutamylový cyklus	28
Tabulka I : Přesné terminologie související s buněčnou smrtí dle Nomenclature Committee on Cell Death 2018	16
Tabulka II: Typy buněčné smrti a jejich morfologie	20
Graf 1: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu u vybraných toxinů - A549 buňky.....	49
Graf 2: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu vybraných toxinů – Jurkat buňky.....	50
Graf 3: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu u vybraných toxinů – A549 buňky.....	51
Graf 4: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu vybraných toxinů – Jurkat buňky.....	52
Graf 5: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – A549 buňky.....	54
Graf 6: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – Jurkat buňky.....	55
Graf 7: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – A549 buňky.....	56
Graf 8: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – Jurkat buňky.....	57
Graf 9: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – A549 buňky.....	58
Graf 10: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – A549 buňky.....	58
Graf 11: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – Jurkat buňky.....	59
Graf 12: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – Jurkat buňky.....	60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
Bax	<i>BCL-2 associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
BSO	Buthioninsulfoximin
CDDP	Cisplatina
CD95	Fas receptor, transmembránový protein
DEM	Diethylmaleát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESR	Elektronová spinová rezonanční spektrometrie
FasL	Fas Ligand
GCS	γ -glutamylcysteinsyntetasa
GGT	γ -glutamyltransferasa
GPx	Glutathionperoxidasa
GSH	Glutathion intracelulární
GSS	Glutathionsyntetasa
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathiontransferasa
G6PD	Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
MCB	Monochlorobimany
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
NAC	N-acetyl-L-cystein
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OPA	Ortho-phthalaldehyd
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCD	Programovaná buněčná smrt
RCD	Regulovaná buněčná smrt
RIPK	<i>Receptore interacting-protein kinase</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxiddismutasa

SRB	Sulforhodamine B
TB	<i>Trypan blue</i>
tBHP	Tert-butylhydroperoxid
TNF α	Faktor nádorové nekrózy α
TNFR1	Faktor nádorové nekrózy pro receptor 1
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R1	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> pro receptor 1
VR	Volný radikál

ÚVOD

Hlavní roli při zániku buňky hraje děj zvaný oxidační stres. Při takovéto reakci dochází v buňce ke vzniku nebezpečných volných radikálů. Příčinou oxidačního stresu mohou být různé toxiny, xenobiotika, patogeny a další látky poškozující buňku. Plíce jsou tak jedním z často postižených orgánů při toxickém působení těchto látek. Aby byly lépe pochopeny mechanismy působení toxických látek na plicní buňky, využívá se ve výzkumné oblasti k tomto účelu buněčná linie A549 adenokarcinomu lidských plic. Stejně tak se v dnešní době často setkáváme s onemocněními leukemických buněk. Pro účely jejich zkoumání se využívá imortalizovaná buněčná linie lidských T-lymfocytů Jurkat.

V každé buňce nalezneme antioxidační systém, který buňky chrání před působením nebezpečných látek a tím může zabraňovat vzniku oxidačního stresu. Jedním z takových antioxidantů je tripeptid glutathion. Glutathion se podílí na odstraňování reaktivních forem kyslíku (ROS) a způsobuje tak detoxikaci některých xenobiotik. Oxidační stres vede tedy ke snížení hladin GSH a jeho následné depleci. Nemusí zde ale vždy dojít k narušení buněčné struktury. Charakteristiky GSH se využívá především v antioxidační terapii u nádorového bujení. Z tohoto důvodu je třeba pochopit mechanismus deplece glutathionu v závislosti na oxidačním stresu, aby mohla být předepsána vhodná antioxidační terapie. Zároveň je třeba si uvědomit souvislost deplece glutathionu a případné buněčné viability.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Typy buněčné smrti

Po dlouhou dobu byly typy buněčné smrti rozděleny do několika mechanismů z hlediska fyziologického a patologického, ale i podle morfologických a jiných znaků, jež buňka vykazuje. Tímto způsobem byla buněčná smrt rozdělena do několika typů. Ovšem v dnešní době je buněčná smrt definována i na základě biochemických a funkčních perspektiv, protože byly odhaleny i jiné cesty, které vedou k buněčné smrti. Jedná se o nové definice pojmů vnitřní a vnější apoptózy, nekrózy a s ní související nekroptózy. V tomto novém hledisku definice buněčné smrti nebyla opomenuta ani buněčná smrt zprostředkovaná pomocí autofagie (**Galluzzi et Vitale, 2018; Kroemer et al., 2008**).

V posledních desetiletích došlo k odhalení několika mechanismů, které vedly k eliminaci poškozených buněk za pomoci regulované buněčné smrti. Tyto mechanismy však mají dva odlišné scénáře. Prvním z nich je, že k regulované buněčné smrti dochází, aniž by bylo narušeno exogenní prostředí buňky, kdy se tedy jedná o fyziologickou buněčnou eliminaci, tedy programovanou buněčnou smrt (**Galluzzi et Vitale, 2018**). Do tohoto prvního typu řadíme apoptózu a autofagii (**Eisenberg-Lerner et al., 2009**). Druhou cestou je buněčná smrt způsobena narušením intracelulárního či mimobuněčného prostředí. Je důležité říci, že zde dochází k adaptaci buňky na působení intenzivního či dlouhodobého stresu a dochází tak k obnovení homeostázy. Ovšem tyto adaptační odezvy jsou pouze na úrovni zachování biologické rovnováhy buněk, čímž dochází k udržení homeostázy i na úrovni organismu či kolonie. Dochází právě k odstranění zbytečných nebo potenciálně nebezpečných typů buněk (**Galluzzi et Vitale, 2018**). Na základě tohoto mechanismu pracuje nekróza, která je tedy typem regulované buněčné smrti, ale nespadá do buněčné smrti programované (**Eisenberg-Lerner et al., 2009**).

Tabulka I : Přesné terminologie související s buněčnou smrtí dle Nomenclature Committee on Cell Death 2018 (Galluzzi *et Vitale*, 2018)

Buněčná smrt	nevratná degenerace životně důležitých buněčných funkcí s následnou ztrátou buněčné integrity (propustnost plasmatické membrány či buněčná fragmentace)
Programovaná buněčná smrt (PCD)	zvláštní forma regulované buněčné smrti, která se vyskytuje za fyziologického scénáře. Netýká se poruch homeostázy a nevyskytuje se v souvislosti s nedostatečnou adaptací na stres
Regulovaná buněčná smrt (RCD)	forma buněčné smrti, která je výsledkem aktivace jednoho nebo více signálních transdukčních modulů, a proto může být farmakologicky nebo geneticky regulována (do určité míry)
Autofagie	forma regulované buněčné smrti, která mechanicky závisí na mechanismu autofagie nebo jejích součástech
Nekrótoza	metoda regulované buněčné smrti vyvolaná poruchami extracelulární nebo intracelulární homeostázy, která kriticky závisí na MLKL, RIPK3 a kinázové aktivitě RIPK1.

1.1.1 Apoptóza

Název programované buněčné smrti „apoptóza“ poprvé použil J. F. Kerr ve své publikaci, kde se zabýval objevem a popsáním regulované buněčné smrti (**Kerr *et al.*, 1972**). Apoptóza je primární formou regulované buněčné smrti, jejíž mechanismus a charakter je v dnešní době již relativně dobře definován (**Ashkenazi *et Salvesen*, 2014**). Hlavní roli v této nejčastěji probíhající programované buněčné smrti zastává skupina specializovaných bílkovinných enzymů. Jedním a nejčastějším z nich je protein p53, který má v buňce kontrolní funkci. Protein p53 je aktivován ve chvíli, kdy je buněčná DNA poškozena takovým způsobem, že buňka není schopna provést ochranné mechanismy. Dochází tak ke kumulaci proteinu p53 v jádře a cytoplazmě, čímž koncentrace tohoto proteinu je zvýšena natolik, že napomáhá permeabilizaci membrány mitochondrií. Zároveň protein p53 rozhoduje jak o zastavení růstu buňky, tak o případné buněčné smrti. (**Ashkenazi *et Salvesen*, 2014; Chipuk *et al.*, 2004; Hohenberge, 2005; Xu *et al.*, 2006**).

Typickým znakem pro apoptózu je viditelná změna v morfologii buňky, kterou může být odloučení buňky od bazální membrány a okolních buněk. Tím se buňka svažuje, dochází k jejímu zakulacení a tvorbě tzv. puchýřků, které mohou být povrchové, ale i dynamické a

jsou výsledkem oddělení plazmatické membrány od cytoskeletu. Puchýřky nacházející se na povrchu buněk upozorňují na počáteční stádium apoptózy. Oproti tomu dynamické puchýřky se tvoří v pozdním stádiu a zapříčiňují změnu tvaru buňky. Zároveň během tohoto procesu dochází ke kondenzaci jádra a fragmentaci DNA (**Ashkenazi et Salvesen, 2014; Sebbagh et al., 2001**).

U apoptózy se uplatňují dvě základní dráhy, které vedou k následné buněčné smrti. Jednou z těchto signálních drah je dráha vnitřní. Ta zprostředkovává většinu proapoptotických signálů a je řízena působením faktorů rodiny BCL-2 a Bax. Druhou možnou cestou aktivace apoptózy je vnější dráha, která je spuštěna aktivací smrtících domén TNF-receptorové nadrodiny, jež se nachází na plazmatické membráně. Tyto domény mohou být spuštěny pomocí iniciátorů buněk, mezi které patří CD95, TRAIL-R1 a TNF α /TNFR1. Domény tak spustí apoptózu pomocí vazby na specifické receptory, které se nachází na povrchu buněk. Tato dráha je tedy aktivována pomocí vazby ligandu smrti na receptory, kdy receptory tvoří trimery a skrze adaptorové proteiny dochází k aktivaci kaspáz (**Gyrd-Hansen et Meier, 2010**). Díky indukci posttranslačních modifikací dochází také k regulaci kaspáz, kdy se uplatňuje indukce pomocí ligandu TRAIL. Dochází tak ke stabilizaci kaspázy a tím se zvyšuje její účinnost (**Xu et al., 2014**).

Apoptóza může být regulována i pomocí antiapoptických molekul BCL-2. Tyto molekuly integrují signalizaci stresu a tím podporují přežívání buněk. BCL-2 jsou tedy ukazatelem, zda rakovinová buňka přežije, nebo podlehne apoptické smrti. Bylo však dokázáno, že mnoho proteinů pocházejících z rodiny BCL-2 vykazovalo aktivitu pro potlačení nádoru. Oproti tomu nadměrná exprese proteinů z rodiny BCL-2 podporovala přežívání rakovinové buňky (**Delbridge, 2015**).

Z hlediska mikroskopického jsou apoptické buňky ve světelném mikroskopu patrné jako malé, shluklé, je viditelný kondenzovaný chromatin a fragmentace DNA v jádře (**Ashkenazi et Salvesen, 2014; Sláma et al., 2006**).

1.1.2 Nekróza

Další formou buněčné smrti je nekróza (**Ashkenazi et Salvesen, 2014; Nikolettou, 2013**). Zda buňka umírá v důsledku apoptózy či nekrózy závisí na povaze signálu pro buněčnou smrt, typu tkáně, fyziologii tkáně a prostředí (**Zeiss, 2003**). Nádorové buňky se však vyznačují i tím, že jsou rezistentní k programované buněčné smrti, tedy apoptóze a autofagii a uplatňuje se u nich mechanismus nekrózy (**Murphy et al., 2013; Wu et al., 2012**). I přes to, že v historii byla za formu buněčné smrti považována pouze apoptóza,

následné vědecké výzkumy zaměřené na nekrózu odhalily, že buňky s nekrotickou morfologií mohou zanikat pomocí regulované nekrózy (**Degterev et al., 2005; Quyang et al., 2012**). Tento proces probíhá u buněčné linie, která je na apoptózu rezistentní. Dochází k indukci pomocí TNF- α a TNFR1, zatímco je apoptóza blokována (**Ashkenazi et Salvesen, 2014; Tonnus et al., 2018**). Opět u nekrózy hrají hlavní roli receptory smrti a jejich ligandy. Jak již bylo uvedeno, může jím být TNF- α , ale také FasL a TRAIL (**Quyang et al., 2012**). U tohoto procesu regulované nekrózy byly identifikovány kinázy RIPK a PARP1, které jsou v regulované nekróze klíčovou komponentou a později se začala používat zkrácená forma této nekrózy, tedy nekroptóza (**Degterev et al., 2005; Quyang et al., 2012**). Nekroptóza je forma regulované buněčné smrti, která je vyvolána poruchami buněčného mikroprostředí (**Galluzzi et Vitale, 2018**). Nekroptóza se stala velmi diskutovaným tématem, a to díky jejímu charakteru. Jedná se o typ regulované buněčné smrti, kdy dochází ke kritické indukční fázi pomocí apoptózy, ale její morfologický charakter vyplývá z náhodné nekrózy (**Ashkenazi et Salvesen, 2014**).

Nekróza ale stále kriticky přispívá k různým patofyziologickým procesům. Jsou jimi například rejekce transplantátu, sepse, infarkt myokardu, autoimunitní poruchy a další (**Tonnus et al., 2018**). Zároveň byl odhalen fakt, že ROS a tím zvýšení mitochondriální aktivity, stejně tak jako peroxidace lipidů, hrají jednu z hlavních rolí při nekrotické buněčné smrti (**Ashkenazi et Salvesen, 2014**). Z hlediska morfologického u nekrózy dochází k integraci plazmatických membrán, tím dochází k tzv. bobtnání organel, především mitochondrií, a zvětšování objemu cytoplazmy. Po procesu bobtnání přichází ruptura organel, ale i samotné cytoplazmatické membrány, následuje kondenzace chromatinu a imploze buněk. Jádro je během takového procesu zvětšeno, ale jak již bylo uvedeno, nedochází k jeho porušení, jako je tomu například u apoptózy (**Ashkenazi et Salvesen, 2014; Nikolettou, 2013**).

Z mikroskopického hlediska je nekróza snadno odlišitelná od apoptózy. Ve světelném mikroskopu je patrné zvětšení buněk a jejich rozpad. Oproti tomu v elektronovém mikroskopu můžeme pozorovat shluk chromatinu, zvětšení organel a následný rozpad buněčné membrány (**Sláma et al., 2006**).

1.1.3 Autofagie

Z hlediska fyziologie je autofagie nezbytná pro správný vývoj organismu a udržování jeho homeostázy (**Klionsky, 2008**). Pokud je ale stálost vnitřního prostředí narušena, dojde ke změně růstu a vývoje buňky (**Überall, 2010**). Autofagie zprostředkovává odstranění

dysfunkčních proteinů a organel (**Ramirez-Sagredo et al., 2016**). Jedná se o proces, kdy jednotlivé buňky stráví vlastní buněčný materiál pomocí intracelulárních vezikulů (= autofagosomů), jež se účastní cesty rozkladu pomocí lysozomu, se kterým se později spojí. Dochází tedy k odstraňování částí buňky, které jsou poškozené či zcela nepotřebné tzv. „samopožíváním“. Zároveň autofagie zabraňuje hromadění proteinů a podporuje lepší adaptaci v případě nepříznivých podmínek, jakými jsou hypoxie, nedostatek živin nebo vznik oxidačního stresu. (**Klionsky, 2008; Kroemer et al., 2008; Ramirez-Sagredo et al., 2016**). Autofagii lze také popsat jako děj, při kterém vzniká nový útvar s membránou, tzv. fagofor. Takový útvar se postupně rozšiřuje, nastává obalení molekul určených pro likvidaci, tím je uzavřena dvoumembránová struktura a vzniká autolysozom, v němž dochází k rozložení obsahu, který je po vypuštění zpět do cytosolu využit pro syntézu dalších potřebných molekul, či jako zdroj energie (**Parzych et Klionsky, 2014**). Tento mechanismus je uplatňován při vzniku buněčného stresu, především z nedostatku živin, například při hladovění, čímž dochází k rozkladu proteinů (**Ramirez-Sagredo et al., 2016; Überall, 2010**). Na rozdíl od apoptózy, kdy dochází ke kolapsu cytoskeletu a štěpení DNA v časně fázi, degradace organel probíhá ve fázi pozdější programované buněčné smrti. U autofagie je tomu jinak. Zde dochází k rozpadu organel ve fázi rané a k degradaci cytoskeletu až ve fázi pozdější. Co mají ale apoptóza a autofagie společného je, že nejsou provázeny zánětlivou reakcí okolní tkáně, jako je tomu u výše uvedeného procesu buněčné smrti nekrózy (**Überall, 2010**).

Autofagii lze dělit na základě selektivity jednotlivých organel. Mezi selektivní autofagii spadá mitofagie, retikulofagie, pexofagie, ribofagie či xenofagie (**Johansen et Lamark, 2011**). Obecně však autofagii můžeme dělit dle cesty poškozených částí buňky do lysozomů. První typ je způsoben rozpadem proteinů pomocí autofagozomů, kdy dojde ke vzniku dvoumembránového vezikulu uvnitř buňky. Autofagozom poté oddělí materiál pro degradaci od zbytku buňky. Následně tyto organely splynou s lysozomy a zde proběhne hydrolýza bílkovin pomocí enzymů. Druhým typem je proces, kdy jsou pomocí vchlípení lysozomální membrány ničeny organely jako jsou ribozomy nebo peroxizomy. Struktury těchto organel nasedají právě na lysozomální membránu, kde jsou invaginovány. Poslední typ autofagie je zprostředkovan pomocí chaperonů. Dochází k rozpadu cytoplazmatických proteinů, které jsou rozpoznány, rozbaleny a transportovány přes lysozomální membránu. Zde se váží na membránové proteiny (**Überall, 2010; Lynch-Day et Klionsky, 2010**).

V poslední době je často diskutován vztah mezi nádorovým onemocněním a samotnou autofagií. Je známo, že nádorová buňka vykazuje nekontrolovatelné množení bez závislosti na

typu tkáně. Dochází u ní k rychlému množení buněk a je zde potlačena buněčná smrt, tedy i samotná apoptická dráha. Některé nádorové buňky ale vykazují různé typy autofagické aktivity. Není však stále jasné, zda se jedná o autofagii bránící vzniku nádoru, či zda se tento typ autofagie podílí na růstu samotného nádoru. Autofagie však působí jako mechanismus, který chrání organismus před oxidačním stresem pomocí odstranění organel, z čehož plyne teorie, že tento mechanismus spíše podporuje přežívání nádorové buňky (Überall, 2010).

Tabulka II: Typy buněčné smrti a jejich morfologie (Kroemer *et al.*, 2008; upraveno dle Galluzzi *et Vitale*, 2018)

Typ buněčné smrti	Morfologické znaky	Další informace
Apoptóza	oblý tvar buňky stažené pseudopodie zmenšení jádra modifikace cytoplazmatických organel pohlčení fagocyty	Typ programované buněčné smrti bez patologie tkáně
Nekróza	zduření cytoplazmy prasknutí plazmatické membrány zvětšení cytoplazmatických organel snížená kondenzace chromatinu	Regulovaná smrt buňky s patologickým postižením okolní tkáně, může být i fyziologická
Autofagie	ztráta kondenzace chromatinu masivní vakuolizace cytoplazmy zdvojení membrány u vakuol bez pohlčení fagocyty	Buněčná smrt za pomoci autofagie

1.2 Oxidační poškození buněk

Ještě před tím, než dojde k výše uvedeným dějům buněčné smrti, musí být daná buňka nějakým způsobem a do jisté míry poškozena. Jedním z tomu napomáhajících dějů je i oxidační stres buňky, který může vést později až k její smrti. To znamená, že za normálních podmínek buňka vykazuje rovnováhu mezi ROS a antioxidanty. V každé z buněk probíhají metabolické dráhy, ve kterých se uplatňují především oxidačně-redukční reakce. Během tohoto procesu vznikají volné radikály, které mohou způsobovat poškození činnosti buněčných struktur či blokovat jejich funkci. Rovnováha v buňce je tak narušena ve prospěch ROS. V tomto případě pak dochází ke zvýšené tvorbě volných radikálů a antioxidační systém organismu již nezvládá eliminovat tyto složky. Buňka je tak vystavena oxidačnímu stresu, díky němuž dochází k navození apoptózy (Soga, 2012). Ke vzniku oxidačního stresu může docházet při porušení tvorby či distribuce antioxidantů, ale také při zvýšeném příjmu ROS nebo dlouhodobému vystavení zátěže. Následkem je poté poškození buněčných struktur lipidů, proteinů, DNA a dalších biomolekul (Dudzinska *et al.*, 2018).

Na základě rovnováhy oxidantů a antioxidantů je možné oxidační stres detekovat. Prvním způsobem je stanovení ROS, o kterých bude pojednáno v kapitole 1.2.2. Dále lze pro detekci využít i hladiny jednotlivých buněčných antioxidantů, které se uplatňují ve funkci antioxidačního obranného systému (Kohen *et Nyska*, 2002; Štípek *et al.*, 2000).

1.2.1 Oxidanty a antioxidanty

Kyslík, který je součástí děje zvaný oxidační stres, může být redukován na vodu. Mezikrokem této reakce je vznik superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu. Molekulární kyslík se nachází v tripletovém stavu jako diradikál, ale může se vyskytovat i jako singletový kyslík. Kyslíkové radikály mohou vznikat jako alkylové nebo peroxidové radikály pocházející z lipidů. Oxidanty mohou být také generovány jako vedlejší produkty rentgenového a mikrovlnného záření (Sies, 1997). Volné radikály mají schopnost molekulám odebrat jeden elektron, což znamená, že mají oxidační účinek. Oproti tomu jejich opakem, jsou tzv. antioxidanty, které tomuto působení zabraňují (Racek, 2003).

Antioxidant je tedy látka, která brání vzniku volných radikálů a tím jejich mechanismus působení zpomaluje a snižuje jejich reaktivitu a toxicitu (Huang *et al.*, 2005). Antioxidantem může být látka splňující určité podmínky. Je to tedy látka či sloučenina, která může reagovat s ROS v místě jejich vzniku. Zároveň při reakci ROS a samotného antioxidantu nesmí vznikat ještě více reaktivní forma ROS a zároveň buňka musí obsahovat

dostatek určitého antioxidantu, aby mohla být zaručena správná reakce s ROS a tím i efektivní ochrana buňky (**Kalač, 2003**).

Dle lokalizace lze antioxidanty dělit na extracelulární a intracelulární. Extracelulární antioxidanty působí v prostředí, které se nachází vně samotné buňky a jejich význam je také menší, než u antioxidantů, které působí přímo uvnitř buňky. Takové antioxidanty řadíme do skupiny intracelulárních a zaujímají hlavní postavení v boji proti volným radikálům. Zároveň lze antioxidanty dělit dle lokálního působení, tedy na který volný radikál daný antioxidant působí. O těchto antioxidantech bude pojednáno v kapitole Antioxidační systém buněk níže (**Racek, 2003**).

1.2.2 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Reaktivní formy kyslíku jsou důležité pro signalizační reakce v buňkách (**Mittler, 2017**). ROS vykazují vysokou reaktivitu, díky níž jsou postupně poškozeny struktury buňky, její proteiny, lipidy a DNA. Zároveň může docházet i k nádorové transformaci (**Liou et Storz, 2010**). Mezi reaktivní formy kyslíku patří volné kyslíkové radikály. Tyto radikály obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Jsou jimi například superoxid, hydroxylový radikál nebo singletový kyslík (**Mittler, 2017**). Peroxid vodíku a kyselina chlorná poté spadají do neradikálových derivátů kyslíku (**Liou et Storz, 2010**).

K tomu, aby byly ROS produkovány, může dojít díky přenosu elektronu na molekulární kyslík. Tím dojde ke vzniku superoxidového radikálu, který je pomocí protonů z vody měněn na peroxid vodíku a molekulární kyslík za působení enzymu superoxidodismutasy (**Reth, 2002**).

Oxidační děje a tím produkce ROS převážně probíhají v mitochondriích a peroxisomech, kde dochází k redukci kyslíku na vodu pomocí přijetí čtyř elektronů. Pokud však mechanismus redukce není správný, dochází ke vzniku toxických derivátů (**Liou et Storz, 2010**).

Metodické stanovení ROS a tím zjištění ukazatele oxidačního stresu v buňce lze provést pomocí elektronové spinové rezonanční spektrometrie. Principem této metody je přímá detekce a zároveň identifikace volných radikálů vznikajících v průběhu oxidačního stresu. Z tohoto důvodu je metoda ESR velmi citlivá (**Tarpey et al., 2004**).

1.2.3 Volné radikály (VR)

Volné radikály, které jsou důležitou součástí ROS. VR jsou produkovány během buněčného metabolismu a mají významnou roli v buněčné signalizaci, apoptóze a transportu iontů (**Kuruntas, 2015**). Jedním z nich je i superoxidový radikál. Tento derivát vzniká adicí

elektronu na molekulární kyslík z (**Harrison *et al.*, 2003**). Účastní se lipoperoxidace, ale jeho reaktivnost je menší, než je tomu například u radikálu hydroxylového (**Holeček, 2005**). Má ovšem delší poločas života než hydroxylový radikál a z toho důvodu může prostupovat do mitochondriálního matrix, kde například působí poškození DNA (**Kohen *et Nyska*, 2002**). Současně je jedním z radikálů, který dává vzniku jiným volným radikálům, jako je právě hydroxylový radikál či peroxid vodíku.

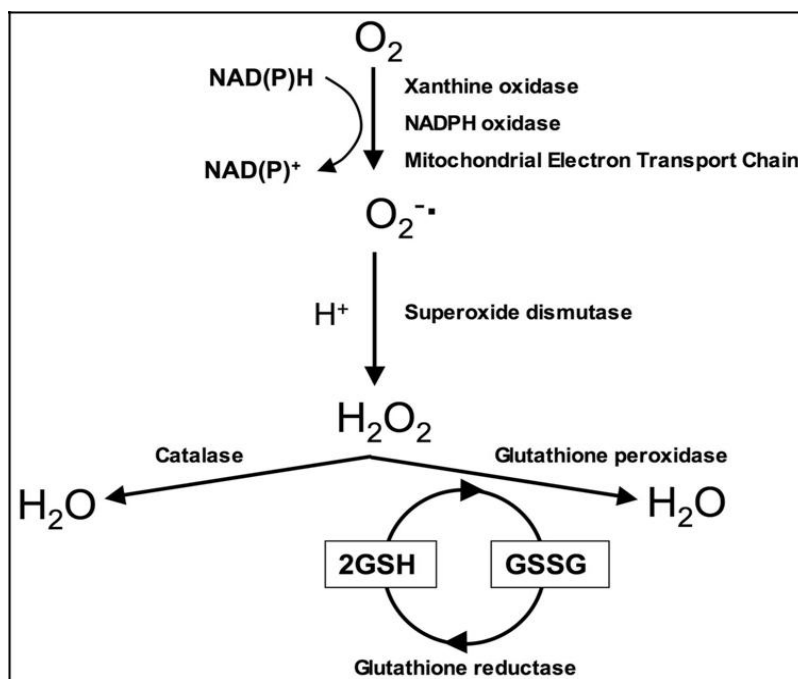
Peroxid vodíku je sám o sobě poměrně stabilní, ovšem je schopen reagovat s redoxně aktivními přechodnými kovy. Takto způsobenou reakcí vzniká reaktivní hydroxylový radikál. Hydroxylový radikál je považován za počáteční molekulu oxidačního poškození biomolekul v organismu a jeho vznik je také spjat s ionizací (**Pláteník, 2009**). Poločas jeho života je však velmi krátký, proto není schopen dostat se až do jádra samotné buňky. Poškozuje tedy pouze mitochondriální biomolekuly a z toho důvodu nemusí být příčinou vzniku oxidačního poškození (**Kohen *et Nyska*, 2002**).

Jak již bylo řečeno, peroxid vodíku spadá do tzv. neradikálových derivátů kyslíku. Za posledních pět let se do vědeckého popředí dostal fakt, že ne všechny ROS musí být považovány za toxické produkty. Jedním z nich je i peroxid vodíku, který je signalizační molekulou udělující cílovou specifitu oxidací thiolů. Mechanismus, kdy je signální molekula ROS přenesena na cílový protein v závislosti reakce s antioxidanty, může být závislý právě na hladinách peroxidu vodíku v buňce (**Reczek *et Chandel*, 2015**).

1.3 Antioxidační systém buněk

Vznik ROS a volných radikálů v těle buňky vyvolává mechanismus zvaný oxidační stres. Vzhledem k tomu, že buňky mají svůj vlastní antioxidační systém, jsou díky němu schopny tyto škodlivé molekuly eliminovat, čímž nemusí v těle buňky dojít k oxidačnímu stresu, a dojde tak k jeho potlačení (Aitken *et al.*, 2008; Reczek *et Chandel*, 2015). Antioxidanty mohou regulovat oxidační poškození přímou reakcí s volnými radikály, nebo nepřímo pomocí aktivního enzymu (Kurutas, 2015). Hlavní úlohou antioxidačního systému je tedy obrana buněk proti VR, kdy dochází ke snížení reaktivity VR na méně agresivní molekulu. Antioxidační systém buněk můžeme rozdělit na enzymatický a neenzymatický. U enzymatického antioxidačního systému, se uplatňují enzymy. Jsou jimi například superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GPx) a glutathiontransferasa (GST).

Na obrázku 1 je patrný mechanismus působení jednotlivých antioxidačních enzymů (Aitken *et al.*, 2008; Holeček, 2005; Štípek, 2000).



Obrázek 1: Enzymatický antioxidační systém buňky (Aitken *et al.*, 2008)

1.3.1 Superoxiddismutasa (SOD)

SOD katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku a vyskytuje se v buňce jako dimer. Zároveň ve své molekule může obsahovat měď, zinek či železo (Aitken *et al.*, 2008; Holeček, 2005; Štípek, 2000). Je jedním z nejsilnějších enzymatických antioxidantů, kdy

katalyzuje konverzi superoxidových aniontů na kyslík a peroxid vodíku, což již bylo řečeno. Peroxid vodíku je následně odstraněn katalázou nebo pomocí GPx. SOD v buňce existuje ve dvou formách. První formou je cytosolická a druhou mitochondriální. Tento enzym neutralizuje superoxidové ionty pomocí svého aktivního místa na iontu kovu (**Kurutas, 2015**).

1.3.2 Glutathionperoxidasa (GPx)

Dalším enzymem je tedy glutathionperoxidasa (GPx). Tento enzym se v buňce ve většině případů nachází ve formě tetrameru, a to především v cytosolu a mitochondriích, kde jeho molekula obsahuje prvek selen. Jeho hlavní funkcí je přeměna hydroperoxidů na méně škodlivé sloučeniny a vodu (**Aitken et al., 2008; Holeček, 2005; Ighodaro et Akinloye, 2017; Štípek, 2000**). Z hlediska metabolismu glutathionu katalyzuje oxidaci glutathionu na hydroperoxid. Na základě přítomnosti i nepřítomnosti selenu v glutathionperoxidase, se tento enzym může vyskytovat až v osmi formách. Jednou z forem, která závislost na selenu nevykazuje je nazývána glutathion-S-transferasa (**Ighodaro et Akinloye, 2017; Kurutas, 2015**).

1.3.3 Glutathion-S-transferasa (GST)

Posledním zmíněným enzymem je glutathion-S-transferasa (GST), která se uplatňuje především u mechanismu detoxikace některých xenobiotik a zároveň je schopna napomáhat mechanismům, které odstraňují produkty vzniklé v průběhu peroxidace. Katalyzuje tedy konjugaci redukovaného glutathionu, který já následně z buňky vytlačován (**Aitken et al., 2008; Holeček, 2005; Štípek, 2000**). Jedná se o opačnou reakci, jako tomu bylo u glutathionperoxidasy. Tedy GST katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku zpět na oxidovanou formu glutathionu (**Kurutas, 2015**).

1.3.4 Neenzymatické antioxidanty

V případě uplatnění neenzymatického antioxidačního systému buňky jsou do ochrany proti ROS řazeny různé vysoko- a nízkomolekulární antioxidanty. Jejimi zástupci jsou například melatonin, transferin, feritin, albumin, vitamíny E a C a především samotný glutathion a jeho prekurzor N-acetyl-L-cystein (NAC) (**Kurutas, 2015; Rahman, 2007**).

Melatonin stimuluje výše uvedené antioxidační enzymy, zároveň stabilizuje buněčnou membránu, čímž napomáhá obraně proti oxidačnímu poškození. Mezi jeho další funkce můžeme zařadit stimulaci hladin intracelulárního glutathionu a jeho zvýšení v buňkách (**Kurutas, 2015**).

Dalším enenzymatickým antioxidantem je N-acetyl-L-cystein, který stejně jako glutathion obsahuje thiolovou aktivní skupinu. NAC je prekurzorem glutathionu, který je díky němu syntetizován za pomoci deacetylace na cystein, a tak lze udržet jeho intracelulární hladinu zvýšenou a pomoci zachytávání volných radikálů. Nadále NAC může poskytovat chelátové místo pro kovy a z tohoto důvodu je využíván jako antioxidant využívající se při otravě těžkými kovy (**Kuruntas, 2015**).

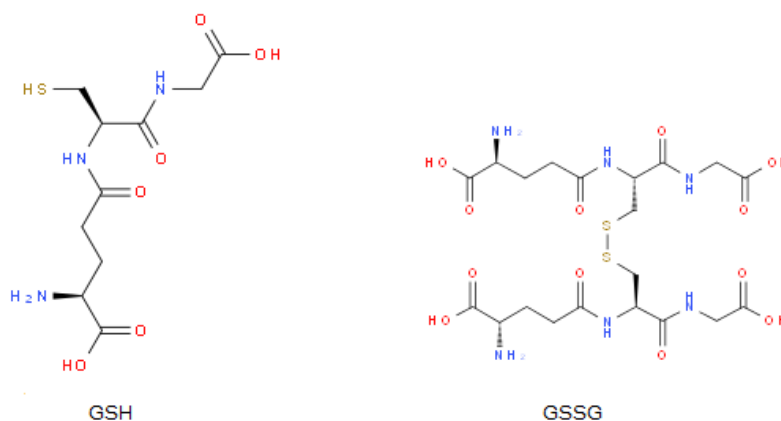
1.4 Glutathion

Glutathion spadá do neenzymatického antioxidačního systému a účastní se několika biochemických dějů. Jsou jimi detoxikace, produkce koenzymů a recyklace vitamínů. Těmito mechanismy napomáhá v buňkách při ochraně proti škodlivým ROS a chrání tak i samotné bílkoviny, které jsou později využity při opravách DNA. Za pomoci enzymu glutathion peroxidasy je převeden z jeho redukované formy na oxidovanou formu, čímž je schopen udržovat redoxní potenciál uvnitř buňky (**Rahman, 2007**).

S glutathionem přímo reaguje hydroxylový radikál, zatímco ostatní známé radikály, jako jsou superoxidový radikál či peroxid vodíku potřebují k reakci příslušné enzymy. Mezi takové enzymy patří glutathion-S-transferasa, čímž za jejího působení dojde k eliminaci VR, který je následně vyloučena z buňky (**Racek, 2003; Rahman, 2007**).

Glutathion je jedním z nejdůležitějších antioxidantů v lidském organismu a také klíčovým regulátorem intracelulárních redoxních dějů. Je tomu z důvodu thiolového místa, které obsahuje (**Ghibelli et al., 1999**). Glutathion je tedy nízkomolekulárním thiolem (**Tausz, 2000**). Právě díky této thiolové skupině je glutathion schopen tvořit disulfidické můstky. Z tohoto důvodu zaujímá významnou roli v obraně buněk (**Shao et al., 2008**). Nadále glutathion obsahuje glutamát, cystein, glycin, které jsou vzájemně pospojovány peptidickými vazbami. Jedná se tedy o tripeptid (**Ganduli et al., 2007**). V dnešní době je role metabolismu glutathionu velmi diskutována díky reakci organismu na těžké kovy, xenobiotika a dalších (**Tausz, 2000**). Glutathion má ještě několik dalších funkcí. Podílí se totiž na obraně organismu proti patogenům, kdy dochází k akumulaci glutathionu v buňce, čímž musí být i zvýšena jeho syntéza. Zároveň má schopnost procházet membránových prostorem organel, účastnit se regulace buněčného cyklu a chránit proteiny, aby nebyly denaturovány v průběhu oxidačního stresu. Při aktivaci těchto mechanismů se uplatňuje právě thiolová skupina glutathionu, která je v tomto procesu oxidována a tím vzniká tzv. glutathionsulfid (GSSG) (**Noctor et al., 2002**).

Intracelulární organely obsahují 10-15 % z celkového množství glutathionu (**Lang et al., 2000**). V buňce ho pak můžeme nalézt ve dvou formách, kde struktura těchto obou typů je patrna na obrázku 2, kde můžeme i vidět, že GSSG vzniká spojením dvou jednotek GSH za působení volných radikálů a ROS (**Tausz, 2004**). Mezi jeho nejvýznamnější funkce a v dnešní době nejvíce sledované, je schopnost regulovat buněčný cyklus včetně buněčné diferenciaci, proliferace a programované buněčné smrti (**Lang et al., 2000**).



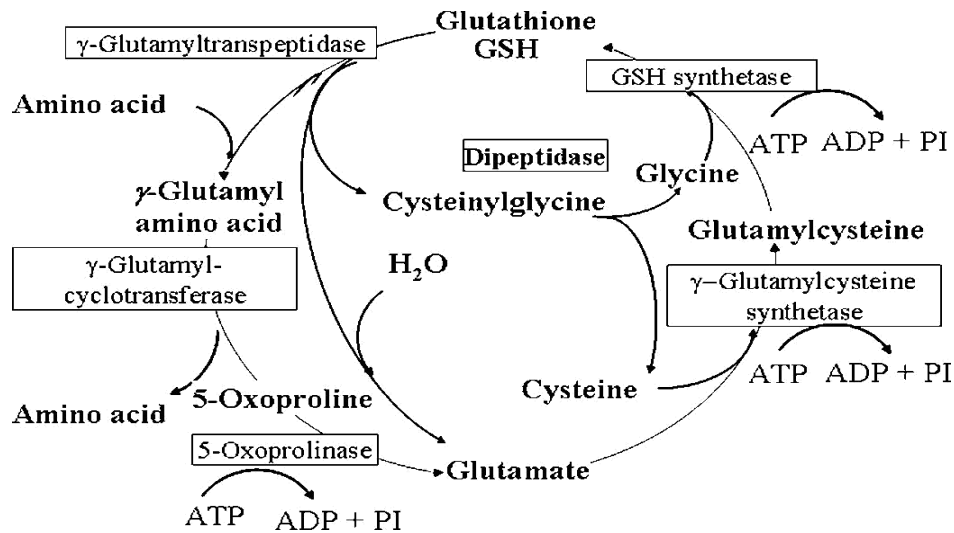
Obrázek 2: Struktura GSH a GSSG (Převzato z: Lang et al., 2000)

1.4.1 Syntéza glutathionu a jeho degradace

Glutathion je v buňce syntetizován pomocí adice cysteinu na glutamát a následně adicí glycínu (**Lang et al., 2000**). Pro jeho syntézu je tedy třeba L-glutamátu a L-cysteinu a glycínu (**Marengo et al., 2016**). K syntéze tohoto antioxidantu dochází téměř ve všech buňkách organismu, ale největší produkci disponují hepatocyty. Z jaterních buněk může být GSH transportován do krevního oběhu. Tímto vzniká GSH sérového typu, který je v jiných buňkách organismu využit pro syntézu GSH právě díky zdroji cysteinu (**Forman et al., 2009**). GSH se účastní odstranění peroxidů a xenobiotik za působení GSH-S transferas (GST) a GSH peroxidas (GPx). Zároveň je významným redukčním činidlem obsaženým v intracelulární části buňky. K syntéze GSH dochází v cytosolu buňky. Do tohoto děje jsou zapojeny i příslušné enzymy, bez kterých by tyto reakce vůbec neproběhly. Jsou jimi glutamátcysteinligasa, gama-glutamyltransferasa a glutathionsyntetasa (**Lang et al., 2000**).

S těmito enzymy se setkáme v tzv. γ -glutamyllovém cyklu, který je patrný na obrázku 3. Tento cyklus dává vzniku jedné molekuly glutathionu (**Noctor et al., 2002**). Do tohoto cyklu se řadí dvě ATP-dependentní reakce, během nichž dochází k syntéze a degradaci

glutathionu. Zároveň je zde zahrnuto šest reakcí, které jsou katalyzovány pomocí enzymů. V prvním kroku vykonává svou funkci enzym γ -glutamylcysteinsyntetasa, který katalyzuje vznik γ -glutamylcysteinu. Druhý krok představuje reakci mezi γ -glutamylcysteinem a glycínem. Tato reakce je katalyzována glutathionsyntetasou (GS) a vzniká zde samotný glutathion (GSH) (Kalinina *et al.*, 2014).



Obrázek 3: γ -glutamylový cyklus (Kaur *et al.*, 2009)

Stejně tak jako dochází k syntéze glutathionu, musí také docházet k jeho degradaci. K tomuto ději dochází v buněčném cytosolu či vakuolách (Noctor *et al.*, 2002). V GSH může dojít k hydrolýze vazby mezi cysteinem a glutamovou kyselinou za katalýzy γ -glutamyltransferasy (GGT), která přenáší zbytek γ -glutamyly na aminokyselinu. Tímto mechanismem je zprostředkován import komplexu do buňky. Zde se uplatňuje další typ enzymu, γ -glutamylcyklotransferasy, která štěpí vzniklou vazbu γ -glutamyly na aminokyselinu. Vzniká 5-oxoprolin a příslušná aminokyselina. 5-oxoprolin je poté převeden na kyselinu glutamovou pomocí působení oxoprolinas. Kyselina glutamová je následně substrátem pro γ -glutamylcysteinsyntetasu, která opět vstupuje do prvního kroku γ -glutamylového cyklu. Těmito mechanismy je glutathion znovu syntetizován, ale může být i opět degradován. Vše záleží na potřebách dané buňky. (Kalinina *et al.*, 2014).

Existuje však další cesta degradace, kdy dochází k odštěpení glycínu při uplatnění karboxypeptidasy, který se vyskytuje v cytosolu a vakuolách buněk. V těchto organelách je odštěpován glycín z glutathionových konjugátů a GSSG (Noctor *et al.*, 2002).

1.4.2 Metabolismus glutathionu

Metabolismu glutathionu se účastní podobné enzymy jako syntézy. Ovšem zde jsou uplatňovány γ -glutamyltransferasa, γ -glutamylcyklotransferasa a 5-oxoprolinasa. Na povrchu membrány, kam je přenesen glutathion, se vyskytuje γ -glutamyltransferasa. Je to enzym, který na sebe váže cystein a methionin. Dojde zde k přenosu glutamylového zbytku z GSH na aminokyselinu za vzniku glutamylové aminokyseliny a cysteinylglycinu. Cysteinylglycin je dále štěpen a využit při syntéze GSH. Výše uvedená aminokyselina přechází zpět do nitra buňky. Následuje reakce, kdy dochází ke vzniku aminokyseliny a 5 – oxoprolinu, který podléhá hydrolýze za pomoci enzymu 5-oxoprolinasy a tento děj se neustále opakuje (**Noctor et al, 2002**).

Vzhledem k antioxidačnímu působení glutathionu a využití jeho intracelulárních hladin v průběhu onkologické léčby je třeba jeho hladinu také stanovit. Mezi rutinně známé metody, které se mohou využívat při stanovení glutathionové deplece, můžeme řadit kapalinovou a plynovou chromatografii, spektrometrii či elektrochemické metody (**Gaubin et al., 2000**). Vzhledem ke složení glutathionu, zde není přítomnost fluoro- nebo chromoforů. Z tohoto důvodu je třeba samotný GSH před stanovením derivatizovat na jeho thiolové skupině (**Kand'ár, 2016; Camera et Picardo, 2002**). Z toho důvodu výše uvedeným metodám v dnešní době velmi konkurují metody fluorescenční. Je tomu na základě vysoké citlivosti, kterou vykazují a také díky jejich specifitě. Mezi tyto fluorescenční metody patří fluorescenční sondy na bázi orto-ftalaldehydu, monochlorobimanu či monobromobimanu. Vzhledem k tomu, že koncentrace glutathionu v buňce je také ukazatelem buněčné viability, budou tyto metody diskutovány v další kapitole (**Čapek et al., 2017**).

1.5 Viabilita buněk

Viabilitou buněk se rozumí tzv. životaschopnost a zároveň vykazání její enzymové aktivity (**Mascotti et al., 2000**). Barer a Harwood ve svém článku z roku 1999 uvedli definici viability buněk (**Barer et Harwood, 1999**). Dle nich se jedná o předpoklad, že buňky mají schopnost přežít po obecně uznávanou dobu. Jedná se tedy o přežití buněk po období, kdy dochází k buněčné proliferaci a tím udržení viability daného druhu buňky. Viabilita kultivovaných buněk je také závislá na vhodně naředěných kultivačních médiích, teplotě kultivace, okolních vlivech, a především sterilitě práce (**Barer et Harwood, 1999; Tihelková, 2012**).

Zároveň buněčná viabilita závisí na stáří buněčné kultury a počtu pasáží, kterými dané kultury prošly. Stáří buněčné kultury a počet pasáží má samozřejmě vliv na rychlost dělení buněk, expresi povrchových receptorů či tvorbu intracelulárních enzymů, které jsou potřebné k buněčnému metabolismu. Právě z tohoto důvodu byly buněčné linie transformovány ze stavu nestabilizovaných buněčných linií na tzv. imortalizované, tedy nesmrtelné. Tímto způsobem v dalších generacích buněk již nedochází k senescenci. Výjimkou jsou však buňky pocházející ze tkáně nádoru, které již mají neomezenou mitotickou aktivitu a tím vykazují dlouhodobou viabilitu bez transformace. Mezi buněčné linie nestabilního typu řadíme příkladem buňky MRC-5, WI-38 a HEL-299. Oproti tomu mezi stabilní linie a tím tedy linie ideální k využití výzkumných experimentů patří buněčné linie A549, BHK-21, HeLa a K-562 (**Šebek, 2018**).

Dalším faktorem působícím na viabilitu buněk je zamrazení a rozmrazení buněk. Tyto kroky se potýkají s obsahem nitrobuněčné vody, která může tvořit krystaly, jež jsou schopny narušit buněčnou membránu a tím dochází k nežádoucím účinkům a prasknutí buněk. (**Šebek, 2018**).

Pro detekci viability se používají různá barviva. Jsou jimi například trypanovová modř či neutrální červeně. Na základě buněčného poškození dochází pak k akumulaci daného barviva v těle buňky, čímž buňka pozorovaná v mikroskopu vykazuje barevný obraz. Oproti tomu buňka, která má vysokou životaschopnost a není nikterak poškozena, zůstává neobarvena. Je zde tedy hodnocen poměr živých a mrtvých buněk (**Mascotti et al., 2000; Niles et al., 2009**). Zároveň se viabilitou buněk rozumí schopnost buňky produkovat metabolity za pomoci aktivních enzymů. Tato buněčná funkce je též využívána pro detekci viability, kdy detekovaným metabolitem může být i samotný GSH (**Circu et al., 2012**).

1.5.1 Přehled testů a hodnocení viability

Buněčné kultury jsou vzhledem k etice a náročnosti testování *in vivo* testovány *in vitro*. Je tomu i z důvodu vystavení buněk určité toxické látce či některým chemikáliím, které by mohly při testování *in vivo* poškodit živý organismus svými nežádoucími účinky. Tyto okolní faktory mohou způsobit poškození buňky a tím změnu její proliferace a viability. Pro hodnocení takových změn je využívána řada testů, které poskytnou informaci o stavu dané buněčné kultury. Pro testování viability je možné využít testy, které udávají počet mrtvých buněk, kdy buňky vykazují reakci na toxickou látku (= cytotoxicita buněk), nadále lze využít testy pro stanovení životaschopnosti buněk a poté testy pro celkový počet buněk, který je založen na principu počítání živých a mrtvých buněk (Celis, 2006).

U těchto testů dochází ke sledování, jak daná látka či léčivo působí na buněčnou membránu, růst a buněčnou proliferaci. Principem metod, které dávají informace o buněčné viabilitě měřené pomocí detekce úrovně metabolismu, je pak schopnost buňky redukovat určitou sloučeninu (barvivo), jakou může být MTT, XTT, MTS a SRB (Celis, 2006).

1.5.1.1 Testy na základě barvení buněk

Prvním využívaným testem je test viability trypanovou modří. Trypanová modř je sůl toluidin-diazo-diamino-naftoldisulfonové kyseliny, která se využívá pro detekci poškození buněčné membrány. Jak již bylo uvedeno výše, barvivo nemůže prostupovat buněčnou membránou, pokud není poškozena. V opačném případě dochází k jeho akumulaci do membránového prostoru (Mascotti *et al.*, 2000). Živé buňky tedy nevykazují známky barvení, oproti tomu mrtvé buňky jsou zbarveny modře. Hodnocení se provádí v Bürkerově komůrce či speciální skleněné destičce. Tímto lze tedy odlišit mrtvé a živé buňky. Metoda hodnocení viability pomocí trypanové modří patří mezi tzv. kolorimetrické metody a je nejčastější detekční metodou viability (Mascotti *et al.*, 2000). Dříve byly obarvené buňky počítány ručně pomocí hemocytometru. Ovšem v dnešní době modernizace je tato metoda doplněna o přístrojové vybavení, což zvyšuje jak efektivnost, tak reprodukovatelnost metody. Snižuje se tak tedy faktor lidské chyby, protože zacházení se vzorkem buněčné kultury je částečně automatizováno a jsou zde využity i zobrazovací techniky. Nevýhodou však je, že nelze rozeznat buňky poškozené apoptózou od buněk poškozených nekrotizací (Louis *et Siegel*, 2011).

Oproti předchozí metodě, kdy dochází k akumulaci barviva na buněčnou membránu, u testu cytotoxicity s neutrální červení se toto barvivo váže v lysozomech živých buněk. Do lysozomů je barvivo vázáno skrze polysacharidy či vplouváním do kyselého prostředí těchto

organel. Po inkubaci následuje spektrofotometrické proměření, před kterým dojde k přidání rozpouštědla, jež na sebe naváže uvolněné barvivo. Zde platí pravidlo, že mrtvé buňky na sebe neutrální červeně nejsou schopny navázat (**Louis et Siegel, 2011; Mahto et al., 2010**). Jedná se o test s vysokou citlivostí, který je specifický přímo pro cytotoxicitu (**Mahto et al., 2010**).

Veškeré tyto metody mají oproti mechanickým analyzátorům nevýhody. Určují totiž pouze fyziologický stav buněk a může zde docházet k falešně pozitivním výsledkům (**Moniri et al., 2014**).

1.5.1.2 Počítání buněk

Pro detekci viabilních buněk se počítání buněk kombinuje s některou z výše uvedených metod barvení buněk. Jedním z typů určující poměr živých a mrtvých buněk po předchozím obarvení, je počítání buněk v Bürkerově komůrce. Tato metoda je velmi přesná a lze určit procentuální zastoupení životaschopných buněk. Velikost mikročtverce je vybírána na základě koncentrace buněčné suspenze. V dalším postupu se využívá vzorce, do kterého se dosadí počty buněk a počty zahrnutých čtverců včetně zohlednění objemu kapaliny. Výsledkem je pak koncentrace buněk na mililitr zkoumané suspenze (**Šebek, 2018**).

V dnešní době je i využíváno přístrojové techniky, tedy analyzátorů buněčných částic. Tyto přístroje pracují též na mikroskopickém principu a lze zde určit jak koncentraci buněčné suspenze, tak zastoupení viabilních buněk, pro což se opět využívá barvení buněčných kultur pomocí trypanové modři či neutrální červeně (**Šebek, 2018**).

1.5.1.3 Testy na základě detekce metabolitů

Třetí skupinou detekce buněk jsou metody, které jsou založeny na principu funkce metabolismu příslušné buňky. Principem těchto metod je reakce, při níž přidaný substrát reaguje s vyloučeným metabolitem z buňky, k němuž došlo při ruptuře cytoplazmatické membrány (**Niles et al., 2009**).

Prvním typem testu je test MTT. Zkratkou MTT se rozumí 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid, který je redukován na formazan, jenž má fialovo-červené zbarvení. Tento redukční mechanismus je zprostředkován na membráně mitochondrií živých buněk pomocí buněčných enzymů dehydrogenas. Mrtvé buňky tyto redukční schopnosti již nevykazují, a proto je lze snadno odlišit. Vzhledem k tomu, že zde vzniká barevný produkt, jeho detekce je spektrofotometrická. Finální hodnotou je úroveň absorbance, na základě které, je hodnocena životnost buněk. Čím vyšší je vykázána tato hodnota, tím vyšší je počet živých

buněk. Množství redukovaného formazanu je tedy přímo úměrné počtu viabilních buněk. Stejně tak jako je tomu u testu viability pomocí trypanovové modři se tato metoda řadí mezi kolorimetrické (Schlerliess, 2011; Stockert *et al.*, 2012; Riss, 2004). U této metody nalezneme některé nevýhody. V oblasti stanovení cytotoxicity může efektivnost MTT formazanové formace snížit některé inhibitory dýchacího řetězce či redukční činidla. Nevýhodou v principu provedení je, že barvivo formazanu vzniklé z MTT je totiž extrémně nerozpustné ve vodě, proto se musí před spektrofotometrickým měřením provést další extrakční krok. Je jím extrakce vytvořeného pigmentu pomocí organického rozpouštědla. Tímto mezikrokem může dojít ke znehodnocení kultury. I přes to je MTT test častou využívanou metodou (Präbst *et al.*, 2017; Schlerliess, 2011; Stockert *et al.*, 2012; Šebek, 2018).

Dalším typem testu může být test XTT. Tento test patří mezi kolorimetrické metody a je velmi jednoduchý, rychlý a spolehlivý. Jeho princip je založen opět na redukci tetrazoliové soli 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilidu (XTT) opět za pomoci mitochondriálních dehydrogenáz. Redukce probíhá na oranžově zbarvený formazan, který je za pomoci spektrofometru měřen ve formě absorbance a jeho množství je úměrné počtu viabilních buněk. Nevýhodou XTT testu je nemožnost vytvoření kalibrační křivky právě kvůli citlivosti tetrazoliových solí k různým proměnným. Oproti MTT testu má však test XTT vyšší citlivost, lepší dynamický rozsah a je méně náročný na manipulaci (Halberstadt *et Emerich*, 2011).

Předposledním uvedeným testem je stanovení hladiny glutathionu za pomoci MCB. Tento test se též využívá pro stanovení hladiny metabolitu buňky. Je jím výše zmíněný glutathion, kdy pomocí tohoto testu je měřena GSH deplece. Metoda využívá monochlorobimanu (MCB) jako barviva z důvodu jeho vysoké afinity právě ke GSH. Barvivo, které s GSH reaguje, vykazuje fluorescenční signál oproti nezreagovanému, které je téměř nefluorescenční. Intenzita fluorescenčního signálu odráží množství GSH, který je přítomen v buňkách. Na základě jeho hladiny je možné uvažovat viabilitu buňky. Tato metoda MCB má výhody především v rychlosti stanovení koncentrace GSH a zároveň vykazuje vysokou citlivost a specifitu. Mezi nevýhody tohoto testování však na druhé straně patří hodnocení výsledků, kdy je koncentrace GSH udávána v procentuálním zastoupení (Čapek *et al.*, 2017; Kamencic *et al.*, 2000).

Posledním typem testu je WST-1 test. Jeho principem je redukce tetrazoliových solí na barevné sloučeniny formazanu. K této reakci dochází za přispěvku mitochondriálních dehydrogenas, které se vyskytují v životaschopných buňkách. Tato metoda spadá mezi

chemosenzitivní, kolorimetrické metodys a na základě životaschopných buněk lze detekovat přímo jejich počet bez použití další extrakce. Je tomu z důvodu, že barvivo WST-1 je rozpustné ve vodě a není zde nevýhoda přidání dalšího kroku, jako je tomu u testu MTT a XTT. Z toho důvodu WST-1 test poskytuje citlivou a přesnou metodu pro detekci viability a proliferaci buněk. Má však pouze jedinou nevýhodu, jíž je pomalejší obarvování buněk oproti testu XTT (**Präbst *et al.*, 2017**).

Mezi nejvíce používané metody pro stanovení glutathionu patří kapalinová chromatografie. Její obrovskou výhodou je vysoká specifická citlivost, a to především ve využití detekce pomocí UV, hmotnostního spektrometru či elektrochemické detekce. Stejně tak jako ostatní metody se zde však můžeme setkat s některými nevýhodami. Jsou to vysoké náklady na provedení analýzy a časová náročnost analytického provedení.

Druhou nejčastěji používanou metodou je metoda spektrofotometrická. Tato metoda nabízí vysokou citlivost a též krátkou dobu měření, čímž se liší od kapalinové chromatografie. Nicméně obrovskou nevýhodou je promítnutí interferujících sloučenin, které glutathion inhibují. I v porovnání s těmito dvěma metodami jsou přesto v dnešní době nejčastěji upřednostňovány testy na základě fluorimetrického stanovení.

Ty vykazují vysokou citlivost a specifickou. Mezi tyto metody spadá OPA, jenž je využívána více než metoda pomocí fluorescenční sondy MCB. Oproti metodě OPA má metoda MCB podstatnou výhodu v mechanismu detekce průniku MCB přes membránu buňky, kde dochází k přímé reakci s thioley. Tato metoda je zároveň velmi citlivá, specifická a rychlá a její využití nalezneme především v rutinním stanovení hladin GSH (**Čapek *et al.*, 2017**; **Nauen *et Stumpf*, 2002**).

1.6 Toxické poškození buněk

Testování cytotoxicity *in vitro* se za poslední dobu stalo nedílnou součástí při objevech léčiv. Léčiva jsou totiž považována za potenciálně cytotoxické látky. Takovéto testování je nákladově efektivní, charakterizuje toxický potenciál nových léčiv a zároveň je výhodou včasného a rutinního provedení testování. Cytotoxicita například zabraňuje buněčné proliferaci, způsobuje výrazné morfologické změny, negativně ovlivňuje replikační činnost buňky a snižuje viabilitu. Výsledný cytotoxický účinek na buňku je také značně závislý na délce expozice, složení dané látky a mechanismu účinku (Niles *et al.*, 2009).

1.6.1 Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu

Jak již bylo řečeno, glutathion se v buňce nachází v oxidované a redukované formě. V organismu redukovaná forma převažuje nad oxidovanou, ale při tvorbě ROS se poměr mění ve prospěch GSSG, který následně začne z buněk unikat (Balendiran *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010). K tomuto procesu dochází při působení některých toxinů. Z počátku se buňky snaží narušení obranyschopnosti vyrovnat, ale později bohužel dochází ke zvratu v buněčném metabolismu. Může tak docházet ke snížení hladiny GSH (Kaur *et al.*, 2009; Nel *et al.*, 2006). Mimo buňku je pak převaha GSSG (Balendiran *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010).

Pokud vezmeme v potaz vztah GSH a účinku cytostatik, platí zde nepřímá úměra, protože čím nižší je koncentrace GSH, tím vyšší je citlivost buněk na dané cytostatikum. Tohoto mechanismu je využíváno i v protinádorové chemoterapii. U většiny nádorových onemocnění je ale koncentrace GSH v buňkách zvýšena. Dochází tedy k ochraně nádorové buňky, která poté vykazuje větší odolnost vůči cílené léčbě (Balendiran *et al.*, 2004).

Zároveň na buňku mohou působit určité toxiny nebo látky, které GSH vycytávají a dochází tak k jeho depleci. Takovou látkou může být například diethylmalonát (DEM) nebo buthioninsulfoximin (BSO). U DEM dochází k vycytávání a následné depleci glutathionu a tím zastavení růstu buněk. Oproti tomu u BSO je blokován enzym důležitý pro syntézu GSH. Dojde tedy k blokaci syntézy GSH a vyčerpání stávajícího GSH, což má za následek změny uvnitř buňky (Gaubin *et al.*, 2000; Nicola *et al.*, 2014).

Jak již bylo řečeno, hladina GSH vykazuje hlavní úlohu při udržování homeostázy buněk, jež brání buňku před působením ROS. Ve chvíli, kdy dojde ke snížení hladiny GSH pod prahovou hladinu na základě působení volných radikálů, dojde k aktivaci apoptické signalizace. Buňka tedy není schopna udržet svou životaschopnost na určité úrovni a hyne.

Opakem je však zvýšení hladiny GSH, která buňku chrání a případně může udržovat její životaschopnost (**Circu et al., 2012**).

V průběhu stárnutí buněk a postupným snižováním buněčné viability dochází k poklesu hladin antioxidantů v buňce, a tedy i glutathionu. Tento mechanismus vyvolává větší riziko vzniku oxidačního stresu a zároveň se snižuje účinnost antioxidantů v buňce. Je to buď kvůli jejich nedostatku, či zvýšené tvorbě ROS (**Mulgund et al., 2015**).

Glutathion má také vliv na buněčnou proliferaci. Hladina GSH hraje ústřední roli při regulaci redoxního stavu buňky a je nezbytný pro redoxní buněčnou signalizaci. Intracelulární glutathion má antioxidantní roli a reguluje tedy děje vedoucí k oxidačnímu stresu a opačně (**Ashtiani et al., 2011**).

Hladina glutathionu v buňkách a jeho metabolismus má zásadní význam pro studium buněk a jejich toxicity (**Čapek et al., 2017**). Pokud daná buňka vykazuje toxické poškození, dochází ke zvýšení hladiny oxidovaného glutathionu GSSG. K depleci glutathionu poté dochází v situaci, kdy dojde k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a tím je buňka vystavena apoptické smrti. Po podání puromycinu, který by měl způsobit apoptózu buňky. Ve studii Dr. Ashtiana, byl na jednu stranu v cytosolu buňky detekován cytochrom c, který vedl k inhibici syntézy glutathionu a jeho následné depleci, to ale nemělo vliv na životaschopnost buňky ještě před tím, než došlo k aktivaci apoptického signálu (**Ashtiani et al., 2011**). Ve chvíli, kdy ale došlo k odstranění puromycinu, byl cytochrom c zredukován pomocí obnovené syntézy glutathionu a buňka vykazovala normální viabilitu bez jakéhokoliv poškození. Bylo tomu z důvodu, že buněčná smrt byla způsobena toxinem, jenž vedl k apoptóze, ale smrt jako taková nebyla způsobena samotným vyčerpáním glutathionu. Z toho vyplývá, že uvolnění cytochromu c není dějem, který by vedl k apoptóze, ale pouze narušuje rovnováhu v buňce, která může vést k apoptóze. Uvolnění cytochromu c tedy vede k depleci GSH, ale může tomu být i naopak. Prevencí buňky proti apoptóze je vytlačování glutathionu vně buňky (**Ashtiani et al., 2011**).

Několik studií ukázalo, že rakovinotvorné buňky vykazují adaptivní mechanismy na oxidační stres zvýšením exprese antioxidantních enzymů. Tím dochází k detekci zvýšené hladiny GSH a tím k vyšší antioxidantní kapacitě dané buňky, která brání oxidačnímu stresu uvnitř rakovinotvorné buňky a tato buňka je pak schopna přežít (**Marengo et al., 2016**).

Další důležitou roli v rakovinotvorných buňkách hrají telomery a jejich délka, což jsou ukazatele buněčného dělení. Pokud vezmeme v potaz souvislost, mezi délkou telomer a samotným glutathionem, zjistíme, že změny v hladinách glutathionu indukují změny v aktivitě telomerázy a také může docházet ke změnám v regulaci buněčného cyklu a tím i viabilitě

buněk. Na základě znalosti hladiny glutathionu lze pak předpokládat, jaké další děje se v buňce budou odehrávat. Klíčovým enzymem pro kontrolu syntézy glutathionu je GCS. Produkce tohoto enzymu je v případě působení xenobiotik na buňku zvýšena. Pokud tedy dochází k produkci ROS ve vysoké koncentraci, pro buňku to má fatální následky a dochází tak k její smrti. Oproti tomu, pokud je ROS v buňce přítomen pouze v koncentracích nižších, dochází k syntéze glutathionu a tím buněčné proliferaci. Buňka tedy nehyne (**Ashtiani et al., 2011**). Působení některých cytotoxinů na buňky tedy značně mění hladinu intracelulárního glutathionu. Například ve studii Janga je uvedeno, že buňky A549 byly inkubovány s sanguinarinem, což mělo za následek depleci glutathionu a následnou apoptickou smrt těchto rakovinových buněk. A právě z tohoto důvodu je glutathion hlavním ukazatelem cytotoxicity a může být využit při léčbě některých nádorových onemocnění (**Jang et al., 2008**).

Snížení hladiny glutathionu značí o průběhu buněčné smrti, apoptózy. Ke snížení hladiny GSH dochází ale již před rupturou plazmatické membrány nebo ještě před fragmentací DNA buňky, což značí, že apoptóza je značně závislá na snížení hladiny GSH (**Dalton et al., 2004; Franco et al., 2006; Valverde et al., 2006**). Oxidačním stresem vyvolaným xenobiotiky, prooxidanty, toxiny či chemoterapeutiky dochází ke generaci ROS, tím oxidaci glutathionu na formu GSSG, která je transportována z buněk a tím dojde k vyčerpání GSH v intracelulárním prostředí. K tomu, aby byl GSH syntetizován zpět, je zapotřebí NADPH a G6PD. Ovšem v průběhu apoptózy dochází k depleci NADPH a inaktivaci G6PD. Právě z tohoto důvodu nemůže dojít k resyntéze GSH. Ovšem v cytosolu by mohlo dojít k využití dehydrogenas, které by mohly regenerovat NADPH, ale pokud klesne jejich hladina, k čemuž dochází při oxidačním stresu buňky, zvýší se tím hladina GSSG a tím se zvýší citlivost buňky k cytostatiku. Buňka tak podléhá oxidačnímu stresu a následuje její zničení pomocí apoptózy (**Lee et al., 2002**). Eflux glutathionu způsobuje poškození redoxního potenciálu, ovšem k tomuto mechanismu dochází i při působení xenobiotik či jiných toxinů, kdy tyto škodlivé látky jsou vytlačovány z buňky pomocí membránových transportérů, což také přispívá ke glutathionové depleci (**Blair, 2006; Nepravishta et al., 2012**).

1.6.2 Toxicita tBHP

Tert-butyl hydroperoxid je hepatotoxické činidlo, které v buňkách vyvolává oxidační stres způsobený vznikem volných radikálů. Z tohoto důvodu se také využívá při studiu účinků oxidačního stresu na některých buněčných liniích. Zároveň je tBHP schopen procházet buněčnou membránou. Pokud je tento toxin použit v nižších koncentracích, způsobuje buněčnou smrt pomocí apoptózy. Oproti tomu při využití dávek vyšších již způsobuje

nekrózu (**Haidara et al., 2002**). Vzhledem k tomu, že tBHP je schopen vyvolat oxidační stres buňky, při kterém je zatížen antioxidační systém, může být proces jeho působení úzce spjat i se samotným GSH (**Circu et al., 2012**). Zde ale může docházet k uplatnění NAC (N-acetylcystein) jakožto vedlejšího produktu glutathionu. Tento antioxidant má díky svým cysteinovým zbytkům možnost udržet glutathion v potřebné hladině a zároveň chránit metabolismus buňky a tím i její viabilitu (**Kerksick et Willoughby, 2005**). Ve studii Circu a kolektivu byl NAC podán ještě před vnesením toxické látky do buňky (**Circu et al., 2012**). NAC je pak schopen blokovat oxidační mechanismy vedoucí ke spuštění apoptického signálu, a to především při působení tBHP. Dochází zde tedy pouze k dočasné ztrátě poměru GSH/GSSG. V případě podání NAC jakožto post-oxidační léčby bohužel zprostředkování apoptické cesty vedoucí ke smrti buňky není potlačeno (**Circu et al., 2012**).

Mechanismus účinku tBHP může být buď závislý na metabolismu železa, kdy dochází ke vzniku volných radikálů a tím k vyvolání oxidačního stresu, nebo způsobuje depleci redukovaného glutathionu, což má za následek například vznik zlomů vláken DNA. O působení tBHP tedy může rozhodovat jak jeho koncentrace, tak testovaný druh buněčné linie (**Lazzé et al., 2003**). Uvnitř buňky dochází k detoxikaci tBHP pomocí glutathionperoxidasy na GSSG. Zároveň dochází k regeneraci GSSG na GSH za pomoci NADPH a glutathionreduktasy. V takovém případě buňky vykazují zvýšené hladiny GSH, a navíc změnu metabolického profilu v porovnání s kontrolou. Ve chvíli, kdy dojde k redukci veškerých zásob GSH, nemůže dojít k úplné metabolizaci tBHP. Bylo totiž zjištěno, že samotný tBHP snižuje koncentraci GSH. Tím se tBHP kumuluje a vzniká nadbytek tert-butoxylových či tert-butylperoxylových radikálů, které poškozují funkci mitochondrií, proteinů, lipidů a tím vedou k buněčné smrti. Díky tomuto mechanismu poškození buňky dochází *in vitro* k uvolnění laktátdehydrogenasy do kultivačního média, čímž jsme poté schopni provést detekci dehydrogenas a vyjádřit tak buněčnou viabilitu pomocí dehydrogenasové aktivity (**Long et al., 2004; Wang et al., 2018**).

1.6.3 Toxicita dimethylsulfoxidu (DMSO)

Dalším toxinem je dimethylsulfoxid, jenž má různorodé biologické účinky. Lze ho využít jako toxin i jako léčivo. V roce 1940 se začal využívat v průmyslu jako rozpouštědlo a později byl poprvé DMSO použit jako léčebná indikace při intersticiální cystitidě. Od té doby se DMSO podrobil několika studiím. Mezi jeho biologické účinky patří modulace syntézy kolagenu, vliv na neurotransmitery a tím i samotnou nervovou soustavu, ale také působí změny morfologie fibroblastů a hepatocytů. Dále vykazuje myorelaxantní efekt a zachovává

stabilitu lysosomálních membrán, je schopen uvolňovat histamin a tím způsobuje vasodilataci. Zároveň vykazuje vysokou schopnost prostupovat přes jakoukoliv bariéru. Společně s cisplatinou se DMSO využívá ke zmírnění nefrotoxicity a zároveň nové studie ukázaly, že toto spojení potlačuje šíření karcinomu plic. Účinky DMSO ale stále nejsou úplně prozkoumány, a proto stále přetrvává nejistota v jeho použití, z velkého hlediska i ve veterinární medicíně (**Madruga et al., 2017**).

DMSO efektivně proniká kůží, ovšem dříve byl zaměřen výsledek účinku pouze na lokální, nikoliv systémové vlastnosti této látky (**Capriotti et Capriotti, 2012**).

1.6.4 Toxicita cisplatin (CDDP)

Cisplatina byla poprvé využita v pokusu pro výzkum růstu *E. coli* za použití platinové elektrody. Docházelo zde ke tvorbě cisplatin jakožto meziprojektu, což způsobovalo úhyn bakterií. Následně byl toxin zkoumán detailněji a zjistilo se, že je schopen vyskytovat se ve stereoizomerech *cis* a *trans*. Stereoizomer *cis*, tedy cisplatina, je účinnější (**Lippert, 1999**). Cisplatina se tedy začala využívat při léčbě nádorových buněk jako chemoterapeutikum a byla zapsána jako léčivo především při boji proti rakovině vaječníků a varlat (**Carpenter, 2010**). Stejně tak jako jiné toxiny, má i samotná cisplatina některé nežádoucí účinky. Jsou jimi nefrotoxicita, neurotoxicita a ototoxicita. Zároveň cisplatina vyvolává pocity na zvracení až zvracení (**Kelland, 2007**). Dalšími komplikacemi, se kterými se u léčby pomocí cisplatin můžeme setkat, jsou rezistence nádorových buněk a její vznik, či úplné potlačení žádoucí reakce cisplatin na nádorovou buňku (**Stordal et al., 2007**). Některé buňky již mají vrozenou rezistenci vůči cisplatině, jiné tuto rezistenci mohou získat. Mezi tyto buňky řadíme například buňky karcinomu ovarií, kde dochází k mutaci v genu BRCA2, který je úzce spjat s opravou DNA, čímž brání cisplatině poškodit danou buňku (**Sakai et al., 2008; Stewart, 2007**).

Účinek cisplatin je docílen pomocí několika mechanismů. První z nich je intracelulární aktivace cisplatin po proniknutí do nitra buňky, kdy dojde k odštěpení ligandu a vzniku mono- nebo disubstituovaných metabolitů. Zde je tedy uplatněn mechanismus alkylace. Poté je uplatněn mechanismus druhý, tedy že je cisplatina schopna se vázat na cílové struktury uvnitř buňky (**Florea et Büsselberg, 2011; Wheate, 2010**). Následkem toho dochází k interakci cisplatin s DNA, což způsobuje blokaci replikace a transkripce, čímž jsou ovlivněny některé signální dráhy buňky, které později vedou k buněčné smrti. Mechanismus blokace replikace či transkripce je ale závislý na typu aduktů cytostatika a vlákna dvoušroubovice DNA (**Todd et Lippard, 2009**). Buněčný systém je však schopen typy aduktů rozpoznat pomocí proteinů, což je jeden z prvních obranných mechanismů při

interakci buňky s cisplatinou. Tyto opravné proteiny jsou tedy zodpovědné za sled signální dráhy, která postupně vede ke smrti buněk (**Cepeda *et al.*, 2007; Siddik, 2003**).

U průběhu apoptózy bylo pojednáno o proteinu p53, který by mohl souviset s toxikologií cisplatin. Protein p53 hraje totiž svoji roli při opravách DNA, následném zastavení buněčného cyklu a spuštění buněčné apoptózy. p53 je aktivován právě blokací transkripce, což je způsobeno působením cisplatin. Tímto krokem lze pozastavit buněčný cyklus. Ve zdravé buňce má tedy funkci obrany proti změnám, jež by vedly ke vzniku nádorů, ale již u vzniklé nádorové buňky je tento protein zmutován, čímž dochází ke ztrátám jeho funkce a buněčné proliferaci (**Siddik, 2003; Wang *et Lippard*, 2005**).

Cisplatina je toxin, který má schopnost akumulovat se v buňkách a tím indukovat tvorbu ROS, což vyvolává v závislosti na jeho koncentraci a délce jeho působení určitý typ buněčné smrti. Při vystavení buňky malé koncentraci cisplatin po dlouhou dobu vede toto ke spuštění apoptických signálů a tím buněčné smrti pomocí apoptózy. Oproti tomu při vystavení buňky vysoké koncentraci cisplatin stačí krátká doba k tomu, aby buňka uhynula za pomoci nekrózy (**Brozovic *et al.*, 2010; Filipski *et al.*, 2009; Rabik *et al.*, 2007**).

Cisplatina se může uvnitř buňky vázat i na thiolové skupiny za pomoci glutathion-S-transferasy, ale i neenzymaticky. Thiolovou skupinu obsahuje například glutathion a v této chvíli, kdy dojde k navázání cisplatin, dochází k cisplatinové inaktivaci. Ovšem pokud se jedná o buňky rezistentní, hladina GSH může být zvýšena. Čím vyšší hladiny GSH, tím větší pravděpodobnost rezistence nádorových buněk na cisplatinu (**Amptoulach *et Tsavaris*, 2011; Goodman *et al.*, 2011; Rabik *et Dolan*, 2007**). Vzhledem k tomu, že cisplatina je toxinem interagujícím s GSH, narušuje značně i samotný antioxidační systém buněk a je schopna inhibovat některé antioxidační enzymy. Jsou jimi například glutathion-S-transferasa a glutathionperoxidasa, čím dochází ke vzniku ROS v nitru buňky. Toto působení se projevuje především na snížení membránového potenciálu u mitochondrií vedoucím ke zborcení metabolismu buňky a její následné smrti apoptózou (**Khynriam *et Prasad*, 2002; Rybak *et al.*, 2007; Saad *et al.*, 2004**).

1.6.5 Toxicita diethylmaleátu (DEM)

Diethylmaleát (DEM) je maleátový ester, který vzniká kondenzací kyseliny maleinové a ethanolu. Jeho úlohou je vychytávání glutathionu, čímž způsobuje jeho depleci (**Gaubin *et al.*, 2000**). Účinky DEM na intracelulární hladiny GSH byly zkoumány po dobu několika let. Mechanismus snižování koncentrace GSH za pomoc DEM je způsoben reakcí GSH s DEM za katalýzy glutathion-S-transferasy. Při této reakci dochází k vychytávání GSH a tím se zvyšuje

akumulace ROS uvnitř buňky, což vede k její smrti. Tento mechanismus samozřejmě závisí na koncentraci a čase působení DEM (**Gaubin *et al.*, 2000; Sen *et Packer*, 2002**). Buňky, které byly vystaveny účinku DEM, vykazovaly rychlý a trvalý pokles hladiny GSH oproti kontrolním buněčným kulturám. Zároveň na tomto základě hladiny GSSG vzrostly již po 12 hodinách a do 24 hodin zůstaly zvýšeny, čímž hladiny GSH po 24 hodinách inkubace klesly téměř na nulu (**Casey *et al.*, 2002; Gaubin *et al.*, 2000**). DEM také indukoval změnu regulace metabolismu GSH u rakovinných buněk. Zdá se, že DEM modifikuje mikroprostředí transformovaných buněk a tím omezuje jejich růst (**Priya *et al.*, 2014**). Ovšem k takovému efektu nedochází z příčin zvýšení propustnosti buněčné membrány, či narušení mitochondrií, jako je tomu u některých jiných toxinů, ale pouze vychytáním GSH a jeho deplecí (**Spiess *et al.*, 2010**).

2 CÍL PRÁCE

- 1) Využití buněčných linií A549 a Jurkat pro optimalizaci stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu.
- 2) Charakterizovat vztah buněčné viability a glutathionové deplece při studiu cytotoxicity u cisPt, diethylmaleátu, Cd, tBHP či jiných.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Pomůcky a přístroje

- Automatický pipetor Accujet-Pro (BrandTech Scientific, Německo)
- CASY counter (Roche, Švýcarsko)
- Centrifuga Labofuge 400 (HERAEUS Instruments, Německo)
- Inkubátor Memmert (IndiaMART, Indie)
- Invertovaný mikroskop Primo Vert (Carl Zeiss, USA)
- Kultivační lahve, misky a další plastové pomůcky pro buněčné linie (TPP, Švýcarsko)
- Laminární box Airstream (ESCO, USA)
- Lednice a mrazák (Liebherr, Německo)
- Mikrotitrační destičky 96jamkové (Nunc, Dánsko)
- Pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Spektrofotometr a spektrofluorometr Tecan Spark (Tecan, Rakousko)

Software

- Tecan SparkControl
- Microsoft Office – Word, Excel (Microsoft, USA)

3.2 Seznam použitých chemikálií

- *Cell proliferation reagent* WST-1 (Roche, Německo)
- Cisplatina, cisPt (Mr = 300,05; Sigma Aldrich, USA)
- Diethylmaleát, DEM (Mr = 172,18; Sigma Aldrich, USA)
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Mr = 78,13; Sigma Aldrich, USA)
- Fluorescenční sonda monochlorobiman, MCB (Mr = 226,66; Sigma Aldrich, USA)
- Tert-butylhydroperoxid, tBHP (Mr = 146,23; Sigma Aldrich, USA)

3.3 Kultivace buněk A549

Pro kultivaci buněk A549 byly použity tyto chemikálie:

- Buněčná linie adenokarcinomu lidských plic, A549 (ATCC, USA)
- *Minimum Essential Medium*, MEM (Sigma Aldrich, USA)
- RPMI 1640 (Biowest, Francie)
- Fetální bovinní sérum, FBS (*Fetal Bovine Serum*) (GIMCO, USA)

- Glutamin, GLU (GIBCO, USA)
- Pyruvát sodný, PYR (GIBCO, USA)
- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonová kyselina, HEPES (GIBCO, USA)
- Penicilin/Streptomycin, P/S (GIBCO, USA)
- Trypsin (GIBCO, USA)
- Fosfátový pufr (pH 7,4), 10× koncentrovaný, PBS (GIBCO, USA)
- Kompletní kultivační medium: MEM doplněné o 10% (v/v) fetálního bovinního séra, pyruvát, glutamin, HEPES, penicilin a streptomycin
- Kultivační médium bez fenolové červeně: RPMI médium doplněné o 10% (v/v) fetálního bovinního séra, pyruvát, HEPES, penicilin a streptomycin
- Inaktivační medium: kultivační medium MEM doplněné o 20% fetálního bovinního séra

Buněčná linie A549 byla kultivována ve výše uvedeném kompletním kultivačním médiu. Výsledná denzita buněk A549 dosahovala 500 tis. buněk. Buňky A549 byly kultivovány při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ až do dosažení cca 70-80 % konfluence. Této hodnoty bylo dosaženo přibližně po každých třech až čtyřech dnech, kdy byla také provedena pasáž buněk. Výsledné množství buněk bylo vypočteno za pomoci přístroje CASY counter (Roche, Švýcarsko). Následně byly nasazeny 96jamkové destičky z potřebné suspenze o koncentraci buněk 15 tis. na jamku za použití kompletního kultivačního média. Toto médium bylo v době experimentu vždy čerstvé a veškeré experimenty byly provedeny za použití 4. až 20. pasáže buněk.

3.4 Kultivace buněk Jurkat

Pro kultivaci buněk Jurkat byly použity tyto chemikálie:

- Buněčná linie lymfoblastomu lidských T-lymfocytů, Jurkat (ATCC, USA)
- RPMI 1640 (Biowest, Francie)
- Fetální bovinní sérum, FBS (*Fetal Bovine Serum*) (GIMCO, USA)
- Glutamin, GLU (GIBCO, USA)
- Neesenciální aminokyseliny, NAA (GIBCO, USA)
- Pyruvát sodný, PYR (GIBCO, USA)

- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonová kyselina, HEPES (GIBCO, USA)
- Penicilin/Streptomycin, P/S (GIBCO, USA)
- Fosfátový pufr (pH 7,4), 10× koncentrovaný, PBS (GIBCO, USA)
- Kompletní kultivační medium: RPMI doplněné o 10% (v/v) fetálního bovinního séra, pyruvát, glutamin, neesenciální aminokyseliny, HEPES, penicilinu a streptomycinu
- Kultivační médium bez fenolové červeně: RPMI médium doplněné o 10% (v/v) fetálního bovinního séra, neesenciální aminokyseliny, glutamine, pyruvátu, HEPES, penicilinu a streptomycinu

Buněčná linie Jurkat byla kultivována ve výše uvedeném kompletním kultivačním médiu. Výsledná denzita buněk Jurkat dosahovala 500 tis. buněk. Buňky Jurkat byly kultivovány při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ až do dosažení cca 70-80 % konfluence. Této hodnoty bylo dosaženo přibližně po každých sedmi dnech, kdy byla také provedena pasáž buněk. Zároveň každé tři až čtyři dny docházelo k výměně média. Výsledné množství buněk bylo vypočteno za pomoci přístroje CASY counter (Roche, Švýcarsko). Následně byly nasazeny 96jamkové destičky z potřebné suspenze o koncentraci 60 tis. buněk na jamku za použití kultivačního média bez fenolové červeně. Toto médium bylo v době experimentu vždy čerstvé a veškeré experimenty byly provedeny za použití 3. až 11. pasáže.

3.5 Příprava roztoků

Fosfátový pufr

Pro přípravu fosfátového pufru bylo smícháno 45 ml deionizované vody s 5 ml fosfátového pufru. Takto připravený pufr byl skladován v lednici při teplotě 4 °C, kdy doba uchování nepřekročila dobu 14 dnů.

Pracovní roztok cisplatiny (cisPt)

Ze zásobního roztoku cisplatiny o koncentraci 1 mmol/l byly za pomoci ředění připraveny koncentrace 50 μmol/l a 100 μmol/l. Pro ředění bylo použito médium bez fenolové červeně a takto připravené pracovní roztoky toxinů byly vždy čerstvé v den ovlivnění buněk.

Pracovní roztok diethylmaleátu (DEM)

Ze zásobní lahve bylo odebráno potřebné množství diethylmaleátu, který byl naředěn na koncentrace 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l a 2 mmol/l. Takto připravené koncentrace toxinu byly v den ovlivnění vždy čerstvé. Ředění proběhlo stejně jako v předchozím případě v médiu bez fenolové červeně.

Pracovní roztok dimethylsulfoxidu (DMSO)

Ze 100% zásobního roztoku DMSO byly připraveny příslušné koncentrace k ovlivnění buněk. Koncentrace připravených pracovních roztoků v médiu bez fenolové červeně byly 1%, 3% a 7%. Pracovní roztoky byly vždy čerstvé.

Pracovní roztok tert-butyhydroperoxidu (tBHP)

Ze zásobního 5,5 mol/l roztoku tBHP byly připraveny pomocí ředění koncentrace 10 µmol/l, 50 µmol/l a 100 µmol/l. Pracovní roztoky byly ředěny v médiu bez fenolové červeně a jejich příprava proběhla vždy v den ovlivnění buněk.

Pracovní roztok pro fluorometrické stanovení glutathionu

Pro buňky A549 byl připraven pracovní roztok smícháním PBS s zásobním roztokem monochlorbimanů (Čapek *et al.*, 2017). Pro buňky Jurkat byl připraven pracovní roztok o dvojnásobném množství oproti buňkám A549. Tyto roztoky byly vždy připravovány čerstvé před daným testováním.

3.6 Testování cytotoxicity daných toxinů

K testování cytotoxicity buněčných linií A549 a Jurkat byly použity vybrané toxiny jako cisplatina, diethylmaleát, DMSO a tBHP. Vliv toxinů byl sledován pomocí testů, kdy buněčná viabilita byla hodnocena pomocí testu WST-1 a hladina intracelulárního glutathionu pomocí fluorometrické detekce MCB.

Veškeré tyto testy byly prováděny v 96jamkových destičkách, kdy na jednu jamku této destičky bylo nasazeno 15 tis. buněk pro linii A549 a 60 tis. buněk pro linii Jurkat. U buněk A549 následovala 24hodinová inkubace, aby tyto adherentní buňky dostatečně přisedly na povrch destičky. Následovalo odpipetování kultivačního média a přidání média bez fenolové červeně s již naředěnou příslušnou koncentrací toxinu o objemu 100 µl/jamku. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze médium bez fenolové červeně. U buněk Jurkat po nasazení destičky nebyla prováděna inkubace, ale tyto buňky vzhledem k jejich suspenznímu

charakteru bylo možné ovlivnit ještě tentýž den. K připraveným buňkám bylo přidáno 20 μ l média bez fenolové červeně s naředěným toxinem.

3.6.1 Fluorometrické stanovení hladiny glutathionu

Pro fluorometrické stanovení glutathionu se upřednostňují metody, které jsou citlivé a zároveň vykazují vysokou specifitu. Z hlediska využití fluorescenčních sond sem patří monochlorobimany (MCB), které fluoreskují až po průniku buněčnou membránou a navázání na glutathion, kdy vzniká fluorescenční produkt (Čapek *et al.*, 2017; Kamencic *et al.*, 2000).

U linie A549 došlo nejprve k nasazení destiček s buněčnou suspenzí 15 tis. buněk na jamku o objemu 100 μ l. Po 24 hodinách byl tento objem odpipetován a přidán objem 100 μ l s již naředěným toxinem v médiu bez fenolové červeně. Takto ovlivněné buňky byly inkubovány po určenou dobu a poté byl přidán reagent MCB v objemu 20 μ l na jamku.

U linie Jurkat byla do destičky nasazena suspenze 60 tis. buněk na jamku v celkovém objemu 180 μ l. Vzhledem k suspenznímu charakteru těchto buněk byly buňky ovlivněny ihned a to objemem 20 μ l na jamku pracovního roztoku s naředěným toxinem. Objem přidávaného MCB zde činil 40 μ l na jamku.

Po přidání MCB byla vždy u příslušných destiček proměřena intenzita fluorescence pomocí spektrofotometru Tecan Spark (EX/EM = 394/490 nm). Určené časové intervaly detekce glutathionu byly měřeny v rozmezí 1-24 hodin a změna fluorescenčního signálu byla vždy vztažena ke kontrolním buňkám, jež činila 100 %.

3.6.2 WST-1 test

WST-1 test se využívá k hodnocení viability a proliferace buněk, i jako ukazatel cytotoxicity. Je zde spektrofotometricky měřena absorbance při 440 nm. Principem tohoto testu je redukce tetrazoliových solí na žlutý formazan za působení mitochondriálních dehydrogenas, kdy množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk (Yin *et al.*, 2013).

U linie A549 i Jurkat byly pro WST-1 test použity příslušné 96 jamkové destičky. Reagent WST byl přidáván v souladu s komerčním návodem. Po přidání WST byla vždy u příslušných destiček proměřena absorbance pomocí spektrofotometru Tecan Spark při 440 nm.

Časové intervaly měřené za pomoci testu WST u jednotlivých buněčných linií byly v rozmezí 1-24 hodin. Změna absorbance byla vždy stažena ke kontrolním buňkám, kde činila 100 %.

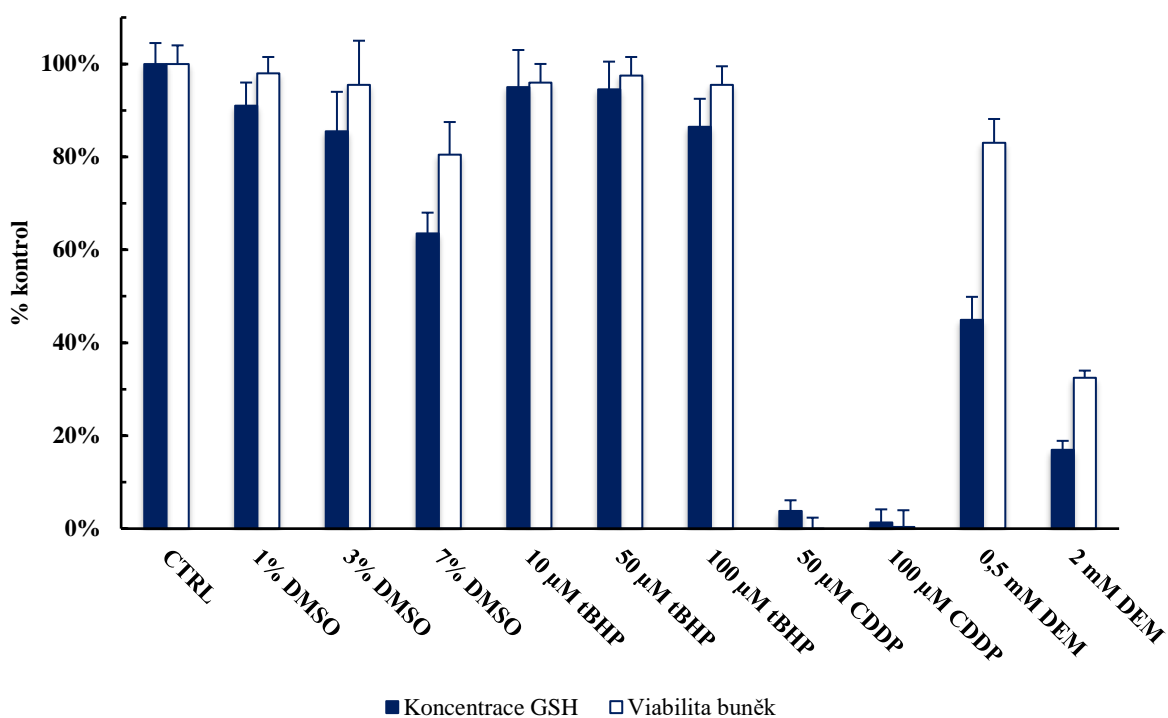
4 VÝSLEDKY

4.1 Modelové stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu

S využitím buněčných linií A549 a Jurkat byla stanovena cytotoxicita a koncentrace GSH po působení toxinů o různých koncentracích. Byly jimi 1%, 3% a 7% DMSO, dále 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$ tBHP, 50 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$ CDDP a 0,5 mmol/l a 2 mmol/l DEM. Buněčná viabilita byla hodnocena pomocí testu WST-1, koncentrace glutathionu byla stanovena pomocí fluorometrického stanovení. A549 a Jurkat buňky byly inkubovány po dobu 3 a 24 hodin s uvedenými toxiny.

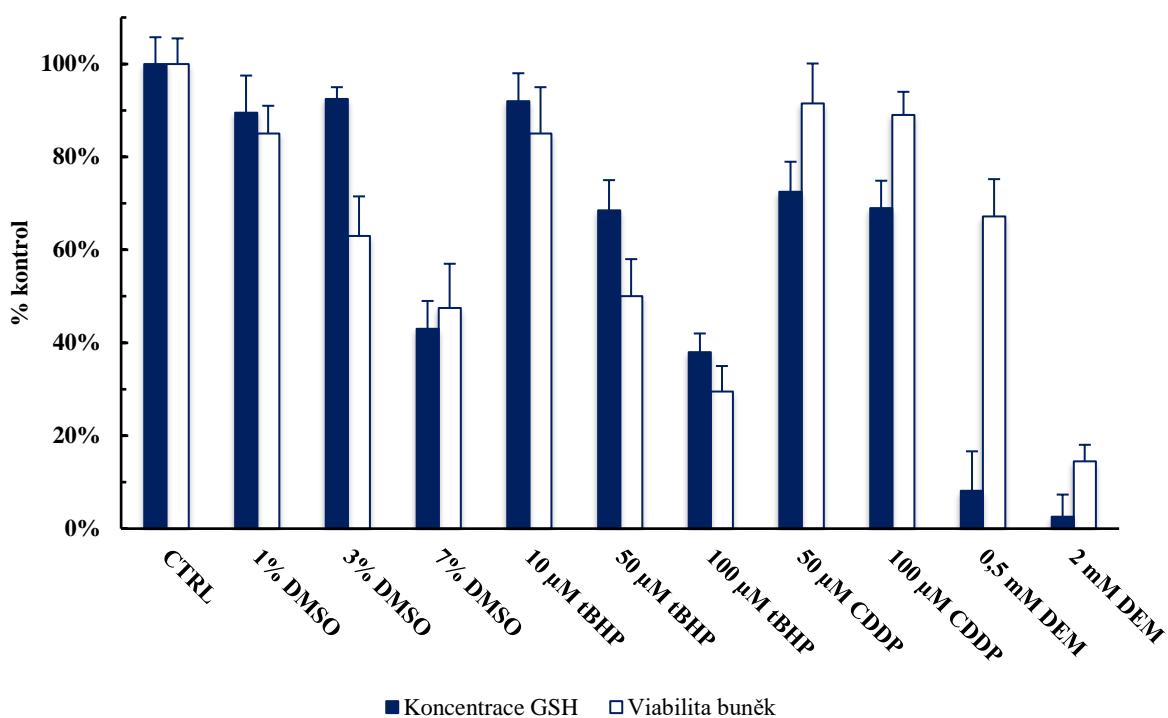
4.1.1 Stanovení cytotoxicity - 3 h inkubace

V grafu 1 můžeme vidět srovnání působení jednotlivých toxinů a jejich koncentrací u buněk A549 po inkubaci tří hodin. Je zde patrné, že u působení CDDP došlo k poklesu koncentrace GSH i buněčné viability téměř na nulu již po třech hodinách. Oproti tomu u expozice ostatním toxinům je vidno, že snížení koncentrace GSH ve třetí hodině předchází snížení buněčné viability. Z vybraných koncentrací DMSO vykazuje nejvyšší toxicitu 7% DMSO. Koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ a 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP mají na buňky po třech hodinách obdobný cytotoxický vliv. Při srovnání všech uvedených toxinů vykazuje inkubace buněk s DEM největší depleci GSH, která předchází snížené buněčné viabilitě. Zatímco koncentrace GSH u buněk při inkubaci s 0,5 mmol/l DEM vykazuje značnou depleci, vidíme, že daný toxin snížil buněčnou viabilitu prozatím na cca 83 %.



Graf 1: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu u vybraných toxinů - A549 buňky. (DMSO – dimethylsulfoxid; tBHP – tert-butylhydroperoxid; CDDP – cisplatina; DEM – diethylmaleát). Kontrola = 100 %; doba inkubace 3 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 10-20).

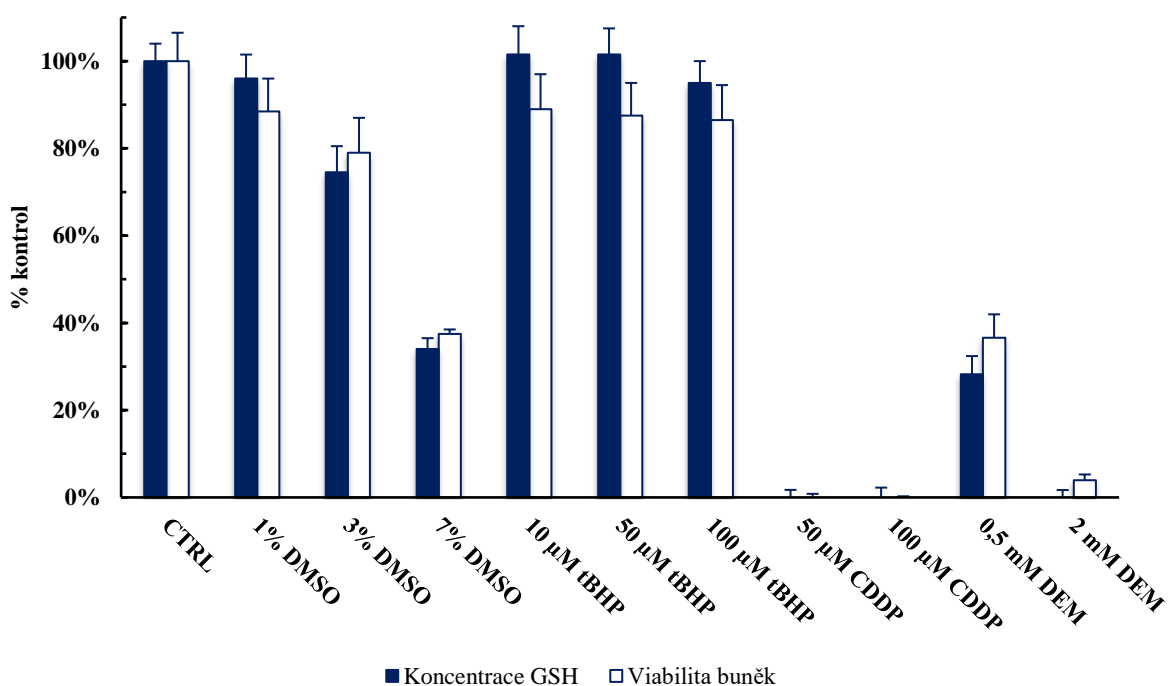
U buněk Jurkat došlo po třech hodinách inkubace (graf 2) s 7% DMSO k poklesu buněčné koncentrace GSH a zároveň redukci viability. V porovnání s buňkami A549 vidíme opačný efekt vztahu buněčné viability a koncentrace GSH u zbylých koncentrací DMSO, tedy u 1% a 3% DMSO, a zároveň všech koncentrací tBHP, kdy pokles viability buněk mírně předchází poklesu koncentrace GSH. Rozdíl oproti buňkám A549 vykazují buňky Jurkat i u inkubace s CDDP, kdy po třech hodinách od ovlivnění došlo k poklesu koncentrace GSH, které předcházelo poklesu viability buněk. Obě tyto hodnoty ale jsou zde vyšší než 60 %. U buněk A549 však již po tříhodinové expozici došlo k poklesu obou hodnot téměř na nulu. 2 mmol/l DEM indukoval pokles buněčné viability u buněk Jurkat na polovinu buněčné viability buněk A549, zatímco koncentrace GSH zde klesla na 3 % v porovnání s A549, kde koncentrace GSH byla 17 %. Ve stejném trendu je patrný i pokles hladiny GSH u buněk ovlivněných koncentrací 0,5 mmol/l DEM.



Graf 2: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu vybraných toxinů – Jurkat buňky. (DMSO – dimethylsulfoxid; tBHP – tert-butylhydroperoxid; CDDP – cisplatina; DEM – diethylmaleát). Kontrola = 100 %; doba inkubace 3 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 10-20).

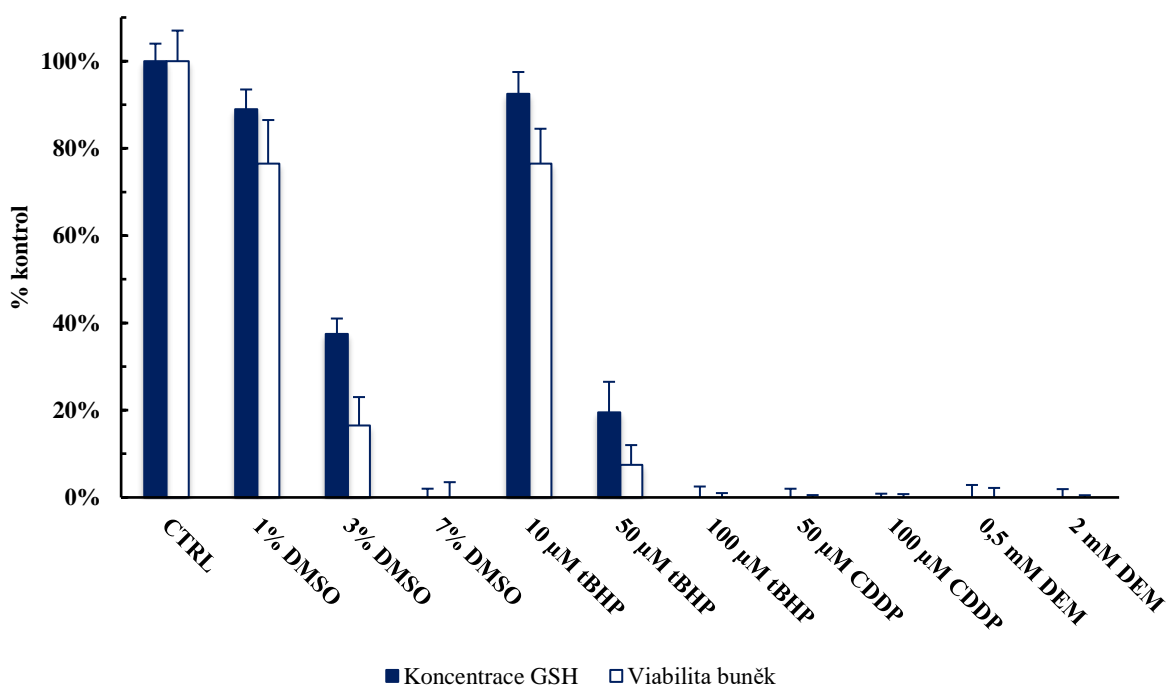
4.1.2 Stanovení cytotoxicity - 24 h inkubace

Po 24hodinové expozici vybraným toxinům již došlo k výraznějším detekovaným změnám. Tyto změny můžeme vidět v grafu 3. U buněk A549, na které působil 7% DMSO, došlo k poklesu koncentrace GSH téměř na polovinu tříhodinové expozice. Stejný pokles vykazovala i buněčná viabilita. Buňky ovlivněné 3% DMSO vykazovaly oproti buňkám ovlivněným 7% DMSO menší pokles GSH a buněčné viability. Předcházející úbytek koncentrace GSH a poté snížení buněčné viability však zůstal nezměněn. U ovlivnění buněk pomocí tBHP však došlo k navýšení buněčné koncentrace GSH, ale oproti výsledkům ze třetí hodiny viabilita buněk vzrostla. Buňky inkubované 24 hodin s 0,5 mmol/l DEM vykazují v porovnání s výsledky ze třetí hodiny inkubace pokles viability téměř na polovinu, zatímco koncentrace GSH se významně nezměnila. Zajímavé však je, že u buněk A549 inkubovaných s 2 mmol/l DEM je koncentrace GSH již vyčerpána a buňky mají téměř nulovou viabilitu.



Graf 3: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu u vybraných toxinů – A549 buňky. (DMSO – dimethylsulfoxid; tBHP – tert-butylhydroperoxid; CDDP – cisplatina; DEM – diethylmaleát). Kontrola = 100 %; doba inkubace 24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 10-20).

U buněk Jurkat po 24hodinové expozici 0,5 mmol/l DEM došlo k poklesu viability z 67 % v grafu 2 téměř na nulu (graf 4). Obdobně poklesla i buněčná viabilita u buněk inkubovaných s nižší koncentrací DEM. Zároveň z grafu 3 a grafu 4 je patrné, že nejmenší cytotoxický účinek na oba typy buněk vykazovaly 1% DMSO a 10 µmol/l tBHP. Avšak 7% DMSO a 100 µmol/l tBHP způsobovaly u buněk Jurkat jedny z největších cytotoxicit, zatímco u A549 tomu tak nebylo. Nadále byl u obou buněčných linií po 24hodinové expozici 50 µmol/l a 100 µmol/l CDDP prokázán pokles hladiny GSH a buněčné viability na 0 %.



Graf 4: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu vybraných toxinů – Jurkat buňky. (DMSO – dimethylsulfoxid; tBHP – tert-butylhydroperoxid; CDDP – cisplatina; DEM – diethylmaleát). Kontrola = 100 %; doba inkubace 24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 10-20).

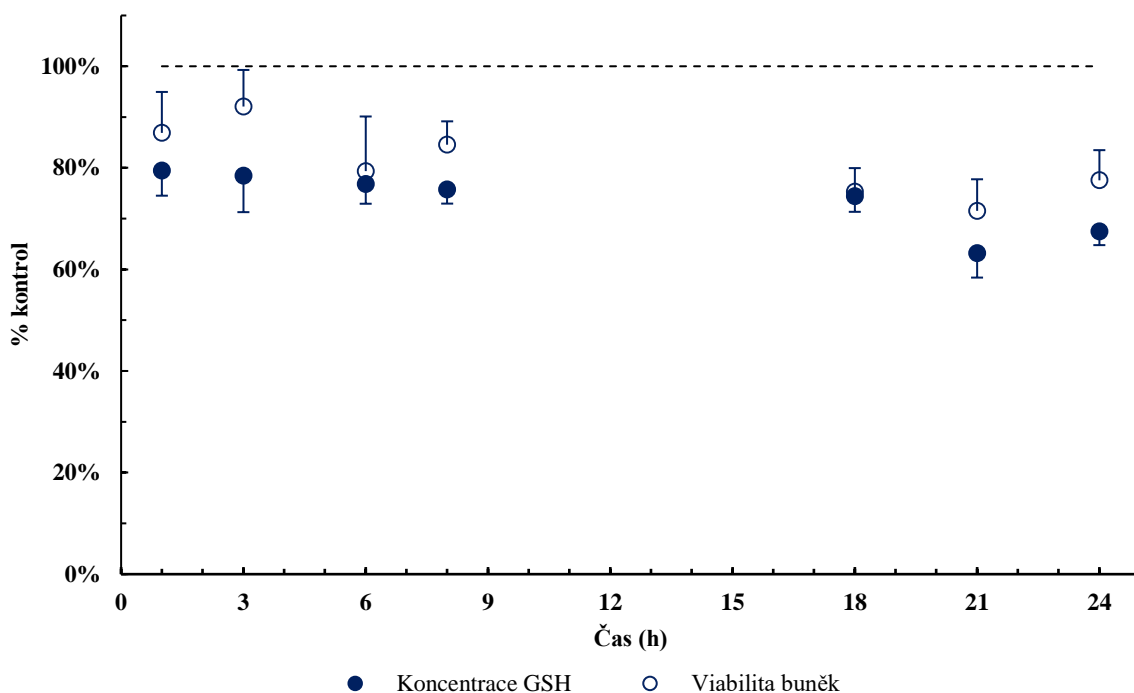
Z důvodu cytotoxicity CDDP, která způsobila u A549 a Jurkat buněk po 24 hodinách pokles buněčné viability až na 0 %, byl tento toxin z dalších experimentů vyloučen. Bylo totiž třeba charakterizovat vztah buněčné viability a koncentrace GSH v závislosti na době expozice toxinu. Pokles obou hodnot na 0 % by byl tedy pro takové experimenty nežádoucí. Z hlediska detailního stanovení vztahu buněčné viability a koncentrace GSH byly pro další experimenty vybrány toxiny s koncentracemi 3% DMSO, 50 µmol/l tBHP a 0,5 mmol/l DEM. Zároveň došlo k využití 0,1 mmol/l DEM. Bylo tomu z důvodu vychtávání GSH pomocí DEM, díky čemuž hladina GSH i buněčná viabilita poklesli na nulu u buněk inkubovaných s 2 mmol/l DEM.

4.2 Charakterizace vztahu buněčné viability a koncentrace glutathionu

S využitím buněčných linií A549 a Jurkat byla stanovena cytotoxicita a koncentrace GSH po působení toxinů o různých koncentracích. Byly jimi 3% DMSO, 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP a 0,1 mmol/l a 0,5 mmol/l DEM. Stejně jako v experimentech předchozích byla buněčná viabilita hodnocena pomocí testu WST-1, koncentrace glutathionu byla stanovena pomocí fluorometrického stanovení. Oproti předchozím experimentům se však doba inkubace buněk A549 a Jurkat rozšířila na 1, 3, 6, 8, 18, 21 a 24 hodin.

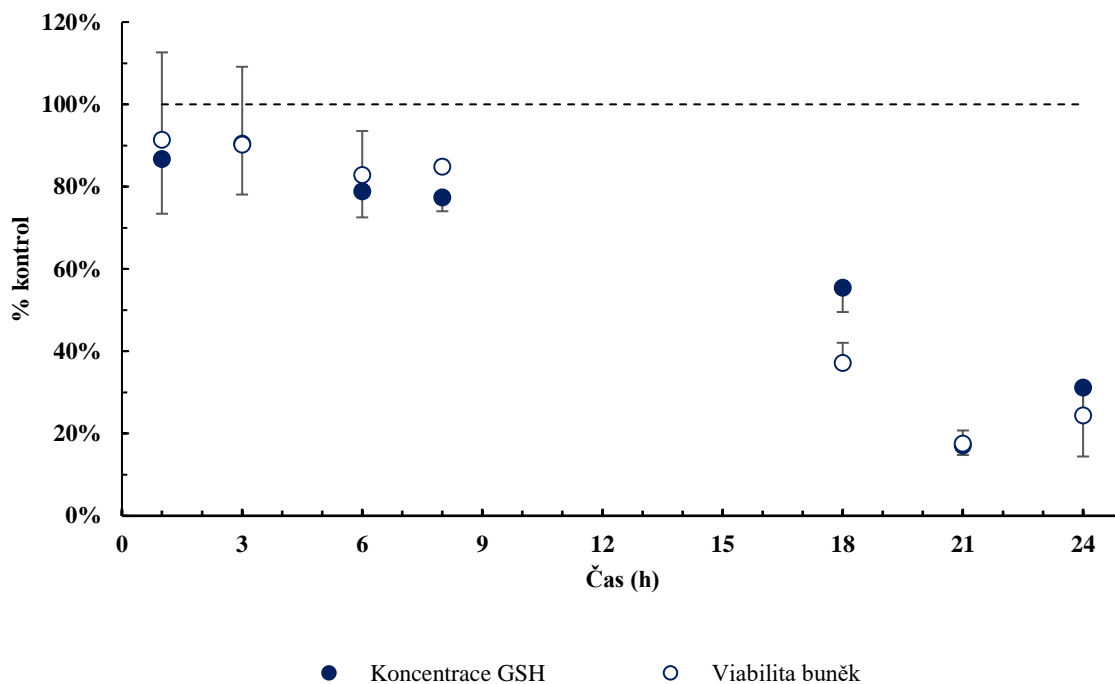
4.2.1 Toxicita dimethylsulfoxidu

V experimentech modelového stanovení cytotoxicity a koncentrace GSH byla zmíněna hypotéza, že snížení koncentrace GSH u A549 ovlivněných DMSO předchází snížení viability buněk. V detailnějším experimentu charakterizace vztahu viability a koncentrace GSH s využitím více časových limitů byla tato hypotéza potvrzena. Po stanovení cytotoxicity a koncentrace GSH nedošlo ani po 24 hodinách k rapidnímu snížení hladiny GSH a tím i buněčné viability. Se stejným výsledkem se setkáváme i nyní v experimentu charakterizace vztahu buněčné viability a koncentrace GSH. Z grafu 5 je patrné, že u expozice 3% DMSO došlo u A549 ke snížení hladiny GSH na $79\pm 5\%$ a snížení buněčné viability na $87\pm 8\%$ již po jedné hodině. V průběhu působení DMSO na buňky po dobu 24 hod hladina GSH neklesla pod 68 % a viabilita se snížila maximálně na 75 %. V rámci odchylek, které jsou zobrazeny v grafu 5, vidíme, že se hladina koncentrace GSH i buněčná viabilita pohybují téměř na stejné úrovni.



Graf 5: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – A549 buňky. DMSO (3 %). Kontrola = 100 %; doba inkubace 1-24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 4-16).

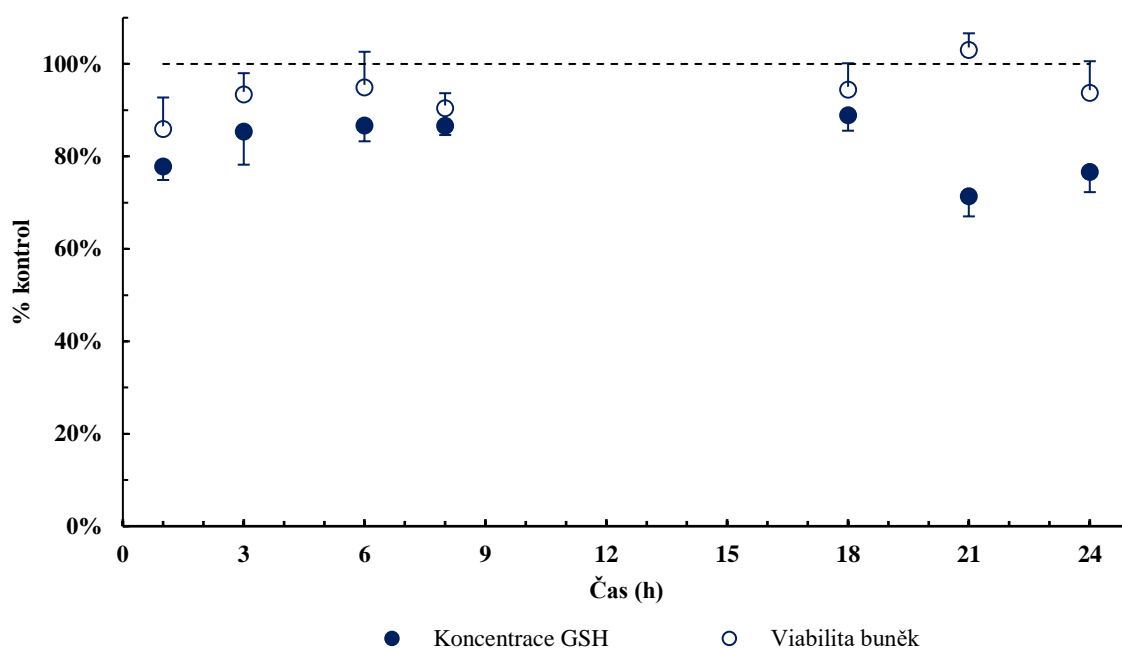
Buňky Jurkat vykazovaly opačný pokles koncentrace GSH a buněčné viability než tomu bylo u buněk A549. Tento efekt je patrný z grafu 6. Na počátku inkubace až do 8 hodin působení 3% DMSO jsou koncentrace GSH a buněčná viabilita téměř na stejné úrovni. Po dosažení inkubace 18 hodin dochází nejprve u buněk Jurkat k redukcí buněčné viability a poté koncentrace GSH. Následně po 24hodinové expozici klesá buněčná viabilita na 24 ± 6 % a hladina GSH na 31 ± 17 %. Při porovnání buněk Jurkat s A549 je vidět, že po 24 hodinách působení 3% DMSO došlo u buněk Jurkat k většímu poklesu GSH i buněčné viability oproti buňkám A549. Buněčná linie Jurkat je tedy k DMSO citlivější a snížení buněčné viability předchází poklesu hladiny GSH. Buňky A549 vykazují efekt opačný.



Graf 6: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – Jurkat buňky. DMSO (3 %). Kontrola = 100 %; doba inkubace 1-24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 4-24).

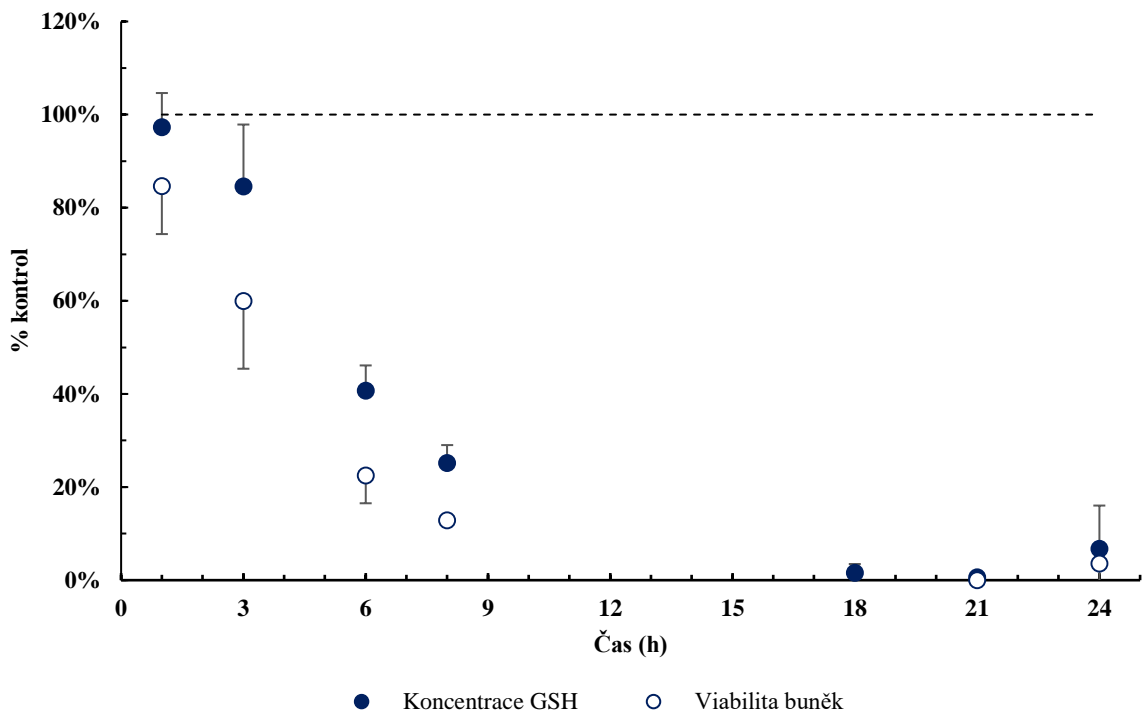
4.2.2 Toxicita tert-butylhydroperoxidu

Stejně tak jako DMSO i tBHP účinkuje na buňky A549 podobně. Snížená hladina GSH zde předchází snížení buněčné viability. Opět lze ale vidět, že inkubace buněk A549 s 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP způsobuje nižší cytotoxicitu než u buněk Jurkat. Tento efekt je patrný z grafu 7, kde koncentrace GSH neklesla pod 70 %. Také buněčná viabilita neklesla na méně jak 90 % kontrolních hodnot ani po 24hodinové expozici 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP.



Graf 7: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – A549 buňky. tBHP (50 $\mu\text{mol/l}$). Kontrola = 100 %; doba inkubace 1-24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr \pm SD (n = 4-16).

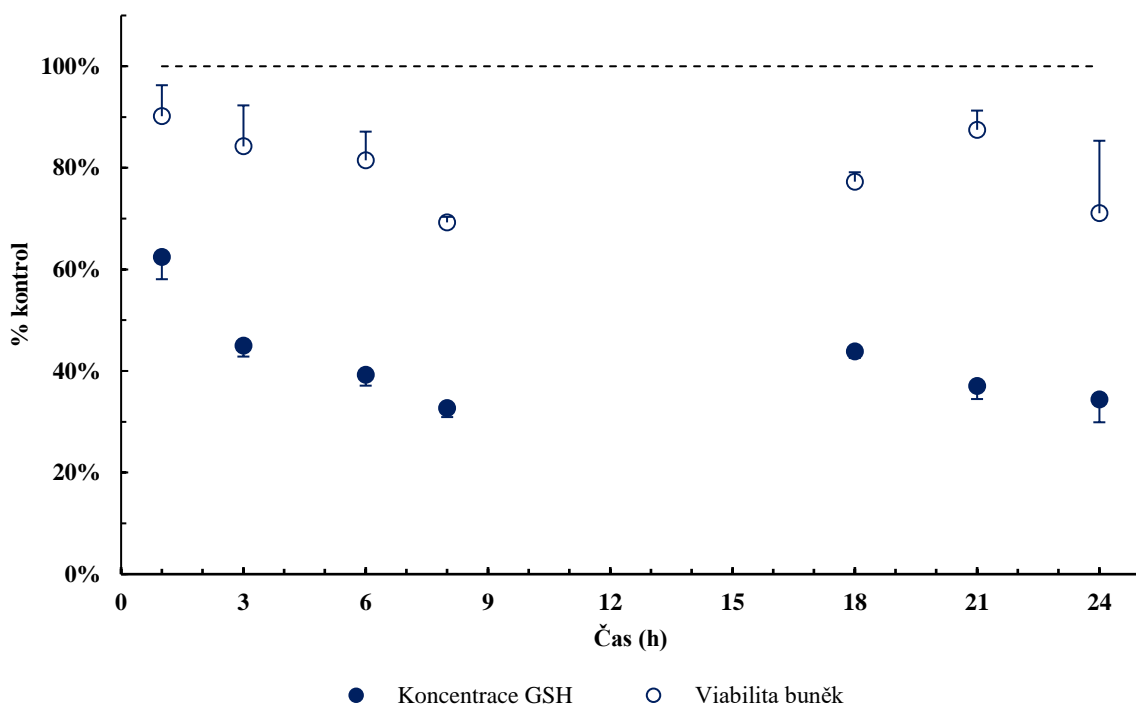
Buňky Jurkat inkubované s 3% DMSO vykazovaly k buňkám A549 opačný trend poklesu koncentrace GSH a viability. Tento rozdíl v poklesu hladiny GSH a buněčné viability byl zaznamenán i u buněk Jurkat inkubovaných s 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP. Zde opět pokles buněčné viability předchází poklesu koncentrace GSH. Rozdílem však je, že pokles hladiny GSH předchází redukci viability již od první hodiny expozice. Z grafu 8 můžeme vidět, že v osmé hodině klesla koncentrace GSH pod 30 % a buněčná viabilita již na 13 %. Následně po 18hodinové expozici jsou všechny buňky Jurkat nejspíše mrtvé.



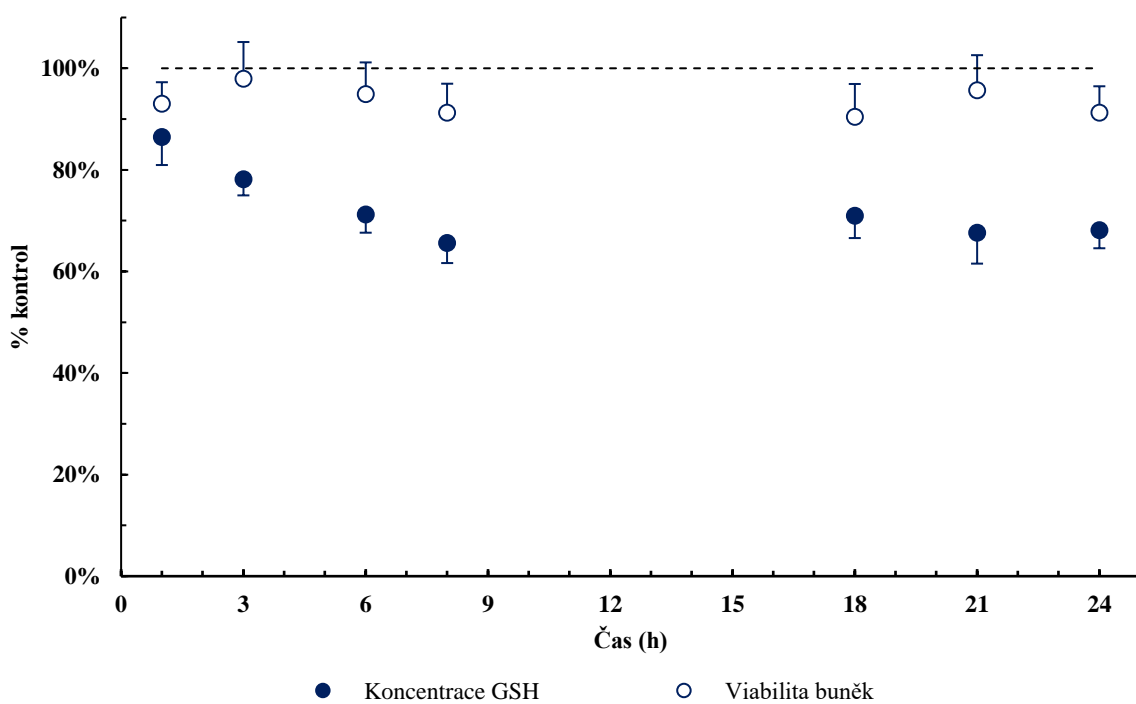
Graf 8: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – Jurkat buňky. tBHP (50 $\mu\text{mol/l}$). Kontrola = 100 %; doba inkubace 1-24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorimetrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr \pm SD (n = 4-24).

4.2.3 Toxicita diethylmaleátu

Byly využity dvě koncentrace diethylmaleátu. Z grafu 9 a grafu 10 si můžeme povšimnout vztahu viability buněk A549 a koncentrace GSH za působení 0,1 mmol/l a 0,5 mmol/l DEM. U obou koncentrací byl prokázán podobný trend poklesu hladiny GSH a buněčné viability. Rozdíl byl nalezen pouze u vyšší koncentrace DEM, kdy dochází k lepší účinnosti. I přes to ale stále více jak 60 % buněk vykazuje svou životaschopnost. Koncentrace GSH je pak ve většině časových limitů poloviční v porovnání s viabilitou. Zároveň úbytek hladiny GSH předchází ztrátě buněčné viability. Tento trend je způsoben schopností DEM vychytávat GSH, čímž tedy jeho hladiny ve vztahu k viabilitě značně klesly. U expozice 0,1 mmol/l DEM, ani 0,5 mmol/l DEM neklesla koncentrace GSH pod 30 %.



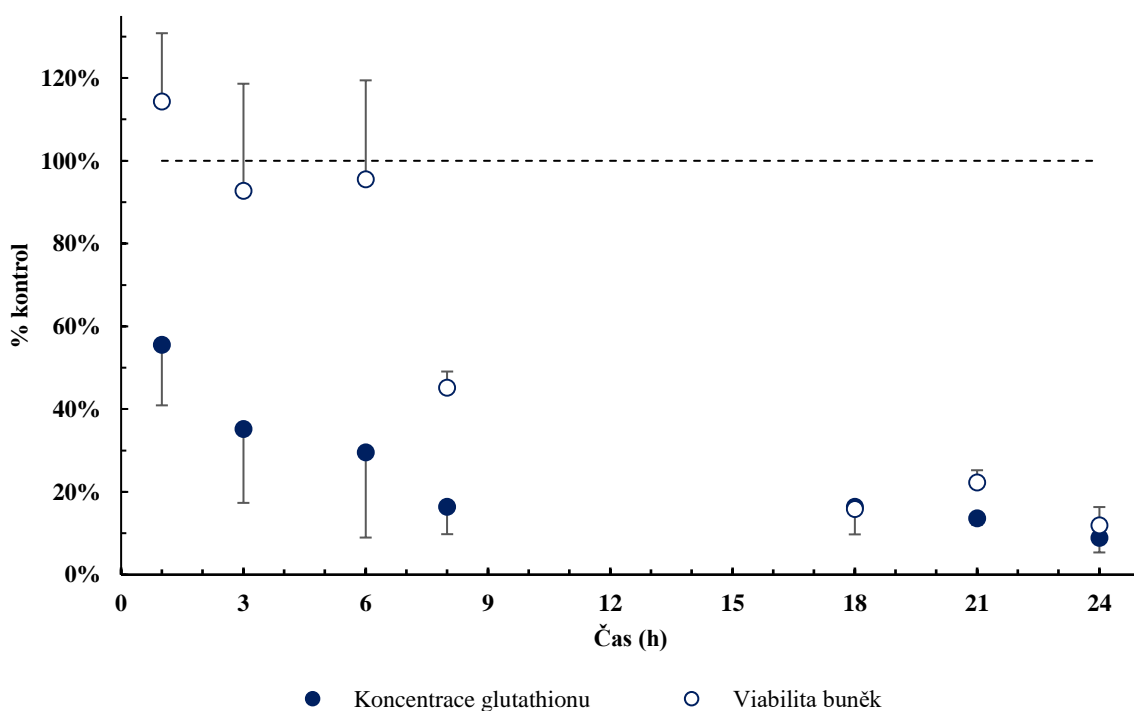
Graf 9: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – A549 buňky. DEM (0,5 mmol/l). Kontrola = 100 %; doba inkubace 1-24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 4-16).



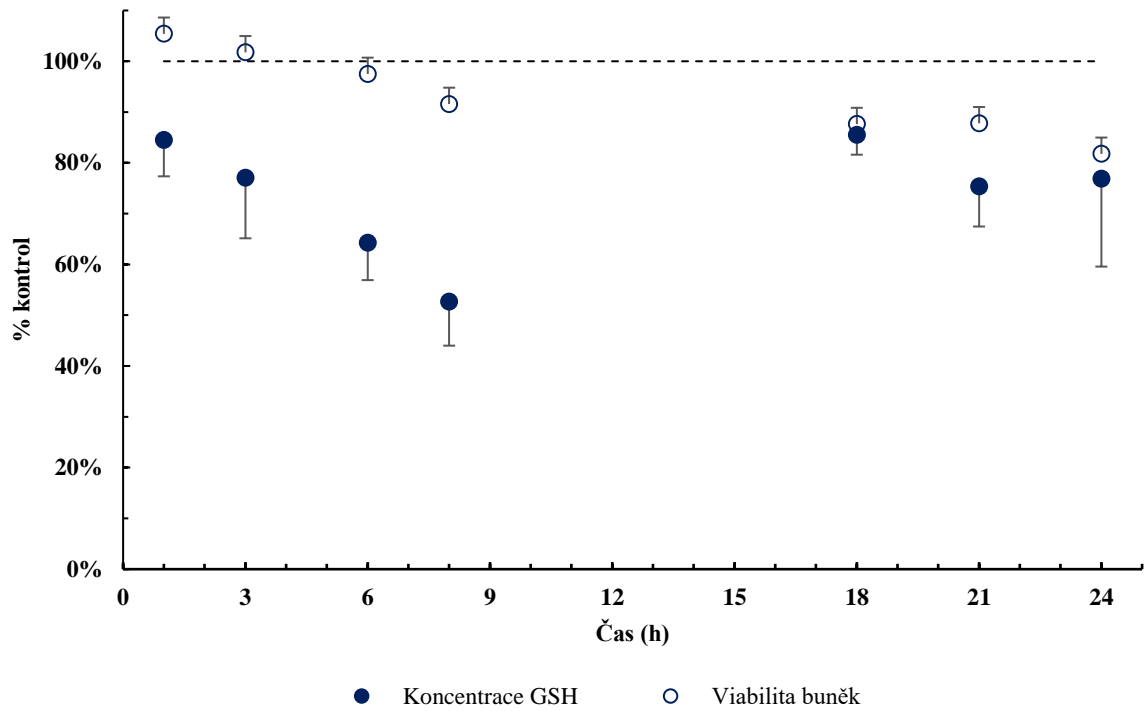
Graf 10: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – A549 buňky. DEM (0,1 mmol/l). Kontrola = 100 %; doba inkubace 1-24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 4-16).

DEM na buňky Jurkat působí ve stejném trendu jako je tomu u A549. Deplece GSH předchází poklesu buněčné viability. Buňky Jurkat a A549 se však liší mírou deplece GSH a poklesu viability. Zatímco se u A549 koncentrace GSH nesnížila pod 30 % ani po inkubaci s koncentrací 0,5 mmol/l DEM, buňky Jurkat vykazují značný rozdíl v míře deplece GSH. Z grafu 11 se můžeme přesvědčit, že 0,5 mmol/l DEM indukuje pokles hladiny GSH u buněk Jurkat pod 30 % a to již v osmé hodině expozice. Po 24 hodinách pak následuje snížení buněčné viability až na 12 %. Stejný trend redukce hladiny GSH a buněčné viability můžeme vidět i v grafu 12. K redukci hladiny GSH a buněčné viability však došlo v menší míře. Je tomu z důvodu využití nižší koncentrace (0,1 mmol/l DEM).

Porovnání s modelovými experimenty, kde byla využita koncentrace 0,5 mmol/l DEM, došlo po 24 hodinách inkubace buněk k úplné ztrátě koncentrace GSH. Z toho důvodu vymizela i buněčná viabilita (graf 4). U obou buněčných linií bylo prokázáno, že DEM je schopen vychytávat GSH. Rozdílem však jsou jeho použité koncentrace, které by nejspíše u buněčné linie A549 bylo třeba navýšit. Trend poklesu hladin GSH a buněčné viability je ale u obou buněčných linií velmi podobný.



Graf 11: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – Jurkat buňky. DEM (0,5 mmol/l). Kontrola = 100 %; doba inkubace 1-24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 4-24).



Graf 12: Vztah viability buněk a koncentrace glutathionu – Jurkat buňky. DEM (0,1 mmol/l). Kontrola = 100 %; doba inkubace 1-24 hod.; viabilita buněk - WST-1 test (440 nm); koncentrace GSH - fluorometrické stanovení (EX/EM = 394/490 nm). Průměr ± SD (n = 4-24).

5 DISKUZE

Vztah koncentrace glutathionu a buněčné viability je v dnešní době čím dál více diskutovaným tématem. Glutathion je možné nalézt v každé tělní buňce a vyskytuje se přirozeně v mnoha živých organismech. Zastává funkci antioxidantu, čímž detoxifikuje xenobiotika, udržuje průběh buněčného cyklu, podílí se na apoptóze a dalších procesech. Pro sledování těchto dějů *in vitro* se využívají různé izolované buněčné kultury. Pro experimenty *in vitro* se využívá uměle připravených médií, atmosféry s vyšším tlakem kyslíku, než je tomu u *in vivo* a dále zde nejsou přítomny další typy buněk. Ke stanovení glutathionu se dnes využívají spektrofotometrické metody a dále i spektrofluorimetrické metody. Spektrofluorimetrické metody mají oproti spektrometrickým vyšší specifičnost a citlivost. Ke stanovení lze využívat i elektrochemické a separační metody. Díky těmto metodám je možné glutathion stanovit nejen u kultivovaných buněčných kultur *in vitro*, ale i v samotném biologickém materiálu.

Testování toxicity některých toxinů u rakovinových buněk a stanovení hladiny GSH může být dobrým ukazatelem pro budoucí onkologickou léčbu. Pro testování cytotoxicity jsou využívány dané *in vitro* testy. Zejména sem patří metody kolorimetrické, jako MTT test, XTT či WST-1 test, ale i testy s využitím barviv, jako jsou neutrální červeň či trypanová modř. MTT test pracuje na principu měření metabolické aktivity buněk, kdy dochází k redukci tetrazoliové soli MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan. Na stejném principu pracuje i XTT test, kdy je redukován 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilid opět na formazan. U testu WST-1 je přeměňováno činidlo WST. U všech těchto metod dochází k přeměně tetrazoliové soli na formazan za pomoci mitochondriálních dehydrogenáz. Poté je pomocí spektrofotometrického stanovení měřena hodnota absorbance (**Halberstadt et Emerich, 2011; Kand'ár, 2016; Nýdlová et al., 2014; Pastore et al., 2003; Präbst et al., 2017**).

V této diplomové práci byly využity fluorimetrické a spektrometrické metody. Díky nim byly stanoveny koncentrace GSH a viabilita zkoumaných buněk. Pomocí těchto výsledků jsme se snažili zjistit, zda některé toxiny působící na vybrané buňky mohou způsobovat pokles koncentrace GSH v buňce, který předchází redukci viability, či tomu může být naopak. Nejprve byly provedeny modelové experimenty s využitím více koncentrací jednotlivých toxinů, jež byly inkubovány s buňkami po dobu 3 a 24 hodin. Na základě výsledků těchto experimentů byly dále použity již konkrétní koncentrace dané toxické látky. Vybrány byly takové toxiny, jejichž hodnoty koncentrace GSH a buněčné viability neklesly na 0 % ani po

24 hodinách inkubace u experimentů modelového stanovení. Takový pokles dříve jak ve 24. hodině by byl nežádoucí, protože by nebylo možné zachytit změny hladin GSH a buněčné viability v jednotlivých časových intervalech detailnějšího experimentu.

Prvním toxinem využitým pro zkoumání vztahu buněčné viability a koncentrace GSH byla cisplatina. U linií A549 a Jurkat byly využity koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$ CDDP. U buněk A549 došlo již po 3hodinové expozici k poklesu buněčné viability na 0 % u obou využitých koncentrací. U linie Jurkat přetrvávala viabilita na cca 90 %. Zajímavé je, že v experimentu, který provedl tým doktora Shi došlo po 24hodinové expozici 80 $\mu\text{mol/l}$ CDDP u buněk A549 k poklesu buněčné viability na 10 % (**Shi et al., 2016**). Tým doktora Shi však pro stanovení buněčné viability využil MTT test (**Shi et al., 2016**). U námi provedeného experimentu byl využit test WST-1, čímž se mohou výsledky lišit. Nadále tým doktora Shi použil buněčnou suspenzi 8 tis. buněk A549 na jamku, ale námi použitá suspenze byla připravena z 15 tis. buněk A549 na jamku (**Shi et al., 2016**). Po srovnání studie týmu doktora Shi s našimi experimenty lze usuzovat, že výsledky, které vykazují buňky A549 si jsou velmi blízké.

Druhým z využitých toxinů byl dimethylsulfoxid. V rámci několika studií bylo zjištěno, že DMSO kromě svých funkcí rozpouštědla též vykazuje protinádorové účinky. Tento efekt může být důsledkem jeho přímých cytotoxických účinků (**Hoang et al., 2010; Jiang et al., 2016; Jovanovic et al., 2016; Koiri et Trigun, 2011**). Mezi buňkami A549 a Jurkat inkubovanými s 3% DMSO došlo k rozdílným poklesům hladin GSH a buněčné viability. U buněk A549 bylo zjištěno, že pokles hladiny GSH předchází poklesu buněčné viability, ale u buněk Jurkat je tomu naopak. Ve studii Dr. Hajighasema a jeho kolektivu (**2017**) byla prokázána cytotoxicita DMSO u buněk Jurkat v koncentracích vyšších jak 2% DMSO po inkubaci 24 hodin. Viabilita buněk Jurkat u expozice 2% DMSO poklesla na 63 % a u 5% DMSO na 35 %. Zároveň autoři provedli pokus i u jiných leukemických buněčných linií, kde nebyl prokázán žádný významný rozdíl v cytotoxicitě DMSO (**Hajighasemi et Tajik, 2017**). Vzhledem k výsledkům této studie a jimi použitých koncentrací 2% a 5% DMSO lze předpokládat, že u námi použité koncentrace 3% DMSO se bude viabilita buněk Jurkat pohybovat mezi 35-65 %. Viabilita buněk Jurkat u námi použitého 3% DMSO byla stanovena na 24 %. Hodnota výsledku může být ovlivněna rozdílností použitého, kdy dr. Hajighasemi pro stanovení viability využil TB test (**Hajighasemi et Tajik, 2017**), zatímco pro naše experimenty byl využit test WST-1. Z porovnání výsledků Dr. Hajighasemi a jeho týmu s našimi experimenty na buňkách Jurkat vidíme, že si jsou výsledky velmi blízké. Buňky A549 však po ovlivnění 3% DMSO vykazovaly značný rozdíl

v porovnání s buňkami Jurkat. Za celou dobu expozice 3% DMSO totiž koncentrace GSH u buněk A549 neklesla pod 68 % a buněčná viabilita byla zredukována na pouhých 75 %. Koncentrace GSH a viabilita buněk se tedy pohybují téměř na stejné úrovni. I přes to ale můžeme potvrdit nález autorů, že leukemické buňky vykazují cytotoxicitu u koncentrací vyšších jak 2 % DMSO (**Hajjhasemi et Tajik, 2017**). Závěrem lze tedy říci, že na rozdíl od buněk Jurkat nejsou A549 k DMSO citlivé. Může tomu být z důvodu jejich rozdílného charakteru, metabolismu a zároveň možné získané rezistence vůči DMSO.

Dalším využitým toxinem byl tert-butyhydroperoxid. U buněk A549 exponovaných 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP jsme prokázali, že snížená hladina GSH předchází redukci viability buněk. K víceméně stejným výsledkům dospěla i studie profesora Tobwala a jeho týmu, kde po 24hodinové expozici 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP poklesla viabilita buněk na polovinu, zatímco hladina GSH se pohybovala již na 1/3 (**Tobwala et al., 2014**). Po 24hodinové expozici došlo u našeho experimentu k poklesu viability cca na 90 %. Tým profesora Tobwala stanovil po 24 hodinách pokles viability již na 50 % (**Tobwala et al., 2014**). Tento rozdíl může být způsoben odlišným počtem buněk inkubovaných v jedné jamce 96jamkové destičky. U námi provedených experimentů byla přidávána suspenze 15 tis. buněk na jamku, kdežto u kolektivní studie profesora Tobwala byla připravena buněčná suspenze 12,5 tis. buněk na jamku. I přes mírný rozdíl v počtu nasazených buněk však mohlo dojít k rozdílům v přichycení buněk ke dnu 96jamkové destičky. Denzita 12,5 tis. buněk na jamku nasazená týmem profesora Tobwala nemusela být úplně optimální (**Tobwala et al., 2014**). Zároveň u této studie byla buněčná viabilita hodnocena pomocí Calcein AM assay, oproti tomu naše hodnocení viability proběhlo za pomoci testu WST-1 (**Tobwala et al., 2014**). Jednou z reakcí tert-butyhydroperoxidu je oxidace thiolové skupiny, kterou GSH obsahuje. Tím oslabuje buňku, která se pak nemůže bránit oxidačnímu stresu. Tento mechanismus vysvětluje pokles hladiny GSH u buněk A549 i Jurkat. Je ale zřejmé, že i přes vysvětlení poklesu GSH dochází u buněk Jurkat k jinému principu působení tBHP. Je tomu z důvodu předcházejícího poklesu viability buněk a následnému poklesu hladiny GSH, což buňky A549 vykazují opačně (**Leverve, 2003**). Doc. Kučera dle jeho výzkumu tvrdí, že u NH buněk již po 30minutové expozici 250 $\mu\text{mol/l}$ tBHP klesla koncentrace GSH na 80 %. U SH buněk poklesla koncentrace GSH na 65 % při expozici stejné koncentrace toxinu (**Kučera, 2014**). V jeho práci byly ovlivněny hepatocyty a hladina GSH byla stanovena pomocí spektrofotometrie založené na reakci GSH a *o*-ftalaldehydu (**Kučera, 2014**). V naší práci vykazují buňky A549 hladinu GSH 78 % po hodinové expozici 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP. Nadále se ale hladina GSH drží téměř na stejné úrovni. Oproti tomu buňky Jurkat vykazují 95% hladinu GSH po hodinové

expozici a tato hladina dále klesá. Procentní rozdíl hladiny GSH v naší práci s porovnáním studie docenta Kučery může být způsoben rozdílnou koncentrací tBHP (**Kučera, 2014**). I přes lišící se metodu stanovení, rozdílnou časovou expozici a buněčnou linii lze potvrdit, že prvotní mechanismus působení tBHP na buňky je stejný. Nadále ve studii doc. Kučery došlo po hodinové inkubaci SH buněk s 10 $\mu\text{mol/l}$ tBHP k poklesu buněčné viability na 50 % a inkubaci se 100 $\mu\text{mol/l}$ tBHP na viabilitu 16 % (**Kučera, 2014**). V naší práci vykazovaly buňky A549 po inkubaci s 50 $\mu\text{mol/l}$ tBHP 88% viabilitu a buňky Jurkat 85% viabilitu. I přes to, že v našem experimentu i studii doc. Kučery, byl pro stanovení viability využit WST-1 test, výsledky jsou rozdílné (**Kučera, 2014**). Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben hepatotoxicitou tBHP.

Posledním využitým toxinem byl diethylmaleát. Vzhledem k literatuře a vyhledaným studiím je zřejmé, že DEM způsobuje vychytávání glutathionu, čímž způsobuje jeho depleci. U modelového experimentu ovlivnění buněk A549 s 2 mmol/l DEM došlo po 3 hodinách inkubace k úplnému vyčerpání GSH. Vyčerpání koncentrace GSH bylo doprovázeno buněčnou smrtí. Zde nastala hypotéza, že pokles hladiny GSH pod 30 % by mohl být pro buňky smrtelný. Některé studie totiž tvrdí, že koncentrace GSH je důležitým faktorem jak citlivosti na cytostatika, tak pro předpoklad poklesu buněčné viability (**Aquilano et al., 2014**). U buněk Jurkat došlo k poklesu hladiny GSH na 8 % již po 3hodinové expozici 0,5 mmol/l DEM. Tím jsme tedy předpokládali, že po 24hodinovém působení 0,5 mmol/l DEM na buňky Jurkat dojde k poklesu buněčné viability z 67 % téměř na nulu. Tento efekt byl také prokázán a hypotéza byla potvrzena i u experimentu s využitím širších časových limitů. Také studie Rutherfordové a Dr. Giesege provedená na buňkách U937 prokazuje naši hypotézu (**Rutherford et Giesege, 2011**). Výsledkem experimentu Rutherfordové a Dr. Giesege bylo, že po 6hodinovém působení 0,25 mg/ml oxLDL došlo k poklesu koncentrace GSH téměř na 0 %. Buňky však ještě v 6. hodině vykazovaly viabilitu na přibližně 25 %, ale po 9hodinové expozici byly již všechny mrtvé (**Rutherford et Giesege, 2011**).

U námi provedených experimentů je ve většině časových expozicích DEM u buněk A549 i Jurkat hladina GSH v porovnání s buněčnou viabilitou znatelně nižší. To je způsobeno schopností u DEM vychytávat glutathion. Hladina GSH je u buněk Jurkat na nižší úrovni, než je tomu u buněk A549. Zároveň je takto snížena i buněčná viabilita, což prokazuje větší citlivost buněk Jurkat na působení DEM. V experimentu provedeném týmem Dr. Kaura byla stanovena koncentrace GSH a viabilita buněk po 12hodinové expozici 3 mmol/l DEM za pomoci testu MTT (**Kaur et al., 2006**). Pro stanovení byly využity neurony a astrocyty. V této práci po 12hodinové expozici vykazovaly neuronální buňky 80% viabilitu, koncentrace

GSH byla 63 %. U astrocytů byla hodnota viability a koncentrace GSH na stejné úrovni 85 % (**Kaur et al., 2006**). V naší práci u buněk A549 po expozici koncentrací 0,5 mmol/l DEM byly hodnoty viability 69 % po inkubaci 8 hodin a 77 % po inkubaci 18 hodin. Ve 12. hodině lze předpokládat, že se hodnoty viability pohybovaly přibližně na 73 %. Oproti tomu hodnoty koncentrace GSH byly proti viabilitě v 8. a 18. hodině poloviční, což by se pravděpodobně objevilo i ve 12. hodině expozice. Z toho můžeme soudit, že jsou buď buňky A549 citlivější než neurony či astrocyty, nebo je nižší koncentrace v tomto případě účinnější. Stejně působil 0,5 mmol/l DEM na buňky Jurkat. Rozdíl byl pouze v hodnotách GSH, které již od 8. hodiny zůstaly téměř nezměněny, zatímco viabilita buněk klesla ještě na polovinu.

Díky častým experimentům s využitím DEM bylo například kolektivem Dr. Caseye prokázáno, že buňky HepG2, které byly vystaveny účinku 1,25 mmol/l DEM, vykazovaly rychlý a trvalý pokles hladiny GSH (**Casey et al., 2002**). Již po hodině expozice poklesla hladina GSH na 39 % (**Casey et al., 2002**). U námi využití koncentrace 0,5 mmol/l DEM byl po jedné hodině působení stanoven pokles GSH na 62 % u buněk A549 a 56 % u buněk Jurkat. I přes námi využitou koncentraci, která oproti studii Dr. Caseye byla více jak poloviční, působení DEM vykazuje stejný mechanismus (**Casey et al., 2002**). Zároveň ve studii Dr. Caseye bylo stanoveno, že hladiny GSSG vzrostly již po 12 hodinách a do 24 hodin zůstaly zvýšeny. Tím hladiny GSH po 24 hodinách inkubace klesly téměř na nulu (**Casey et al., 2002**). Tento průkaz souhlasí i s naším stanovením GSH u buněk Jurkat. Zde hladina GSH po 24 hodinách klesla také téměř k nule. Ovšem u buněk A549 se koncentrace GSH držela na 34 %. I přes to ale hladina GSH klesala. Pokud vezmeme v potaz znalosti o působení DEM, lze předpokládat, že při využití vyšší koncentrace by hladina GSH po 24 hodinách klesla také na nulu i u buněk A549. Důkazem jsou i výsledky z našeho modelového experimentu, kdy při použití 2 mmol/l DEM u buněk A549 došlo k poklesu hladiny GSH na 0 %. Tým Dr. Caseye se též zabýval stanovením viability buněk HepG2 (**Casey et al., 2002**). Stanovená viabilita byla po 6hodinové expozici 1,25 mmol/l DEM snížena na 70 % (**Casey et al., 2002**). Při námi provedené 6hodinové expozici 0,5 mmol/l DEM byla u buněk A549 stanovena viabilita na 81 % a u buněk Jurkat na 95 %. Toto porovnání v rámci rozdílně použitých koncentrací opět souhlasí. Je tomu i z důvodu, že buněčná viabilita se snížila na 69 % u buněk A549 až po expozici 0,5 mmol/l DEM po dobu 8 hodin. Ve stejném čase byla u buněk Jurkat viabilita na hodnotě 45 %. Vidíme tedy, že stejný efekt působení DEM se v porovnání s experimentem týmu Dr. Caseye dostavil o dvě hodiny později (**Casey et al., 2002**). To může být způsobeno právě využitím nižší koncentrace, ale i rozdílným druhem buněčné linie. Dr. Casey společně s jeho týmem tvrdí, že po 24hodinové expozici 1,25 mmol/l DEM jsou všechny buňky HepG2

mrtvé (**Casey et al., 2002**). Tomuto zjištění u nás odpovídají buňky Jurkat po 24hodinovém ovlivnění 0,5 mmol/l DEM a buňky A549 po ovlivnění 2 mmol/l DEM.

Podobným mechanismem, jako působí DEM na buňky, účinkuje i BSO. Některé studie tvrdí, že DEM způsobuje větší cytotoxicitu. Ve studii Dr. Zhanga a jeho týmu byly využity buňky A549, na které působily různé koncentrace BSO (**Zhang et al., 2018**). Po 24hodinové expozici 0,1 mmol/l BSO došlo k poklesu buněčné viability u buněk A549 na 90 %. U námi použité koncentrace 0,1 mmol/l DEM klesla viabilita buněk A549 také po 24 hodinách na 91 %. U využití buněčné linie Jurkat tento pokles činil 82 %. Zde vidíme, že v koncentraci 0,1 mmol/l působí BSO a DEM obdobně. Ovšem rozdíl nastává při navýšení koncentrace. Kolektiv Dr. Zhanga prokázal, že při koncentraci 0,4 mmol/l BSO klesla po 24 hodinách buněčná viabilita též přibližně na 90 % (**Zhang et al., 2018**). V námi provedeném experimentu, kde byla využita koncentrace 0,5 mmol/l DEM však buněčná viabilita po 24 hodinách klesla již na 71 % u buněk A549 a na 12 % u buněk Jurkat. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že DEM skutečně může způsobovat větší cytotoxicitu oproti BSO.

Celkový rozdíl vztahu hladiny GSH a buněčné viability u buněk A549 a Jurkat v rámci námi využitých toxinů lze vysvětlit následující hypotézou. Buněčné linie jsou totiž rozdílného charakteru, kdy buňky A549 jsou adherentní, oproti tomu Jurkat buňky jsou suspenzní. Díky tomuto rozdílu může docházet i k odlišnému působení toxinů na tyto buňky. Zároveň je možné, že každá buněčná linie obsahuje jiné množství hladiny GSH, čímž lze i vysvětlit procentní rozdíl působení DEM na buňky A549 a Jurkat a tím i jejich procentní rozdíl v poklesu buněčné viability při působení stejnou koncentrací.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo využít buněčné linie A549 a Jurkat pro charakterizaci vztahu buněčné viability a deplece GSH při působení vybraných toxinů. Byly jimi CDDP, DEM, DMSO a tBHP. Dle literatury byla u buněk inkubovaných s DEM předpokládána značná redukce GSH. Deplece GSH byla předpokládána i u expozičních ostatních uvedených toxinů, ale v menší míře, než je tomu u inkubace buněk s DEM. Provedenými experimenty jsme potvrdili v literatuře uvedené mechanismy působení toxinů na buňky. Překvapujícím výsledkem však byla značná rozdílnost mezi buňkami A549 a Jurkat v reakci na jednotlivé toxiny. Lze říci, že u buněk Jurkat byla prokázána vysoká citlivost k uvedeným toxinům, u buněk A549 tomu tak nebylo. Zároveň trend poklesu hladiny GSH a buněčné viability byl při expozici DEM stejný u obou buněčných linií. Výjimkou byl u buněk Jurkat pokles buněčné viability předcházející poklesu koncentrace GSH při inkubaci s DMSO a tBHP. Buňky A549 vykazovaly u působení DMSO a tBHP pokles hladiny GSH předcházející poklesu buněčné viability. Závěrem lze tedy shrnout, že buňky Jurkat jsou oproti buňkám A549 více citlivé. Zároveň GSH hraje významnou roli u obou buněčných linií při dispozici buněk ke smrti.

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. AITKEN R. J. a ROMAN S. D.: Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2008, 1, s. 15-24.
2. AMPTOULACH S. a TSAVARIS N.: Neurotoxicity Caused by the Treatment with Platinum Analogues. *Chemotherapy Research and Practice*, 2011, 2011, s. 1-5.
3. AQUILANO K., BALDELLI S., CIRIOLO M. R.: Glutathione: new roles in redox signaling for and old antioxidant. *Front Pharmacol*, 2014, 5, s. 196.
4. ASHKENAZI A. a SALVESEN G.: Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2014, 30, s. 20.1.-20.20.
5. ASHTIANI H. R. A., BAKHSHANDI A. K., et al.: Glutathione, cell proliferation and differentiation. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10, s. 6348-6363.
6. BALENDIRAN G. K., DABUR R., FRASER D.: The role of glutathione in cancer. *Cell Biochemistry and Function*, 2004, 22, s. 343-352.
7. BARER M. R. a HARWOOD C. R.: Bacterial Viability and Culturability. In: Poole R. K. (ed.), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, 1999, 41, s. 93-137.
8. BLAIR I. A.: Endogenous glutathione adducts. *Curr Drug Metabolism*, 2006, 7, s. 853-872.
9. BROZOVIC A., AMBRIOVIC-RISTOV A., OSMAK M.: The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology*, 2010, 40, s. 347-359.
10. CAMERA E., PICARDO M.: Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chromatography B*, 2002, 781, s. 181-206.
11. CAPRIOTTI K. a CAPRIOTTI J. A.: Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 2012, 5, s. 24-6.
12. CARPENTER D. P.: Reputation and power: organizational image and pharmaceutical regulation at the FDA. *Princeton University Press*. 2010, s. 526. ISBN: 9781400835119.
13. CASEY W., ANDERSON S., et al.: Transcriptional and physiological responses of HepG2 cells exposed to diethyl maleate. *Time course analysis*, 2002, 8, s. 115-122.

14. CELIS J. E.: Cell biology: A laboratory handbook. *Elsevier Academic*. 2006. ISBN 9780121647308.
15. CEPEDA V., FUERTES M. A., et al.: Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2007, 7, s. 3-18.
16. CIRCU M.L. a AW T. Y.: Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1823, s. 1767-1777.
17. ČAPEK J., HAUSCHKE M., et al.: Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2017, 88, s. 40-45.
18. DALTON T. P., CHEN Y., et al.: Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 37, s. 1511-1126.
19. DEGTEREV A., HUANG Z., et al.: Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 2005, 1, s. 112-119.
20. DELBRIDGE A. a STRASSER A.: The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22, s. 1071-1080.
21. DUDZINSKA E., GRYZINSKA M., et al.: Oxidative stress and effect of treatment on the oxidation product decomposition processes in IBD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 4, s. 1-7.
22. EISENBERG-LERNER A., BIALIK S., et al.: Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation*, 2009, 16, s. 966.
23. FILIPSKI K. K., MATHIJSEN R. H., et al.: Contribution of Organic Cation Transporter 2 (OCT2) to Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Clinical Pharmacology*, 2009, 4, s. 396-402.
24. FLOREA A. M. a BÜSSELBERG D.: Cancers. *Basel*, 2011, 3, s. 1351-1371.
25. FORMAN H. J., ZHANG H., RINNA A.: Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 2009, 30, s. 1-12.
26. FRANCO R. a CIDLOWSKI J.A.: SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is

- necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *The Journal Biological Chemistry*, 2006, 281, s. 29542-29557.
27. GALLUZZI L. a VITALE I.: Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 2018, 25, s. 486-541.
 28. GANGULI D., KUMAR CH., BACHHAWAT A. K.: The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2007, 175, s. 1137-1151.
 29. GAUBIN Y., VAISSADE F., et al.: Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1495, s. 4-13.
 30. GHIBELLI L., COPPOLA S., et al.: Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *The FASEB Journal*, 1999, 13, s. 2031-2036.
 31. GOODMAN L. S, BRUNTON L. L., et al.: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of Therapeutics. *McGraw-Hill*, 2011, 12, s. 1687-1690.
 32. GYRD-HANSEN M. a MEIER P.: IAPs: From caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2010, 10, s. 561-574.
 33. HAIDARA K., MOREL I., et al.: Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1542, s. 173-185.
 34. HAJIGHASEMI F. a TAJIK S.: Assessment of Cytotoxicity of Dimethyl Sulfoxide in Human Hematopoietic Tumor Cell Lines. *IJBC*, 2017, 9, s. 48-53.
 35. HALBERSTADT C. R. a EMERICH D. V.: Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic. *Academic Press*. 2011, s. 696. ISBN: 9780080469041.
 36. HARRISON D., GRIENGLING K.K., et al.: Role of oxidative stress in atherosclerosis. *American Journal of Cardiology*, 2003, 91, s. 7-11 A.
 37. HOANG B. X., LEVINE S. A., et al.: Dimethyl sulfoxide as an excitatory modulator and its possible role in cancer pain management. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 2010, 9, s. 306-312.
 38. HOHENBERGE W., JUNGINGER T., SCHLAG P. M.: Chirurgická onkologie. *Grada Publishing*. 2005. ISBN 80-247-0720-9.
 39. HOLEČEK V.: Volné radikály a antioxydanty. *Celostní medicína* [online]. Celostní medicína, 2005, [cit. 2019-01-31]. Dostupné z:

<https://www.celostnimedica.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm>

40. HUANG D., OU B., PRIOR R. L.: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, s. 1854-1856.
41. CHIPUK J. E., KUWANA T., et al.: Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 2004, 303, s. 1010-1014.
42. IGHODARO O. M. a AKINLOYE O. A.: First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 2017, 54, s. 287-293.
43. JANG B. C., PARK J. G., et al.: Sanguinarine induces apoptosis in A549 human lung cancer cells primarily via cellular glutathione depletion. *Toxicology in Vitro*, 2009, 23, s. 281-287.
44. JIANG Z., ZHANG H., et al.: Altered Hepa1-6 cells by dimethyl sulfoxide (DMSO)-treatment induce anti-tumor immunity in vivo. *Oncotarget*, 2016, 7, s. 9340-9352.
45. JOHANSEN T. a LAMARK T.: Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 2011, 7, s. 279-296.
46. JOVANOVIĆ K. K., GLIGORIJEVIĆ N., et al.: Anticancer activity of two ruthenium (II)-DMSO-chalcone complexes: Comparison of cytotoxic, pro-apoptotic and antimetastatic potential. *Journal of the Balkan union of Oncology*, 2016, 21, s. 482-490.
47. KALAČ P.: Funkční potraviny, kroky ke zdraví. *Dona*. 2003, s. 130. ISBN: 80-7322-029-6
48. KALININA E. V., CHERNOV N. N., NOVICHKOVA M. D.: Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. *Biochemistry*, 2014, 79, s. 1562-1583.
49. KAMENCIC H., LYON A., et al.: Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. *Analytical Biochemistry*, 2000, 286, s. 35-37.
50. KANĎÁR R.: Stanovení glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích. *Chemické listy*, 2016, 110, s. 754-760.
51. KAUR H., KUMAR C., et al.: Dug1p Is a Cys-Gly Peptidase of the gamma-Glutamyl Cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and Represents a Novel Family of Cys-Gly Peptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, s. 14493-14502.

52. KAUR P., ASCHNER M., SYVERSEN T.: Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *NeuroToxicology*, 2006, 27, s. 492-500.
53. KELLAND L.: The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7, s. 573-584.
54. KERKSICK CH. a WILLOUGHBY D.: The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2005, 2, s. 38-44.
55. KERR J. F. R., WYLLIE A. H., CURRIE A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, 26, s. 239-256.
56. KHYNRIAM D. a PRASAD S. B.: Changes in glutathione-related enzymes in tumorbearing mice after cisplatin treatment. *Cell Biol. Toxicol*, 2002, 18, s.349-358.
57. KLIONSKY D. J.: Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, 2008, 4, s. 740-743.
58. KOHEN R. a NYSKA A.: Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 2002, 30, s. 620-650.
59. KOIRI R. K. a TRIGUN S. K.: Dimethyl sulfoxide activates tumor necrosis factor α -p53 mediated apoptosis and down regulates D-fructose-6-phosphate-2-kinase and lactate dehydrogenase-5 in Dalton's lymphoma in vivo. *Leukemia Research*, 2011, 35, s. 950-956.
60. KROEMER G., GALLUZZI L., et al.: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 2008, 16, s. 3-11.
61. KUČERA O., ENDLICHER R., et al.: The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 2014, s. 1-12.
62. KUMAR A. a BACHHAWAT A. K.: A futile cycle, formed between two ATPdependent gamma-glutamyl cycle enzymes, gamma-glutamyl cysteine synthetase and 5-oxoprolinase: the cause of cellular ATP depletion in nephrotic cystinosis. *Journal of Biosciences*, 2010, 35, s. 21-25.

63. KURUTAS E. B.: The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, 2015, 15, s. 1-22.
64. LANG C. A., MILLS B. J., et al.: Blood glutathione decreases in chronic diseases. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2000, 135, s. 402-405.
65. LAZZÉ M. C., PIZZALA R., et al.: Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutation Research*, 2003, 535, s. 103-115.
66. LEE S. M, KOH H. J, et al.: Cytosolic NADP(+)- dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 32, s. 1185-1196.
67. LEVERVE X.: Hyperglycemia and oxidative stress: complex relationships with attractive prospects. *Intensive Care Medicine*, 2003, 29, s. 511-514.
68. LIOU G. Y. a STORZ P.: Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 2010, 44, s. 479-496.
69. LIPPERT B.: Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. *Wiley-VCH*. 1999, s. 563. ISBN 3906390209.
70. LONG A. M., COLITZ C. M. H., BOMSER J. A.: Apoptotic and Necrotic Mechanisms of Stress-Induced Human Lens Epithelial Cell Death. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229, s. 1072-1080.
71. LOUIS K. S. a SIEGEL A. C.: Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 740, s. 7-12.
72. LYNCH-DAY M. A. a KLIONSKY D. J.: The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett*, 2010, 584, s. 1359-1366.
73. MADRUGA G. M, CRIVELLENTI L. Z., et al.: Comparative use of dimethyl sulphoxide (DMSO) in different animal species. *Veterinarni Medicina*, 2017, 62, s. 179-185.
74. MAHTO S. K., CHANDRA P., RHEE S. W.: In vitro Models, Endpoints and Assessment Methods for the Measurement of Cytotoxicity. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 2010, 2, s. 87-93.
75. MARENCO B., NITTI M., et al.: Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: Crucial players in cancer growth and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016, s. 2-16.

76. MASCOTTI K., MCCULLOUGH J., et al.: HPC viability measurement: trypan blue versus akridine orange and propidium jodide. *Transfusion*, 2000, 40, s. 693-696.
77. MITTLER R.: ROS are Good. *Trends in Plant Science*, 2017, 22, s. 11-19.
78. MONIRI R. M., YOUNG A., et al.: Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*, 2014, 67, s. 379-386.
79. MULGUND A., DOSHI S., AGARWAL A.: The role of oxidative stress in endometriosis. *Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health*, 2015, 25, s. 273-281.
80. MURPHY J. M., CZABOTAR P. E., et al.: The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 2013, 39, s. 443-453.
81. NAUEN R. a STUMPF N.: Fluorometric microplate assay to measure glutathione S-transferase activity in insects and mites using monochlorobimane. *Analytical Biochemistry*, 2002, 303, s. 194-198.
82. NEL A., XIA T., et al.: Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, 311, s. 622-627.
83. NEPRAVISHTA R., SABELLI R., et al.: Oxidative species and S-glutathionyl conjugates in the apoptosis induction by allyl thiosulfate. *FEBS Journal*, 2012, 279, s. 154-167.
84. NICOLA M. D. a GHIBELLI L.: Glutathione depletion in survival and apoptotic pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 2014, 5, s. 1-4.
85. NIKOLETOPOULOU V., MARKAKI M., et al.: Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1833, s. 3448-3459.
86. NILES A. L., MORAVEC R. A., RISS T. L.: In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current Chemical Genomic*, 2009, 3, s. 33-41.
87. NOCTOR G., GOMEZ L., et al.: Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53, s. 1283-1304.
88. NÝDLOVÁ E., VRBOVÁ M., ROUŠAR T.: Glutathion a jeho enzymový systém. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa*, 2014, 17, s. 202-208.
89. PARZYCH K. R. a KLIONSKY D. J.: An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidant and Redox Signaling*, 2014, 20, s. 460-473.

90. PASTORE A., FEDERICI G., et al.: Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinical Chemical Acta*, 2003, 333, s. 19-39.
91. PLÁTENÍK J.: Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi*, 2009, 11, s. 30-33.
92. PRÄBST K., ENGELHARDT H., et al.: Basic Colometric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods of Molecular Biology*, 2017, 1601, s. 1-17.
93. PRIYA S., NIGAM A., et al.: Diethyl maleate inhibits MCA+TPA transformed cell growth via modulation of GSH, MAPK, and cancer pathways. *Chemico-Biological Interactions*, 2014, 219, s. 37-47.
94. QUYANG L., SHI Z., et al.: Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 2012, 45, s. 487-498.
95. RABIK C. A. a DOLAN M. E.: Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 2007, 33, s. 9-23.
96. RACEK J.: Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. *Galén*. 2003, s. 90. ISBN 8072622315.
97. RAHMAN K.: Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2007, 2, s. 219-236.
98. RAMIREZ-SAGREDO A., ALEMAN L., et al.: Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro. *Cardiology*, 2016, 35, s. 228-241.
99. RECZEK C. R. a CHANDEL N. S.: ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 33, s. 8-13.
100. RETH M.: Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nature Immunology*, 2002, 3, s. 1129-1134.
101. RISS T. L., MORAVEC R. A., NILES A. L.: Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [online]. National Center for Advancing Translational Sciences, 2004, [cit. 2019-02-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/#top>
102. RUTHERFORD L. D a GIESEG S. P.: 7-Ketocholesterol id not cytotoxic to U937 cells when incorporated into acetylated low density lipoprotein. *Lipids*, 2011, 47, s. 239-247.
103. RYBAK L. P, WHITWORTH C. A, et al.: Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hearing Research*, 2007, 226, s. 157-67.
104. SAAD S. Y., NAJJAR T. A., ALASHARI M.: Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced

- nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2004, 31, s. 862-867.
105. SAKAI W., SWISHER E. M., et al.: Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 2008, 451, s. 1116-1120.
 106. SEBBAGH M., RENVOIZE C., et al.: Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, 2001, 3, s. 1-7.
 107. SEN CH. K. a PACKER L.: Redox Cell Biology and Genetics. *Elsevier Academic Press*. 2002, s. 634. ISBN 0080496997.
 108. SHAO H., CHU L., et al.: Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 2008, 4, s. 8-14.
 109. SHI S., TAN P., et al.: ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncology Reports*, 2016, 35, s. 2606-2614.
 110. SCHLERLISS R.: The MTT assay as tool to evaluate and Compaq excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 411, s. 98-105.
 111. SIDDIK Z. H.: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 2003, 22, s. 7265-7279.
 112. SIES H.: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 1997, 82, s. 291-295.
 113. SLÁMA P., SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D.: Využití metod detekce apoptózy a nekrózy neutrofilních granulocytů krve skotu in vitro. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2006, 54, s. 107-116.
 114. SOGA M., MATSUZAWA A., ICHIJO H.: Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 2012, s. 1-5.
 115. SPIESS P. C., MORIN D., et al.: Protein Thiol Oxidation in Murine Airway Epithelial Cells in Response to Naphthalene or Diethyl Maleate. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2010, 43, s. 316-325.
 116. STEWART D. J.: Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2007, 63, s. 12-31.
 117. STOCKERT J. C. a VILLANUEVA A.: MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 2012, 114, s. 785-796.

118. STORDAL B., PAVLAKIS N., DAVEY R.: Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: A systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, 2007, 33, s. 347-357.
119. ŠEBEK J.: Buněčné kultury v medicíně. *Galén*. 2018, s. 148. ISBN 9788074923807.
120. ŠTÍPEK S.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. *Grada Publishing*. 2000. ISBN 80-7169-704-4.
121. TARPEY M. M., WINK D. A., GRISHAM M. B.: Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory. Integrative and Comparative Physiology*, 2004, 286, s. 431-444.
122. TAUSZ M.: The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment. *Kluwer Academic Publishers*, 2001, 40, s. 101-122.
123. TIHELKOVÁ, R.: *Molekulárně-biologický přístup stanovení viability bakterií*. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita.
124. TOBWALA S., FAN W., et al.: Antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens* and its protective effects against oxidative stress in various cell cultures. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14, s. 271.
125. TODD R. C. a LIPPARD S. J.: Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*, 2009, 4, s. 280-291.
126. TONNUS W. a LINKERMANN A.: Clinical Immunology: Regulated necrosis and its immunogenicity. *Elsevier*. 2018, s. 197-205. ISBN 9780702068966.
127. ÜBERALL I.: Autofagie ve vztahu k nemoci. *Vesmír*, 2010, 89, s. 41-44.
128. VALVERDE M., ROJAS E., et al.: Survival and cell death in cells constitutively unable to synthesize glutathione. *Mutation Research*, 2006, 594, s. 172-180.
129. WANG D. a LIPPARD S. J.: Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4, s. 307-320.
130. WANG L., LIU Z., et al.: Metabonomic analysis of the therapeutic effect of exendin-4 for the treatment of tBHP-induced injury in mouse glomerulus mesangial cells. *Free Radical Research*, 2018, 52, s. 544-555.
131. WHEATE N. J., WALKER S., et al.: The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, 2010, 35, s. 8113-8127.
132. WU W., LIU P., LI J.: Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2012, 82, s. 249-258.

133. XU H., TAI J., et al.: The N-terminal domain of tumor suppressor p53 is involved in the molecular interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-Xl. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 341, s. 938-944.
134. XU J., ZHOU J. Y., et al.: The role of Cullin3-mediated ubiquitination of the catalytic subunit of PP2A in TRAIL signaling. *Cell Cycle*, 2014, 13, s. 3750-3758.
135. YIN L. M., WEI Y., et al.: Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*, 2013, 10, s. 68-72.
136. ZEISS C. J.: The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Veterinary Pathology*, 2003, 40, s. 481-495.
137. ZHANG H., CHEN Y., et al.: Nrf2 mediates the resistance of human A549 and HepG2 cancer cells to boningmycin, a new antitumor antibiotic, in vitro through regulation of glutathion levels. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018, 18, s. 1-9.