

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Sledování genové exprese N-acetyltransferáz v HK-2 buňkách

Diplomová práce

AUTOR PRÁCE:

Bc. Barbora Matyková

VEDOUCÍ PRÁCE:

Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.

KONZULTANT:

RNDr. Jiří Handl, Ph.D.

2024

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Monitoring of N-acetyltransferases Gene Expression in HK-2 Cells
Diploma Thesis

AUTHOR: Bc. Barbora Matyková
SUPERVISOR: Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.
CONSULTANT: RNDr. Jiří Handl, Ph.D.

2024

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Matyková**
Osobní číslo: **C22376**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Sledování genové exprese N-acetyltransferáz v HK-2 buňkách**
Téma práce anglicky: **Monitoring of N-acetyltransferases Gene Expression in HK-2 Cells**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- Zpracujte literární rešerši zaměřenou na biotransformaci xenobiotik s důrazem na popis N-acetyltransferáz. Dále charakterizujte toxicitu vybraných látek *in vitro*. Zaměřte se zejména na mechanismy biotransformace po inkubaci buněk s acetaminofenem a cisplatinou.
- V rámci teoretické části dále popište polymerázovou řetězcovou reakci (PCR), se zaměřením na PCR v reálném čase a s reverzní transkripcí (RT-PCR). Vysvětlete princip a uveďte přehled reagentů/látek, které jsou nezbytné pro experimentální provedení. Popište také některé další modifikace PCR. Dále uveďte příklady buněčných modelů pro studium nefrotoxicity vybraných látek *in vitro*, soustřeďte se pak především na buněčnou linii proximálních ledvinných tubulů HK-2.

Experimentální část:

- V rámci praktické části se zaměřte na sledování genové exprese N-acetyltransferáz, která bude indukována působením modelových toxinů (např. acetaminofen, cisplatina) v adherentní buněčné linii proximálních ledvinných tubulů HK-2. K tomuto účelu využijte metodu RT PCR. Navrhněte oligonukleotidy pro příslušné geny včetně genů referenčních, a optimalizujte podmínky pro jejich použití.
- Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Výsledky práce následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Ke zpracování literárního přehledu využijte elektronické databáze
(*ScienceDirect, NCBI, PubMed, Web of Science*)

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavlína Nýltová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Sledování genové exprese N-acetyltransferáz v HK-2 buňkách jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 9.5.2024

Bc. Barbora Matyková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce Mgr. Pavlíně Nývtové, Ph.D., konzultantům RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. a Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, laskavost, trpělivost, vstřícný přístup a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Zároveň chci touto cestou poděkovat své rodině, přátelům a partnerovi Petru Kábelovi, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou a měli se mnou velkou trpělivost.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá sledováním genové exprese N-acetyltransferáz v HK-2 buňkách. Teoretická část se věnuje popisu biotransformace xenobiotik se zaměřením na vybrané enzymy. Důraz byl kladen hlavně na N-acetyltransferázy. V závěru se teoretická část zabývala buněčnou linií HK-2 a popisem polymerázové řetězové reakce se zaměřením na PCR v reálném čase a s reverzní transkripcí.

Experimentální část je zaměřena na sledování genové exprese N-acetyltransferáz indukovanou acetaminofenem a cisplatinou v adherentní buněčné linii ledvinných proximálních tubulů HK-2. Genová exprese byla sledována metodou RT-PCR. Za tímto účelem byly navrženy oligonukleotidy pro geny N-acetyltransferáz a referenční geny. Následně byly optimalizovány podmínky pro jejich použití pro metodu RT-PCR.

KLÍČOVÁ SLOVA

N-acetyltransferáza, genová exprese, RT-PCR, biotransformace, cisplatin, acetaminofen, adherentní buněčná linie

ANNOTATION

This thesis deals with the monitoring of gene expression of N-acetyltransferases in HK-2 cells. The theoretical part is devoted to the description of the biotransformation of xenobiotics with a focus on selected enzymes. The emphasis was mainly on N-acetyltransferases. In conclusion, the theoretical part dealt with the HK-2 cell line and the description of polymerase chain reaction with a focus on real-time PCR and reverse transcription.

The experimental part focuses on monitoring gene expression of N-acetyltransferases induced by acetaminophen and cisplatin in the HK-2 adherent proximal renal tubule cell line. Gene expression was monitored by RT-PCR. For this purpose, oligonucleotides for N-acetyltransferase genes and reference genes were designed. Subsequently, the conditions for their use for RT-PCR were optimized.

KEYWORDS

N-acetyltransferase, gene expression, RT-PCR, biotransformation, cisplatin, acetaminophen, adherent cell line

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ.....	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Biotransformace	15
1.1.1 Xenobiotika	16
1.1.2 Vstup xenobiotik do organismu a buněk	16
1.1.3 Fáze biotransformace.....	17
1.1.3.1 Fáze I.....	18
1.1.3.2 Fáze II.....	19
1.1.4 Cytochromy P450.....	21
1.1.4.1 Základní informace	21
1.1.4.2 Funkce	22
1.1.4.3 Nomenklatura cytochromu P450.....	22
1.1.4.4 Genetické polymorfismy	24
1.1.5 N-acetyltransferázy.....	25
1.1.5.1 Základní informace	25
1.1.5.2 N-acetyltransferáza 1	27
1.1.5.3 N-acetyltransferáza 2	29
1.2 Acetaminofen.....	30
1.2.1 Historie acetaminofenu.....	31
1.2.2 Mechanismus působení	31
1.2.3 Metabolismus	33
1.2.4 Farmaceutické účinky a dávkování	34
1.3 Cisplatina	35
1.3.1 Historie cisplatiny.....	36
1.3.2 Mechanismus působení	37
1.3.3 Nežádoucí účinky	38
1.4 Lidské proximální tubulární buňky HK-2.....	39
1.5 Polymerázová řetězová reakce.....	40
1.5.1 Historie PCR.....	41
1.5.2 PCR cykly.....	42
1.5.3 Základní složky PCR.....	44
1.5.3.1 Primery.....	44

1.5.3.2 DNA polymeráza	45
1.5.3.3 Ostatní	46
1.5.4 Vizualizace a detekce PCR produktů	47
1.5.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	48
1.5.6 Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí	49
1.5.7 Další modifikace polymerázové řetězové reakce	49
1.5.8 Vyhodnocení genové exprese	50
1.5.9 Aplikace.....	52
2 CÍLE PRÁCE	53
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	54
3.1 Laboratorní pomůcky, přístroje a software	54
3.2 Seznam použitých chemikálií	55
3.3 Biologický materiál.....	56
3.4 Oligonukleotidy (5' - 3').....	56
3.5 Příprava roztoků	56
3.6 Kultivace HK-2 buněk	57
3.7 Práce s RNA.....	58
3.8 Izolace RNA.....	58
3.9 Reverzní transkripce	60
3.10 Návrh oligonukleotidů	61
3.11 Gradientová PCR	61
3.12 Elektroforéza	62
3.13 Real-time PCR	63
3.14 Statistická analýza naměřených dat	64
4 VÝSLEDKY	65
4.1 Izolace RNA a reverzní transkripce	65
4.2 Návrh oligonukleotidů	66
4.3 Gradientová PCR a elektroforéza	66
4.4 Real-time PCR	69
5 DISKUZE.....	75
6 ZÁVĚR	81
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	82
8 PŘÍLOHY	94
8.1 Sekvence pro návrh primerů	94
8.2 Výsledky agarózové gelové elektroforézy NTC	95

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Seznam obrázků

Obrázek 1: Trojrozměrné struktury N-acetyltransferáza 1 a N-acetyltransferáza 2.....	26
Obrázek 2: Lokalizace genu NAT na chromozomu 8.....	26
Obrázek 3: Schéma lidského genu NAT1.....	28
Obrázek 4: Schéma lidského genu NAT2.....	30
Obrázek 5: Struktura acetaminofenu.....	30
Obrázek 6: Biotransformační dráhy acetaminofenu.....	34
Obrázek 7: Schéma cisplatiny.....	36
Obrázek 8: HK-2 buňky.....	40
Obrázek 9: Schéma PCR.....	42
Obrázek 10: Amplifikační křivka.....	51
Obrázek 11: Schéma izolace RNA.....	59
Obrázek 12: Destička NanoQuant Plate™.....	60
Obrázek 13: Marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.....	63
Obrázek 14: Gelová elektroforéza PCR produktů pro primery NAT1.....	67
Obrázek 15: Gelová elektroforéza PCR produktů pro primery NAT2.....	68
Obrázek 16: Gelová elektroforéza PCR produktů pro primery GAPDH.....	69

Seznam tabulek

Tabulka 1: Klasifikace biotransformačních drah.....	18
Tabulka 2: Objemy pipetovaných reagentů pro izolaci RNA.....	59
Tabulka 3: Objemy pipetovaných reagentů pro gradientovou PCR.....	61
Tabulka 4: Teplotní gradient pro gradientovou PCR.....	62
Tabulka 5: Objemy pipetovaných reagentů pro RT-PCR.....	64
Tabulka 6: Změřená koncentrace a čistota RNA.....	65
Tabulka 7: Charakteristiky navržených primerů.....	66
Tabulka 8: Ct hodnoty naměřené RT-PCR.....	72

Seznam grafů

Graf 1: Izoformy cytochromu podílející se na metabolismu léčiv.....	23
Graf 2: Křivka tání produktů pro primery NAT1 v 15. pasáži.....	70
Graf 3: Křivka tání produktů pro primery NAT2 v 15. pasáži.....	71
Graf 4: Křivka tání produktů pro primery GAPDH v 7. pasáži.....	71
Graf 5: Relativní exprese genu NAT1 v 7. a 15. pasáži.....	73
Graf 6: Relativní exprese genu NAT2 v 7. a 15. pasáži.....	74

SEZNAM ZKRATEK

$2^{-\Delta\Delta Ct}$	delta-delta Ct metoda (<i>delta-delta Ct method</i>)
Acetyl CoA	acetylkoenzym A (<i>acetyl-coenzyme A</i>)
APAP	acetaminofen (<i>acetaminophen</i>)
APAP-GSH	konjugát acetaminofen-glutathion (<i>acetaminophen-glutathione</i>)
AT	adenino-thyminový komplementární pár (<i>adenin-thymine pair</i>)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (<i>complementary DNA</i>)
CisPt	cisplatina (<i>cisplatin</i>)
COX	cyklooxygenáza (<i>cyklooxygenase</i>)
Ct	prahová hodnota cyklu (<i>cycle of treshold</i>)
CoA	koenzym A (<i>coenzyme A</i>)
CYP	cytochromy P450 (<i>cytochrome P450</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát (<i>deoxynucleoside triphosphate</i>)
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (<i>double-stranded DNA</i>)
FAD	flavinadenindinukleotid (<i>flavin adenine dinucleotide</i>)
FMN	flavinmononukleotid (<i>flavin mononucleotide</i>)
FRET	přenos energie fluorescenční rezonancí (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>).
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GC	guanino-cytosinový komplementární pár (<i>guanine-cytosine pair</i>)
GIT	gastrointestinální trakt (<i>gastrointestinal tract</i>)
HEK293	buněčná linie lidské embryonální ledviny (<i>Human Embryonic Kidney cell line</i>)
HK-2	buněčná linie lidské ledviny-2 (<i>Human Kidney-2</i>)
HPV 16	lidský papilomavirus 16 (<i>human papillomavirus 16</i>)
JTC-12	buněčná linie opičí ledviny (<i>monkey kidney cell line</i>)

LLC-PK1	buněčná linie prasečí ledviny (<i>pig kidney cell line</i>)
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NAD[P]	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin (<i>N-acetyl-p-benzoquinone imine</i>)
NAT	N-acetyltransferáza (<i>N-acetyltransferase</i>)
NAT1	N-acetyltransferáza 1 (<i>N-acetyltransferase 1</i>)
NAT2	N-acetyltransferáza 2 (<i>N-acetyltransferase 2</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ptgs-1	prostaglandin-endoperoxid syntázy 1 (<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>)
Ptgs-2	prostaglandin-endoperoxid syntázy 2 (<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>)
qPCR	kvantitativní PCR (<i>quantitative PCR</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina (<i>single-stranded DNA</i>)
Taq DNA polymeráza	DNA polymeráza I z bakterie <i>Thermus aquaticus</i> (DNA polymerase I from <i>Thermus aquaticus</i>)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
Tm	teplota tání (<i>melting temperature</i>)
UDP	uridindifosfát (<i>uridine diphosphate</i>)
UGT	uridindifosfát glukuronosyltransferáza (<i>uridine diphosphate glucuronosyltransferase</i>)

ÚVOD

Lidský organismus přijímá celou řadu cizích látek, které je nutné z těla odstranit. Tento proces probíhá v játrech a nazývá se biotransformace. Jedná se o sled na sebe vzájemně navazujících reakcí katalyzovaných různými enzymy. Mezi tyto enzymy řadíme například skupinu N-acetyltransferáz, jejichž funkcí je přenos acetylové skupiny v rámci biotransformační fáze II. Uplatňují se při biotransformaci heterocyklických a aromatických aminů.

N-acetyltransferázy se podílí na biotransformaci léčiv jako jsou např. acetaminofen a cisplatina. Acetaminofen, též známý pod názvem paracetamol, je z hlediska léčby bolesti a febrilie jedním z nejužívanějších léků na světě. Cisplatina patří mezi významná chemoterapeutika a je používána pro léčbu pacientů s různými typy rakovin. Pro správné využití těchto léčiv v klinické praxi a zamezení jejich možné cytotoxicity je nutné znát procesy související s metabolismem těchto léčiv v organismu a následným vyloučením.

Pro testování cytotoxicity *in vitro* se využívá různých buněčných modelů jako jsou např. ledvinné buněčné linie HEK293, JTC-12 nebo HK-2. Právě HK-2 buňky jsou díky svému původu z lidských ledvin často uplatňovány pro studium a testování nefrotoxicity. S jejich využitím se setkáváme zejména při testování nefrotoxicity acetaminofenu nebo cisplatin.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Biotransformace

Biotransformace neboli metabolická přeměna je proces transformující chemické látky v organismu prostřednictvím enzymatických reakcí. Tento děj se odehrává převážně v játrech, kde se nachází potřebné enzymy. Hlavním účelem biotransformace je chemická modifikace obtížně eliminovatelných látek, tzv. xenobiotik, na jejich hydrofilnější formu. Tato hydrofilní forma je poté lépe rozpustná ve vodě a může být jednoduše vyloučena z organismu močí či žlučí (Rourke a Sinal, 2014). Zároveň se vlivem těchto reakcí mění i fyzikálně chemické vlastnosti dané látky (Klaassen, 2007).

Takto usnadněná eliminace dané sloučeniny vede ke zkrácení jejího biologického poločasu, čímž se snižuje její potenciální toxicita. Jako příklad je možné uvést paracetamol, jehož hodnota clearance je 12 mL/min, ale jeho produkt biotransformace je eliminován ledvinami rychlostí 170 mL/min. Ojedinele se vlivem metabolismu snižuje schopnost rozpustnosti ve vodě, což má za následek omezení procesu vyloučení. Například se jedná o sulfonamidy nacházející se v moči, které procházejí acetylací. Snižovaná rozpustnost sulfonamidů může způsobit tvorbu krystalů v renálních tubulech a následnou nekrózu (Timbrell a Marrs, 2011).

Prostřednictvím biotransformace sloučenin je modifikován i jejich biologický potenciál. Nicméně většinou tato metabolická přeměna končí vznikem užitečných produktů (Soucek, 2011). Z klinického hlediska mohou mít na biotransformaci vliv další faktory, jako jsou pohlaví, věk, léky, patologické stavy, genetika či nutriční stav pacienta. Například exprese a aktivita cytochromu P450 jakožto jednoho z hlavních katalyzátorů fáze I biotransformace, může být rozdílná v prenatálním období, novorozenecké nebo dospělé fázi života. Studie Harris et al. (1995) a Phang-Lyn a Llerena (2023) poukázaly na vyšší aktivitu cytochromu P450 u žen než u mužů. Aktivita ostatních systémů účastnících se metabolismu léčiv může být naopak vyšší u mužů než u žen.

Dalším faktorem ovlivňujícím biotransformaci je nutriční stav pacienta. Zdravá strava s optimálním zastoupením všech makroživin poskytuje potřebné množství bílkovin ve srovnání se stravou s deficitním příjmem bílkovin. Shodně je to i u esenciálních kovů či minerálů, jako je například vápník, zinek nebo měď, které jsou nezbytné pro správnou funkci enzymatické aktivity v buňce. Problém by mohl nastat u pacientů s onemocněním jater, při kterém dochází

k poškození hepatocytů. Takovým příkladem je cirhóza, u které jsou jaterní buňky nahrazovány vazivovou tkání a díky tomu játra nejsou schopna vykonávat metabolické procesy.

1.1.1 Xenobiotika

Xenobiotika jsou tělu cizí chemické látky, které se fyziologicky v lidském organismu nevyskytují, a proto je organismus nedokáže rozeznat jako své vlastní. Název xenobiotikum vychází z řeckého slova *xenos*, což v překladu znamená cizí, a ze slova *bios*, znamenající život. Opakem xenobiotik jsou eobiotika, tedy látky organismu vlastní například minerály, vitamíny, živiny a další. Organismus ke svému fungování xenobiotika nepotřebuje, nedokáže je využít ani jako zdroj energie, ani neslouží pro jeho správný vývoj. Xenobiotikům jsme nevyhnutelně a neustále vystavováni během každodenního života. Takovými látkami se zároveň mohou stát i ty, které se běžně vyskytují a do organismu jsou přijímány v nadměrných koncentracích (Soucek, 2011; Skálová et al., 2017; Sudhakaran et al., 2017). Za svůj život jsou lidé dle odhadů vystaveni asi jednomu až třem milionům xenobiotik (Patterson et al., 2010). Do této skupiny jsou zahrnuty nejen přírodní, ale i umělé chemikálie jako jsou léčiva, průmyslově vyráběné chemikálie, znečišťující látky, drogy, pesticidy, alkaloidy, produkty vzniklé ve vařených potravinách pyrolýzou, plísnové či rostlinné toxiny a vedlejší rostlinné metabolity. Tělo s nimi může přijít do styku i úmyslně, a to například při podání léků. V případě, že nedochází k jejich biotransformaci, mohou se v těle hromadit a následně se tak stát potenciálně škodlivými. Negativní vliv může nastat také v případě, kdy léky působí v těle nepříjemně dlouhou dobu (Klaassen, 2007; Sudhakaran et al., 2017).

1.1.2 Vstup xenobiotik do organismu a buněk

Xenobiotika přijme člověk do těla ze vzduchu, potravy, pitné vody, životním stylem či užíváním léků. Hromadění těchto látek v buňkách či tkáních může vést ke vzniku různých patologických stavů, proto je nutné je z těla odstranit. Aby je bylo možné snadno vyloučit, dochází k řadě procesů detoxikace, díky nim jsou xenobiotika transformována na polárnější a méně toxické produkty (Patterson et al., 2010).

Do těla prochází xenobiotika převážně gastrointestinální traktem (GIT, *gastrointestinal tract*), dýchacími cestami nebo i kůží. Lipofilní xenobiotika se z GIT přes membrány dostávají pomocí samovolné difuze. Xenobiotika strukturně podobná živinám jsou absorbována aktivně. Aerosoly a těkavé organické látky pronikají dýchacími cestami. Kůží prostupují látky, které jsou hodně lipofilní (Skálová et al., 2017). Xenobiotika jsou absorbována a následně se šíří krevním řečištěm, v transcelulárních tekutinách či tkáňovém moku. Rychlost a způsob

distribuce je dán srdečním výdejem, průtokem krve, ale i fyzikálně chemickým vlastnostmi xenobiotik (Chhabra, 1979). Xenobiotikum je distribuováno po celém těle až do cílového místa. Konečným místem je orgán nebo tkáň, kde dochází k poškození (Klaassen, 2007).

1.1.3 Fáze biotransformace

Biotransformace zahrnuje sled různých reakcí a celý proces lze zjednodušeně rozdělit na první a druhou fázi. Ty nemusí nutně probíhat postupně, ale může k nim docházet i v opačném pořadí (Phang-Lyn a Llerena, 2023). Většina cizorodých látek se do organismu dostává prostřednictvím GIT, z něhož jsou dále směřovány portálním krevním zásobením přímo do jater, kde se odehrává převážná část všech transformačních reakcí (Timbrell a Marrs, 2011).

Některé enzymy, které jsou nutné pro jednotlivé fáze biotransformace, se mohou vyskytovat i v extrahepatálních tkáních nebo konkrétních orgánech, jako je například střevo, tuk, plíce, ledviny nebo kůže. V hepatocytech jsou enzymy lokalizované v endoplazmatickém retikulu, cytoplazmě nebo mitochondriích. K modifikačním procesům dochází následkem interakce substrátu s enzymem (Timbrell a Marrs, 2009; Phang-Lyn a Llerena, 2023). Oproti enzymům podílejícím se na intermediárním metabolismu jsou ty, které se zapojují do xenobiotických biotransformačních reakcí, obecně nespecifické a z tohoto důvodu nejsou vždy tak efektivní (Timbrell a Marrs, 2011). Fáze biotransformace jsou určeny k deaktivaci látek, ale zároveň mohou sloužit pro bioaktivaci, kdy dochází k transformaci z neaktivních nebo netoxických látek na jejich aktivní či toxickou podobu (Phang-Lyn a Llerena, 2023).

V tabulce č. 1 jsou klasifikovány hlavní biotransformační dráhy, které lze rozdělit na fázi I a fázi II, a spojit s odpovídajícími enzymy. Ve fázi I se objevují procesy jako oxidace, redukce a hydrolýza. Oxidačními procesy jsou řízeny enzymy jako je cytochrom P450, monooxygenáza obsahující flavin, alkoholdehydrogenáza, aldehyddehydrogenáza, monoaminoxidáza a H₂O₂-dependentní peroxidáza. Redukční procesy jsou realizovány cytochromem P450, NADPH-P450 reduktázou, karbonylreduktázou. Hydrolýza je zprostředkována enzymy, jako je epoxidázová hydroláza, karboxyltransferáza/amidáza. Fáze II zahrnuje konjugační reakce řízené enzymy jako uridindifosfát glukuronosyltransferáza (UDP-glukuronosyltransferáza, *uridine diphosphate glucuronosyltransferase*), sulfotransferáza, glutathion S-transferáza, enzymy podílející se na biosyntéze kyseliny merkapturové, cysteinový konjugát beta-lyáza/thiomethyláza, N-acetyltransferáza, N-methyltransferáza a O-methyltransferáza (McCarthy a Sinal, 2005).

Tabulka 1: **Klasifikace biotransformačních drah.** Upraveno dle (McCarthy a Sinal, 2005).

Klasifikace		Vybrané Enzymy
Fáze I	Oxidace	Cytochromy P450
		Monooxygenáza obsahující flavin
		Alkoholdehydrogenáza
		Aldehyddehydrogenáza
		Monoaminoxidáza
		H ₂ O ₂ -dependentní peroxidáza
	Redukce	Cytochrom P450
		NADPH-P450 reduktáza
		Karbonylreduktáza
Hydrolýza	Epoxidová hydroláza	
	Karboxylesteráza/amidáza	
Fáze II	Konjugace	UDP-glukuronosyltransferáza
		Sulfotransferáza
		Glutathion S-transferáza
		Enzymy podílející se na biosyntéze kyseliny merkapturové
		Cysteinový konjugát β -lyáza/thiomethyláza
		N-acetyltransferáza
		N-methyltransferáza
		O-methyltransferáza

1.1.3.1 Fáze I

Fáze I biotransformace zahrnuje oxidační, redukční a hydrolytické reakce. Jejich úlohou je transformace lipofilních léčiv na polárnější molekuly připojením nebo vystavením polárním funkčním skupinám, jako je aminoskupina nebo hydroxylová funkční skupina. Ve fázi I jsou reakce katalyzovány rodinou enzymů cytochromu P450, které jsou v hepatocytech navázány na membránu umístěnou v endoplazmatickém retikulu (Phang-Lyn a Llerena, 2023). Funkční skupiny, jež byly přidány v průběhu fáze I, dávají vznik substrátům pro následnou fázi II

biotransformace. Výsledkem této fáze je vytvoření mírně hydrofilní sloučeniny (Alsanosi et al., 2014; Sudhakaran et al., 2017).

Oxidace je jednou z nejrozšířenějších a nejpodstatnějších reakcí v metabolismu xenobiotik. Tento proces zahrnuje odevzdání elektronu a následně připojení kyslíku do molekuly. Obvyklým zdrojem kyslíku je molekulární kyslík (Alsanosi et al., 2014), ale v určitých situacích může být kyslík získáván z vody. Převážná část organických sloučenin podstupuje jednoelektronové nebo dvouelektronové redoxní reakce, ale může dojít i k čtyřelektronové. Molekulární kyslík je nejběžnějším akceptorem přijímaných elektronů, a to může vést ke dvouelektronové redukci a vytvoření peroxidu vodíku nebo ke čtyřelektronové redukci s tvorbou vody (Sudhakaran et al., 2017).

Redukční reakce často podstupují některé kovy, například pětimocný arsen, a xenobiotika, která v sobě mají zahrnutou aldehydovou, ketonovou, sulfoxidovou, disulfidovou, chinonovou, alkenovou, N-oxidovou, azo- či nitroskupinu. Někdy je obtížné určit, zda je reakce katalyzována enzymaticky, nebo k ní dochází jiným způsobem, tedy neenzymaticky s redukčními činidly jako jsou redukované formy glutathionu, flavinadenindinukleotid (FAD, *flavin adenine dinucleotide*), flavinmononukleotid (FMN, *flavin mononucleotide*) nebo nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NAD[P], *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) (Timbrell a Marrs, 2011; Sudhakaran et al., 2017).

Při hydrolýze se štěpí esterové nebo amidové vazby, což vede k vytvoření karboxylové kyseliny, a to především za účasti vody. Všeobecně se estery hydrolyzují daleko rychleji než amidy (Rourke a Sinal, 2014; Sudhakaran et al., 2017).

1.1.3.2 Fáze II

Ve fázi II biotransformačního procesu dochází ke konjugačním reakcím. Pokud xenobiotika již obsahují funkční skupinu, mohou fázi I vynechat a rovnou vstoupit do fáze II. V té dochází k jejich konjugaci v závislosti na funkční skupině. K původní molekule, netoxického produktu vzniklému ve fázi I, či k toxickému meziproductu je přidána hydrofilní skupina (Phang-Lyn a Llerena, 2023). Následně je nezbytné zvýšení polaritý další transformací. Hlavním cílem fáze II je vznik ve vodě rozpustných látek, aby je bylo možné efektivně vyloučit z těla ven. Typ konjugační reakce je podmíněn funkční skupinou biotransformovaného xenobiotika. Mezi tyto reakce patří glukuronidace, sulfatace, methylace, acetylace, konjugace s glutathionem a aminokyselinami. Tyto produkty mohou současně působit jako inhibitory metabolismu farmakologicky aktivních látek (Sudhakaran et al., 2017; Phang-Lyn a Llerena, 2023).

Glukuronidace je nejdůležitější konjugační reakce fáze II. UDP-glukuronová kyselina je donorem kyseliny glukuronové. Ta je navázána na xenobiotikum a celá reakce je katalyzována UDP-glukuronosyltransferázou.

Při sulfataci je k hydroxylové skupině navázána sulfátová část. Koenzymem reakce je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát a katalyzují ji cytosolické sulfotransferázy (Timbrell a Marrs, 2011).

V biotransformaci xenobiotik je methylace méně častá konjugační reakce. V porovnání s ostatními reakcemi snižuje jejich rozpustnost ve vodě a zároveň chrání jejich funkční skupinu před ostatními konjugačními enzymy. Výjimkou je nikotin, který je ve vodě rozpustný. Enzymy methylace jsou methyltransferázy a kofaktorem je S-adenosylmethionin (Klaassen, 2007).

Pro xenobiotika s aminoskupinou je acetylce důležitou cestou jejich metabolismu. Prvotně je acetylován enzym acetyltransferáza a následně je acetylová skupina přenesena na substrát. Kofaktor enzymu je acetyl CoA (Skálová et al., 2017).

Při konjugaci s glutathionem jsou dvě aminokyseliny odstraněny a následně vzniká konjugát cysteinu. Glutathion je tripeptid složený z cysteinu, glycinu a kyseliny glutamové. Tento děj je katalyzován glutathion-S-transferázou a podílí se na eliminaci reaktivních metabolitů (Klaassen, 2007; Timbrell a Marrs, 2011).

Konjugační reakce s aminokyselinami nejprve vyžaduje aktivaci xenobiotika pomocí koenzymu A (CoA, *coenzyme A*) za katalýzu acetyl-CoA-synthetázy. V dalším kroku dochází k reakci aktivovaného xenobiotika s aminokyselinou, kterou jsou převážně glutamin, glycin, taurin a jiné. Tento děj je katalyzován pomocí N-acetyltransferázy (Skálová et al., 2017).

U konjugovaných léčiv může dojít k jejich dalšímu zpracování ještě předtím, než jsou rozpoznány transportéry a nakonec odstraněny z buněk. Tento metabolický děj může mít za následek vytvoření reaktivních a pro lidské tělo toxických metabolitů, tzv. bioaktivaci léčiv. Specificita bioaktivace je podmíněna strukturálními znaky dané sloučeniny (Zhao et al., 2021). V některých zdrojích je možné najít, že další metabolický osud konjugátu může být označován jako fáze III. Nicméně mezi některými lékaři, a hlavně mezi toxikologickými pracovníky je tato terminologie považována za zastaralou (Timbrell a Marrs, 2011).

Dále se budu podrobněji zabývat vybranými zástupci enzymů biotransformace, cytochromy a N-acetyltransferázami. Cytochromy jsou zástupci fáze I a N-acetyltransferázy se řadí mezi zástupce fáze II.

1.1.4 Cytochromy P450

Obecně jsou cytochromy intracelulární proteiny, které zahrnují jednu nebo několik hemových skupin. Tyto hemoproteiny vykazují katalytickou aktivitu pro uskutečnění enzymatických reakcí, při kterých využívají hem nebo jiný proteinový kofaktor. Účastní se přenosu elektronů podílejících se na biologických procesech, kdy dochází ke změně oxidačního stavu. Příkladem těchto dějů je fotosyntéza či dýchání. U hemu je změna oxidačního stavu založena na rovnováze mezi dvojmocným a trojmocným železem (Mowat a Chapman, 2013).

Na oxidačních reakcích fáze I se nejvíce podílejí právě lidské cytochromy P450 (CYP, *cytochrome P450*; EC 1.14.14.1). Ty se zapojují až do 90 % všech enzymatických přeměn. Cytochromy zprostředkovaný metabolismus léčiv přeměňují produkty lipofilní na hydrofilnější. Nepostradatelnou úlohu hraje při hodnocení výsledků léčby, při které může ovlivňovat její účinek, biologickou dostupnost, bezpečnost a také při zjišťování případné rezistence na léky pomocí metabolismu v orgánech či v cílových místech jejich působení (Zhao et al., 2021).

1.1.4.1 Základní informace

CYP jsou enzymový systém vázaný na membránu buňky, který lze najít zejména v hladkém endoplazmatickém retikulu. Některé formy mohou být umístěny i v dalších organelách, jako jsou například cytochromy c v mitochondriích (Timbrell a Marrs, 2011). Můžeme je najít u bakterií, archeí, eukaryot, hub, živočichů i rostlin (Abou-Donia, 2015). Nejvyšší hladina CYP se u savců nachází v játrech, ale své zastoupení mají i v plicích, ledvinách či nadledvinách, mozku, kůži, pohlavních orgánech a dalších tkáních v organismu. Svůj název tyto barevné proteiny získaly zásluhou absorbování světla při vlnové délce okolo 450 nm, kdy dochází k redukovaní hemového železa nejčastěji dithioničitanem sodným a následně tvoří komplex s oxidem uhelnatým. Významnou vlastností tohoto enzymového komplexu je jeho široká substrátová specifita. Ta umožňuje řadě chemikálií být potenciálními substráty. Různé druhy cytochromů zvládnou přeměnit jeden substrát i na několik možných produktů a zároveň může metabolizovat tentýž druh CYP léčivo na více produktů (Timbrell a Marrs, 2011). CYP tvoří rozsáhlou nadrodinu hemových enzymů tvořících více než 20 000 izoenzymů, které jsou rozpoznány v genomech organismů. Jedná se o membránově vázané proteiny a jejich molekulová hmotnost činí přibližně 65 kDa (Abou-Donia, 2015).

1.1.4.2 Funkce

CYP jsou složeny z velkého počtu proteinů a jejich hlavní funkcí je biotransformace hydrofobních xenobiotik, zahrnující terapeutická léčiva, průmyslové a zemědělské látky, enviromentální chemikálie nebo endogenní sloučeniny (Abou-Donia, 2015). Patří mezi monooxygenázy, jež katalyzují oxidační reakce, během nichž dojde k redukci jednoho atomu molekulárního kyslíku na vodu a současně začlenění druhého do substrátu (Guangping, 2020). Představují tedy rozhodující účastníky při oxidačním metabolismu strukturně různorodých xenobiotik a to včetně léčiv (Abou-Donia, 2015). Systém CYP katalyzuje oxidační reakce jako jsou hydroxylace heterocyklů, aromatické nebo alifatické hydroxylace uhlíku, epoxidace, N-, O- a S- dealkylace, N- a S- oxidace, N-hydroxylace, dehydrogenace, desulfurace, deaminace a štěpení esterů (Timbrell a Marrs, 2011).

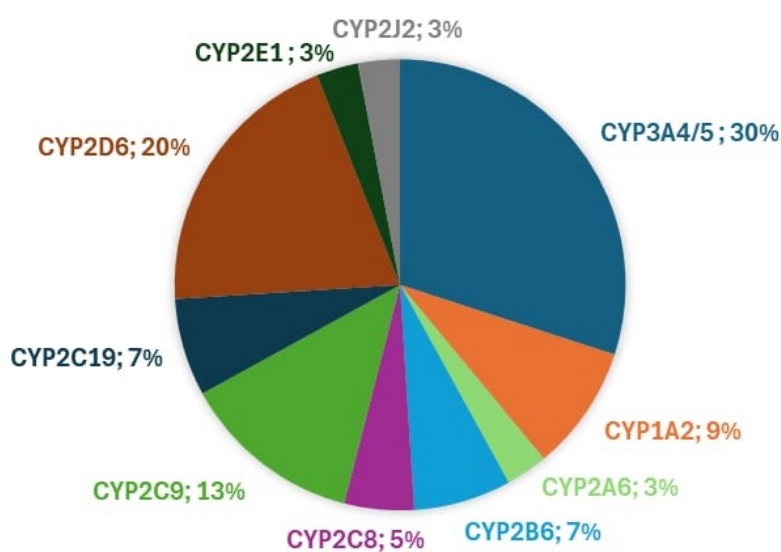
Velký význam mají CYP pro lidský organismus z pohledu zdraví, kdy hrají důležitou roli při metabolismu léčiv, kde jejich klíčovou funkcí je rozdílná odpověď jedinců na podávaná farmaka. Odlišná reakce jednotlivých pacientů je způsobena různou rychlostí jejich metabolismu na stejný druh léčiva. Variabilita v odbourávání souvisí s expresí CYP převážně ve střevech a játrech. Exprese a aktivita CYP je spojována s vnitřními substráty a ovlivňována může být vnějšími faktory, jakými je stravování, předešlé vystavení dalším drogám, užití tabáku či alkoholu (Zhao et al., 2021).

Mimo biotransformaci léčiv se exprese CYP uplatňuje v protinádorové terapii. U buněk rakoviny, v nádorech či buněčných liniích byly CYP detekovány a látky působící proti nádorům byly metabolizovány CYP. Zvýšená exprese CYP v buňkách nádoru oslabuje nádorové látky, které souvisí s rezistencí na léčbu a následně pak se špatnou prognózou nebo relapsem nádoru. Snížená exprese CYP naopak omezuje spuštění protinádorových látek v buňkách nádoru (Zhao et al., 2021).

1.1.4.3 Nomenklatura cytochromu P450

Enzymový systém CYP obsahující hem má ustanovenou nomenklaturu. Zkratka CYP je oficiálním označením superrodiny cytochromu P450, do níž jsou zahrnuty příslušníci všech biologických říší. Po CYP následuje značení genové rodiny číslem, za něj se řadí velké písmeno charakterizující podrodinu a jako poslední je druhé číslo pro určení jednotlivého genu či izoenzymu. Příkladem je CYP1A1, kdy CYP1 je rodina, A podrodina a číslo 1 značí enzym (Manikandan a Nagini, 2018; Guangping, 2020). Struktura CYP je složena přibližně z 400 až 500 aminokyselin a v aktivním místě se nachází hemová prostetická skupina (Zhao et al., 2021). Dle sekvence proteinů bylo možné rozdělit enzymy na 18 rodin, ale jenom

CYP1, CYP2 a CYP3 se účastní metabolismu xenobiotik a zároveň tvoří 70 % všech cytochromů vyskytujících se v játrech. Tyto enzymy představují klíčovou úlohu při stanovení intenzity a doby působení daného léku a jeho odstranění z organismu (Sudhakaran et al., 2017). Lidské CYP jsou rozmanité a plní různorodé funkce. Mimo metabolismu léčiv některé rodiny CYP vykonávají úlohu například při biosyntéze žlučových kyselin, steroidů, aktivaci a deaktivaci vitamínu D nebo při metabolismu mastných kyselin či kyseliny arachidonové. Izoformy 1, 2 a 3 se podílejí na 80 % metabolismů léčiv a každý z nich má své charakteristické vlastnosti, a tak najdou široké uplatnění při oxidativním metabolismu (Zhao et al., 2021). Izoformy CYP podílející se na metabolismu léčiv jsou znázorněny na grafu č. 1.



Graf 1: Izoformy cytochromu podílející se na metabolismu léčiv. Upraveno dle (Zhao et al., 2021).

Do podrodiny CYP1A patří typ CYP1A1, který je exprimován převážně v plicích, a typ CYP1A2 v játrech (Conney, 1982; Shimada et al., 1996). Oba zastávají úlohu při bioaktivaci karcinogenů, a to převážně u heterocyklických a aromatických aminů (Conney, 1982). Větší riziko pro vznik rakoviny tlustého střeva je dle epidemiologických důkazů spojeno s vysokou aktivitou CYP1A2. Tento jev se neprokázal u pacientů, u kterých chyběla aktivní N-acetyltransferáza, nebo u kterých byla zaznamenána nadměrná konzumace grilovaného masa (Lang et al., 1994; Zhao et al., 2021).

Rodina CYP2 představuje nejpočetnější skupinu z cytochromů, kdy se do biotransformace léčivých přípravků nejvíce zapojují CYP2D6 a CYP2C9. Ty se liší aktivními místy, která jsou buď malá, nebo tvoří ani jeden vzájemný překryv (Zanger a Schwab, 2013; Zhao et al., 2021).

Při vyvíjení léčiv a jejich objevování se nejvíce uplatňuje podrodina CYP3A a současně se jedná o nejvíce zastoupené cytochromy v lidském organismu, jež rozkládají nad 30 % běžně užívaných léčiv. Do této skupiny se řadí izoformy CYP3A5 a CYP3A4 (Kawakami et al., 2011; Zhao et al., 2021).

1.1.4.4 Genetické polymorfismy

Genetické polymorfismy neboli více variant konkrétní formy genu pro gen CYP mohou být zodpovědné za interakce léků nebo genetická onemocnění zapříčiněná změnou exprese genu nebo enzymovou aktivitou (Abou-Donia, 2015). Mimo genetické polymorfismy v genech CYP mohou i epigenetické změny nebo enviromentální faktory mít vliv na interindividuální varianty při odpovědi léků na jejich terapeutickou účinnost. Mezi faktory prostředí patří pohlaví či věk pacienta, strava, životní styl, onemocnění nebo patofyziologické faktory. Z pohledu epigenetiky může mít vliv na řízení jejich genové exprese methylace deoxyribonukleové kyseliny (DNA, *deoxyribonucleic acid*). Cytochromy mohou být indukovány či inhibovány aktuálně užívanými léčivými a v těle kolujícími metabolity, což následně může působit na výsledky léčby prostřednictvím vzájemného ovlivňování léků mezi sebou (Zhao et al., 2021). Pokud je inhibována činnost CYP, tak může být zpomalen metabolismus a současně i clearance aktuálně užívaných léčiv v případě, že podléhají biotransformaci ovlivněnou tímto cytochromem (Abou-Donia, 2015).

Genová exprese a činnost CYP může být odlišná mezi jedinci a jinými etnickými skupinami. Četnost jednotlivých alelických variant v populaci je různá, a navíc k tomu přispívá i značné množství genetických polymorfismů pro CYP. Největší počet variací alel bylo charakterizováno u CYP2D6, která čítala 63 alel. U CYP2B6 bylo popsáno 28 alel a u CYP2A6 22 alel. Nejvíce zastoupenou izoformou je CYP2D6. Podílí se přibližně na 25 % metabolických dějů u klinicky používaných léků. Jeho polymorfní diverzita může mít vliv asi na polovinu těchto transformačních procesů. Bylo prokázáno, že existují dva druhy variant genů CYP. Jedním z nich je forma, kdy dochází ke ztrátám funkce. To může následně působit na expresi a sestřih genu pro CYP. Následkem je větší koncentrace léčiva v plazmě spojená s jeho zhoršenou eliminací. Opačně působí druhý typ, kdy je funkce naopak získána, plazmatická koncentrace je redukována a jejich odstranění léčiv z organismu zrychleno. Jednotlivé polymorfismy genu CYP mohou být odpovědné za působení daného léku a za nebezpečí nechtěných reakcí. To je nezbytné při optimalizaci lékové terapie (Zhao et al., 2021).

1.1.5 N-acetyltransferázy

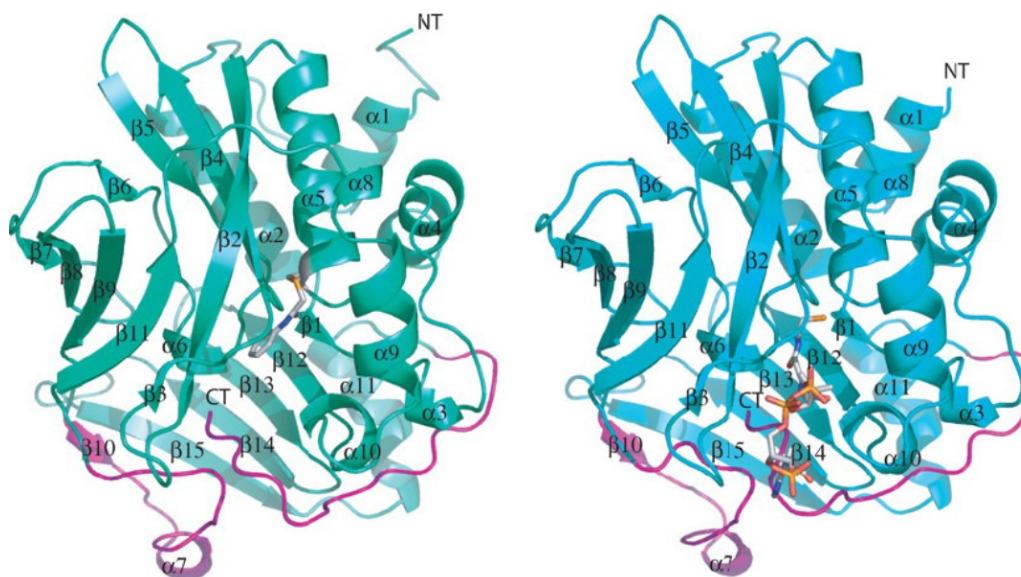
Arylamín N-acetyltransferázy neboli N-acetyltransferázy jsou zástupci enzymů zapojujících se do metabolismu xenobiotik. Významně se tak podílejí na bioaktivaci či naopak detoxikaci několika terapeutických léčiv a karcinogenů (Rodrigues-Lima et al., 2011). Enzym N-acetyltransferáza (NAT, *N-acetyltransferase*; EC 2.3.1.1) je katalyzátor ovlivňující acetylaci xenobiotik a pro správné fungování potřebuje koenzym, kterým je acetylkoenzym A (acetyl CoA, *acetyl-coenzyme A*) (Sudhakaran et al., 2017).

Při biotransformaci heterocyklických a aromatických aminových prokarcinogenů dochází k nejméně dvěma krokům, aby byla umožněna přeměna na jejich reaktivní podobu za pomoci enzymů. V první řadě se uplatňuje působení CYP1A2 při N-hydroxylaci. Ve druhém kroku se při O-acetylaci z N-hydroxyarylamínu působením NAT tvoří N-acetoxyarylaminy, které jsou velmi nestabilní a následně to může vést až ke genovým mutacím způsobujících vznik nádorů. Ovlivněny jsou geny kontrolující buněčnou proliferaci. Acetylace představuje jednu z hlavních drah biotransformace fáze II a podílí se na eliminaci hydrazinů, arylaminů nebo chemických karcinogenů (Windmill et al., 2020).

1.1.5.1 Základní informace

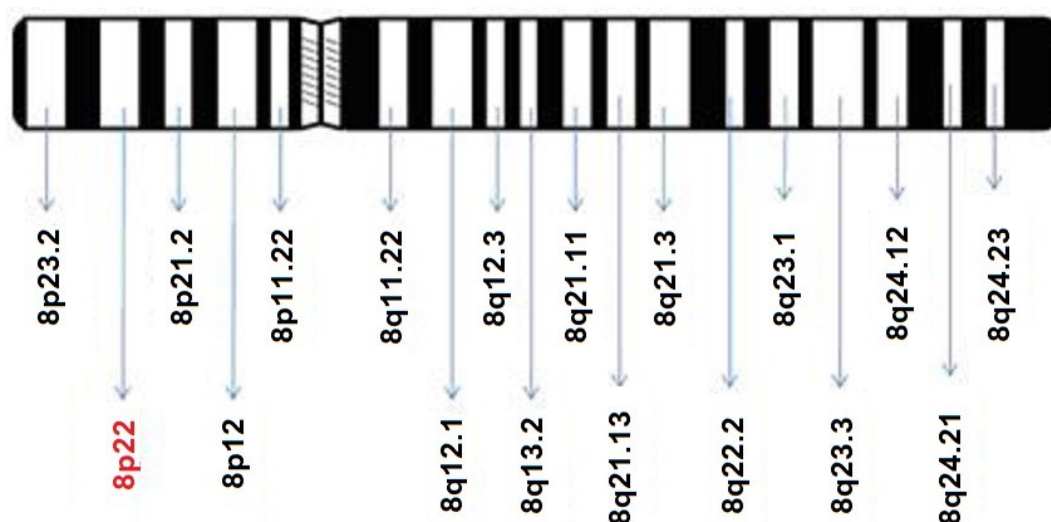
NAT se nachází v buněčném cytosolu. Z acetyl CoA přenášejí acetylovou skupinu na substrát, kterým je právě xenobiotikum (Sim et al., 2008; Rodrigues-Lima et al., 2011). Při acetylaci nedochází ke zvýšení rozpustnosti substrátu ve vodě. Nedílnou součástí pro správný katalytický mechanismus jsou esenciální aminokyselinové zbytky cysteinu, histidinu či kyseliny asparagové, které se nalézají v aktivním místě NAT (Guangping, 2020).

V lidském organismu se vyskytují dvě skupiny NAT a to N-acetyltransferáza 1 (NAT1, *N-acetyltransferase 1*) a N-acetyltransferáza 2 (NAT2, *N-acetyltransferase 2*). Trojrozměrná struktura těchto enzymů je znázorněna na obrázku č. 1. U člověka existuje celá řada polymorfismů NAT1 i NAT2 (Guangping, 2020). Struktura NAT je složena z 280–300 aminokyselin dle organismu. Jejich řetězec má tři domény: N-terminální α -helix, β -list, C-terminální α/β víčko uložené nad aktivním místem (Sim et al., 2007; Kubiak et al., 2013). Jednotlivé domény se skládají z dalších podsložek zahrnující řetězce α -helixů a β -skládaných listů (Wu et al., 2007; Zhou et al., 2013).



Obrázek 1: **Trojrozměrné struktury N-acetyltransferázy 1 (vlevo) a N-acetyltransferázy 2 (vpravo).** CT – terminální karboxylový konec, NT – terminální aminový konec, $\alpha 1$ - $\alpha 11$ – α -helixové řetězce, $\beta 1$ - $\beta 15$ – řetězce β -skládaného listu. Převzato z (Wu et al., 2007).

Tyto dvě formy se od sebe odlišují rozdílnou distribucí ve tkáních a jinou expresí v průběhu vývoje člověka (Rodrigues-Lima et al., 2011). NAT1 se může vyskytovat v různých tkáních, ale především ho lze nalézt v tlustém střevě (Zhou et al., 2013). NAT2 je většinou lokalizována ve střevech či játrech. Geny pro tyto dva enzymy jsou lokalizovány na chromozomu 8p22, jak je znázorněno na obrázku č. 2. Jejich 10% rozdíl je dán pořadím aminokyselinové sekvence (Windmill et al., 2020).



Obrázek 2: **Lokalizace genu NAT na chromozomu 8.** Umístění genů je na chromozomu 8p22 označeno červeně. Upraveno dle (Ruiz et al., 2009).

1.1.5.2 N-acetyltransferáza 1

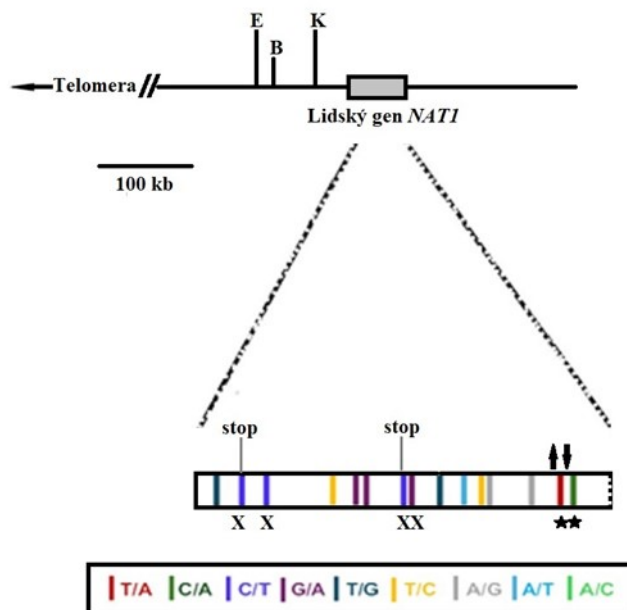
Jak již bylo zmíněno výše, NAT1 a NAT2 se od sebe liší rozdílnou distribucí ve tkáních (Rodrigues-Lima et al., 2011), kdy NAT1 se vyskytuje především v tlustém střevě). Hlavní funkcí NAT1 je zprostředkování acetylace (Zhou et al., 2013).

Acetylace prostřednictvím NAT1 funguje na principu dvojitého vytěsnění, tzv. *ping pong bi bi*. Tento kinetický mechanismus je dvoufázová reakce, kdy v prvním kroku je z acetyl CoA přemístěna acetylová skupina na cystein. Ten se nachází v aktivním místě NAT1 (Klaassen, 2007; Walker et al., 2009). Dochází k vytvoření acetylovaného xenobiotického meziproduktu. Následně je acetylován substrát za vzniku CoA. Tzv. katalytická triáda složená z cysteinu, histidinu a kyseliny asparágové je struktura napomáhající při přesunu acetylu v rámci NAT1. Toto uspořádání je zachováno vždy na stejném místě ve všech NAT (Zhou et al., 2013; Guangping, 2020). Vzhledem k možné karcinogenezi při aktivaci aromatických aminů byla acetylace sledována v různých studiích. U vzniklých derivátů může docházet k následným reakcím, jako je oxidace a k tvorbě značně reaktivních pro buňku toxických a karcinogenních látek. Dále bylo dokázáno, že NAT1 se uplatňuje při katabolismu folátů a tvorbě karcinomů, a proto začala být NAT1 používána při diagnostice rakoviny prsu jako nádorový biomarker (Zhou et al., 2013).

Bylo prokázáno, že enzym NAT1 může být inhibován některými běžně používanými protirakovinnými léky. Příkladem takovýchto léků jsou tamoxifen a léčiva působící jako antagonisté estrogenních receptorů. Obě léčiva se uplatňují při léčbě karcinomů prsu a způsobují inhibici NAT1. Jejich útlum může být i ireverzibilní, jako je tomu u významné chemoterapeutické látky cisplatinu. Ta se využívá pro terapii různých typů rakovin (Rodrigues-Lima et al., 2011).

Zájem o NAT se projevil při zkoumání acetyl CoA, který je podstatným meziproduktem metabolismu. V biotransformaci xenobiotik zastávají NAT úlohu ve farmakologii, kde se uplatňují v pochopení rozdílné způsobilosti jedinců metabolizovat léčiva. Odlišná metabolická schopnost jednotlivců je dána etnickou příslušností, která může mít dopad na klinické studie. Zároveň se využívá pro porozumění nežádoucích vedlejších účinků léčiv (Sim et al., 2014). Lidský gen NAT1 může ovlivňovat enzymovou aktivitu, protože obsahuje funkční polymorfismy (Alsanosi et al., 2014). Obecně se NAT1 lokusy vyznačují velkým polymorfismem. Na obrázku č. 3 se nachází gen pro lidský NAT1, který je uložen na chromozomu 8p22. V horní části jsou CpG ostůvky identifikované restriční digescí pomocí BssHII (B), EagI (E) a KspI (K). Dole označují šipky vložení, nebo odstranění. X je označení bodových mutací, jenž mají za následek zkrácení genového produktu, nebo vedou k genovému

produktu se sníženou aktivitou. Hvězdy značí bodové mutace v alele NAT1*10 (Sim et al., 2000).



Obrázek 3: **Schéma lidského genu NAT1.** B – BssHII, E – EagI, K – KspI, X – bodová mutace, hvězdy – bodové mutace v alele NAT1*10. Šipky značí odstranění, nebo vložení. Upraveno dle (Sim et al., 2000).

Pro NAT1 bylo v jejím lokusu popsáno 26 alel. První genetický polymorfismus NAT byl popsán u pacientů, kteří byli léčeni antituberkulotiky (Rodrigues-Lima et al., 2011). Jejich odlišná schopnost acetylace léčiv je dědičně podmíněný znak, který může ovlivňovat konečnou lékovou odpověď (Walker et al., 2009). Jejich polymorfismy mohou mít vliv na aktivitu enzymů. Jeden typ fenotypu acetyluje pomaleji a druhý naopak rychleji (Rodrigues-Lima et al., 2011; Alsanosi et al., 2014). Acetylační fenotypy je možné rozdělit do dvou skupin na pomalé a rychlé. V případě pomalého acetylátoru jsou toxické metabolity zadrženy v játrech po delší dobu oproti rychlému acetylátoru. To může způsobovat nežádoucí hepatotoxicitu (Zhou et al., 2013; Alsanosi et al., 2014). Tyto fenotypy mohou být odpovědné za nežádoucí lékové reakce nebo dokonce být spojeny s některými onemocněními. Takovým příkladem je rakovina. Expresi NAT1 mohou ovlivnit i faktory negenetického původu. Aktivita může být snížena vlivem substrátu, léky způsobenou inhibicí či biologickými oxidanty (Rodrigues-Lima et al., 2011).

1.1.5.3 N-acetyltransferáza 2

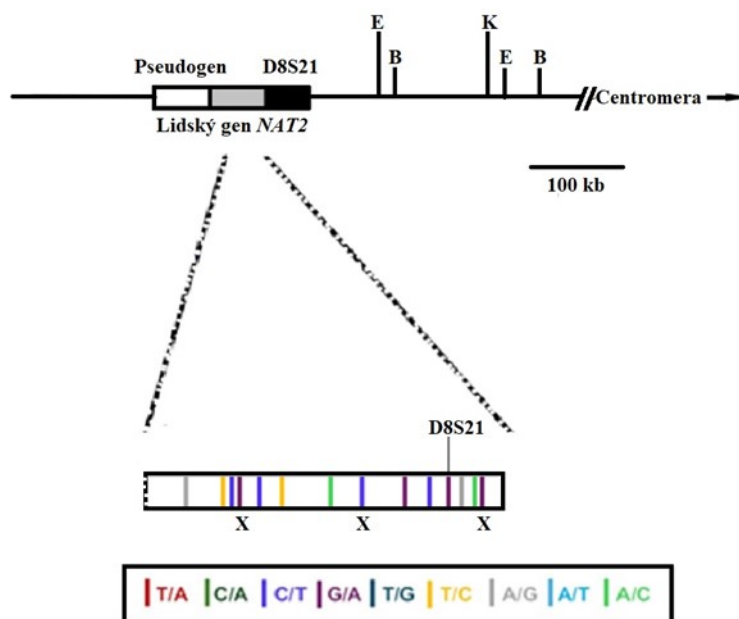
NAT2 je lokalizována většinou ve střevech či játrech, protože se účastní odbourávání léčiv (Zhou et al., 2013). Z funkčního hlediska má lidský gen NAT2 schopnost změnit enzymovou aktivitu. To je dáno funkčními polymorfismy nacházejícími se v tomto genu (Alsanosi et al., 2014).

Acetylace prostřednictvím NAT2 je založena na stejném principu kinetického mechanismu jako u NAT1. Nejprve je acetylová skupina acetyl CoA přesunuta na cystein a následně dochází k acylaci substrátu. Vzniklým konečným produktem je CoA. Pro lokusy NAT2, stejně jako pro lokusy NAT1, je charakteristické velké množství genetických polymorfismů. U lokusu NAT2 bylo identifikováno 53 alel.

Poprvé byl genetický polymorfismus aktivity NAT popsán u pacienta s tuberkulózou, který byl léčen antituberkulotikem isoniazidem. Ten byl z organismu eliminován za pomoci acetylace a lidského enzymu NAT2. Polymorfni acetylace byla prokázána i u dalších terapeutických léků jako například sulfamethazin nebo hydralazin (Rodrigues-Lima et al., 2011).

Z etnického hlediska se až u jedné poloviny populace s původem v Evropě a Africe vyskytuje pomalá acetylace. Ta je připisována genetickým polymorfismům genu NAT2. Tyto polymorfismy mohou ovlivnit náchylnost jedince ke konkrétnímu typu rakoviny vyvolanému chemikáliemi z průmyslu. U těchto lidí je při dlouhodobém vystavení rakovinotvorných arylaminu zvýšená pravděpodobnost rakoviny močového měchýře, žaludku či plic (Alsanosi et al., 2014).

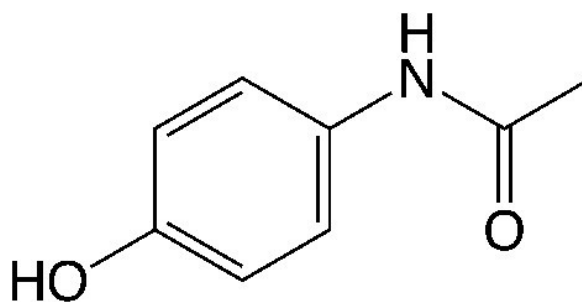
Na obrázku č. 4 se nachází gen pro lidskou NAT2, který je uložen na chromozomu 8p22. V horní části jsou CpG ostůvky identifikované restriční digescí pomocí BssHII (B), EagI (E) a KspI (K). X je označení bodových mutací, jež mají za následek zkrácení genového produktu nebo vedou k genovému produktu se sníženou aktivitou. Vyznačen je i pseudogen D8S21 (Sim et al., 2000).



Obrázek 4: Schéma lidského genu NAT2. B – BssHIII, E – EagI, K – KspI, X – bodová mutace, D8D21 – pseudogen. Upraveno dle (Sim et al., 2000).

1.2 Acetaminofen

Acetaminofen neboli N-acetyl-para-aminofenol (APAP, *acetaminophen*) a též známý pod názvem paracetamol, je nejvyužívanějším léčivem po celém světě. Jedná se o volně prodávané antipyretikum a neopioidní analgetikum první volby, které má široké uplatnění při léčbě těchto projevů u různých onemocnění či stavů. Jeho užívání nepoškozuje GIT, nemá však protizánětlivé schopnosti (Ayoub, 2021; Gerriets et al., 2024). Vzorec APAP je znázorněn na obrázku č. 5.



Obrázek 5: Struktura acetaminofenu. Převzato z (Athersuch et al., 2018).

1.2.1 Historie acetaminofenu

Léčivo APAP je metabolickým produktem fenacetinu a acetanilidinu jakožto derivátů anilinu. K objevu acetanilidu došlo náhodně v osmdesátých letech 19. století, kdy byl pacientovi s parazity ve střevech podán místo naftalenu. K jejich záměně došlo v lékárně, ale díky tomu bylo zjištěno, že zaměněný lék snižoval vysokou horečku. Léčivo tak našel své uplatnění v klinickém použití pod komerčním názvem Antifebrin. Po krátké době byl prokázán jeho toxický účinek, kdy u jedinců vyvolával cyanózu zapříčiněnou methemoglobinemií. Toto zjištění vedlo k dalšímu zkoumání látek fenacetinu a APAP, které měly mít toxicitu menší. Při klinickém testování těchto dvou látek došel Joseph von Mering k závěru, že pro lékařské použití byl vhodnější fenacetin. APAP byl podle Meringova chybného závěru hodně toxický. Toto tvrzení bylo později z velké části vyvráceno. V tu dobu již používaný fenacetin začal vykazovat závažné nežádoucí účinky, a tak docházelo k dalším studiím derivátů anilinu. Studie prokázaly, že hlavním produktem metabolismu derivátů anilinu je APAP a že právě on má analgetický a antipyretický účinek. Zároveň bylo prokázáno, že vznikající methemoglobinemii má za vinu jiný metabolický produkt než APAP. V USA byl APAP poté na trh s léčivem uveden pod názvem Tylenol a ve Velké Británii pod označením Panadol (Toussaint et al., 2010; Józwiak-Bebenista a Nowak, 2014). V roce 2005 byl objeven nový produkt metabolismu APAP para-aminofenol. Para-aminofenol je v játrech vytvořený a od látky APAP odvozený metabolit, který se může dostat až do mozku. Dále může být konjugován s kyselinou arachidonovou a dát vznik produktu N-(4-hydroxyfenyl)-arachidonamidu. Tento metabolit společně s dalšími látkami umožňuje APAP působit proti bolesti. V současné době je APAP první preferovanou volbou při léčbě bolestí nebo horečky vzhledem k bezpečnosti jeho terapeutických dávek oproti nesteroidním protizánětlivým léčivům (Ayoub, 2021).

1.2.2 Mechanismus působení

Léčivo APAP inhibuje dráhy cyklooxygenázy (COX, *cyklooxygenase*), ale konkrétní mechanismus jeho působení není znám. Přestože léčivo APAP chybí účinky proti zánětu, bývá začleňován do skupiny nesteroidních protizánětlivých léků. Toto začlenění je dáno díky obdobným vlastnostem s protizánětlivými nesteroidními léky spočívající v potlačení bolesti či zmírnění teploty. APAP má schopnost inhibice cesty COX v centrálním nervovém systému, nezvládne však potlačit tuto dráhu v periferních tkáních (Gerriets et al., 2024). Na centrální i periferní úrovni mohou právě působit nesteroidní protizánětlivá léčiva potlačující COX, které tak disponují antitrombotickým a protizánětlivým účinkem oproti APAP (Toussaint et al.,

2010). Konkrétně se cílem nesteroidních protizánětlivých léčiv stávají izoformy COX-1 a COX-2 (Rouzer a Marnett, 2009). APAP se neváže na aktivní místo COX, ale pravděpodobně jeho mechanismus působí skrze inhibice COX-3, která je sestříhovou variantou COX-1 (Gerriets et al., 2024). Mechanismus analgetického a antipyretického působení APAP není dosud zcela vysvětlen. Při bakteriální či virové infekci dochází k zánětlivé odpovědi organismu, který následně uvolňuje signální molekuly jako jsou interleukin-1 β , interleukin-6 anebo tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*). V důsledku toho lidské tělo reaguje febrilií (Ayoub, 2021). Předpokládá se, že antipyretické a analgetické vlastnosti léčiva APAP jsou vyvolány prostřednictvím jeho působení na omezení aktivity drah COX, což dále vede k inhibici tvorby prostaglandinu v centrálním nervovém systému. V něm zároveň může docházet ke stimulaci descendentních serotonergních drah, které pravděpodobně mohou být odpovědné za jeho analgetický účinek (Gerriets et al., 2024).

COX se jako katalyzátory účastní syntézy prostaglandinu z jejich prekurzorové kyseliny arachidonové a dalších látek účastnících se zánětu, bolesti, febrilie, agregace trombocytů nebo produkce hlenu v GIT (Toussaint et al., 2010). Toto jejich působení je jeden z důvodů, proč jsou terčem nesteroidních protizánětlivých léčiv právě izoformy COX-1 a COX-2. V genu prostaglandin-endoperoxid syntázy 1 (Ptgs-1, *prostaglandin-endoperoxide synthase 1*) je uložena genetická informace COX-1, jenž je přepisována do relativně stabilní messengerové RNA (*mRNA, messenger ribonucleic acid*). Všechny tkáně, ve kterých můžeme najít COX-1, ji jsou schopny exprimovat a distribuovat. COX-1 dává vznik prostaglandinům nezbytným pro hemostázu, cytoprotekci žaludku a obecně pro udržení homeostázy. Ve srovnání s tím se prostaglandiny syntetizované za katalýzy COX-2 účastní například tvorby nádorů, zánětlivých reakcí a obecně při patologických stavech, protože k aktivaci genu prostaglandin-endoperoxid syntázy 2 (Ptgs-2, *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*) pro COX-2 je zapotřebí k proliferačním nebo zánětlivých podnětů. Vzhledem k tomu, že jeho gen obsahuje nestabilní sekvence, tak je jeho mRNA modifikována. To dalo popud k vytvoření inhibitorů COX, které by působily proti zánětům, ale zároveň neovlivňují nežádoucími účinky jako nesteroidní protizánětlivé léky (Rouzer a Marnett, 2009).

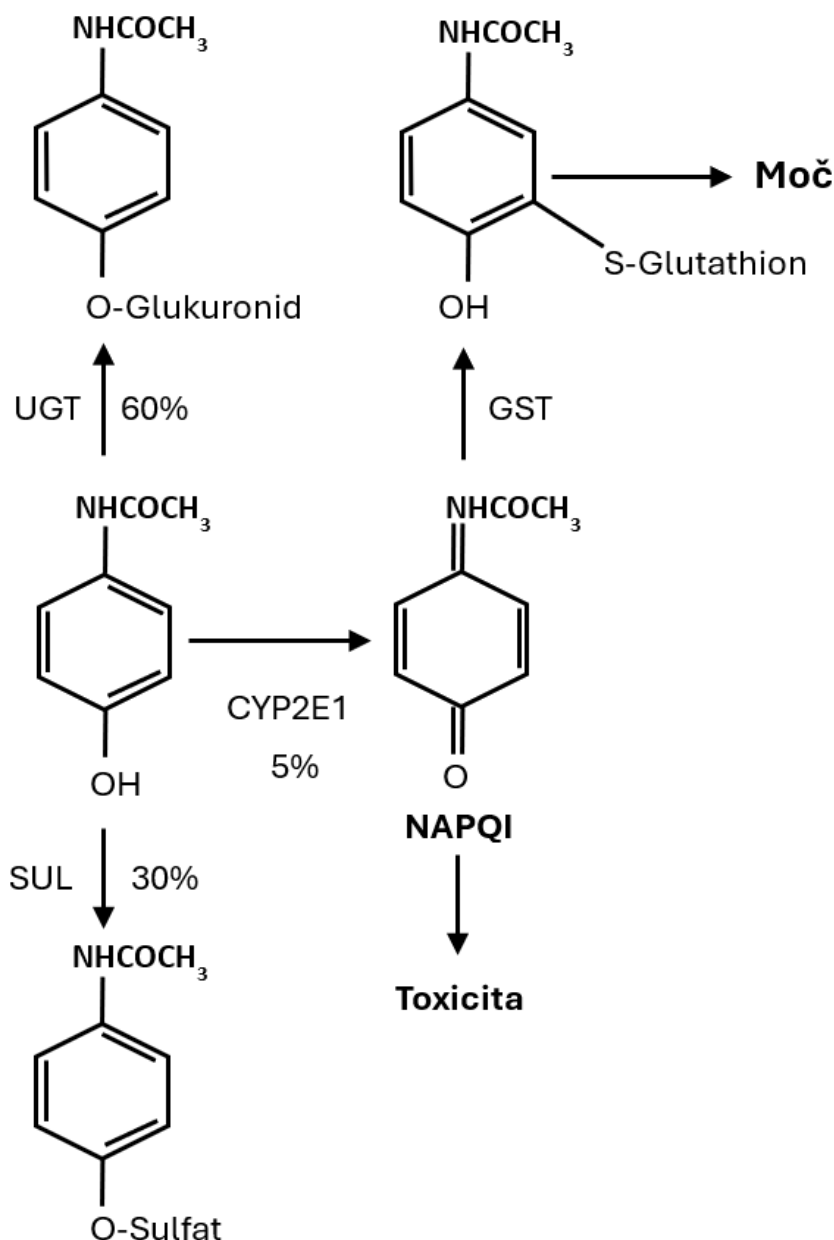
Bylo prokázáno, že acetaminofen působí jako inhibitor NAT2. Jeho inhibiční účinek ovlivňuje acetylaci, což může vést k významným lékovým interakcím (Park et al., 2023).

1.2.3 Metabolismus

Po požití léčiva APAP dochází k jeho vstřebávání v tenkém střevě pasivní difúzí. Vzhledem k tomu, že je rozpustný v lipidech, tak může procházet skrz membrány buněk a hematoencefalickou bariéru (Ayoub, 2021). Prostupuje do celého organismu mimo tukovou tkáň. Podstatná část vzniklých metabolitů APAP je eliminována močí, kterou se do 24 hodin vyloučí nad 90 % terapeutické dávky (Gerriets et al., 2024).

Odbourávání APAP probíhá v játrech, kde asi 60 % APAP podléhá glukoronidaci a okolo 30 % prochází sulfatací. Vytvořené konjugáty jsou ve vodě rozpustné a následně jsou přes ledviny odstraňovány močí. Přibližně 5 % léčiva APAP je metabolizováno mikrosomálním systémem enzymů CYP a konkrétně se oxidačních reakcí účastní CYP1A2 a hlavně CYP2E1. Vzniká reaktivní metabolický meziprodukt N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI, *N-acetyl-p-benzoquinone imine*), který reaguje s glutathionem a tvoří se acetaminofenový a glutathionový konjugát (APAP-GSH, *acetaminophen-glutathione*). Ten je prvotně eliminován žlučí a k další degradaci dochází v ledvinách. Konečné produkty biotransformace léčiva APAP kyselina merkapturová a konjugát cysteinu jsou vyloučeny močí ven z těla (Mazer a Perrone, 2008; McGill a Jaeschke, 2013; Gerriets et al., 2024). Schéma biotransformačních cest odbourávání APAP je znázorněno na obrázku č. 6.

Za fyziologických podmínek je detoxikace NAPQI spojena s glutathionem a dále je NAPQI vyloučen žlučí a močí. Následkem malnutrice nebo vysokého množství látky APAP v organismu může ale docházet k předávkování pacientů (Moriarty a Carroll, 2016; Ramachandran a Jaeschke, 2017). Pokud jsou cesty odbourávání přesycené, tak se vytváří nadbytek NAPQI. Ten následně okamžitě podléhá konjugaci s glutathionem či sulfátem. Pokud jsou jejich jaterní zásoby vyčerpány, tak dochází k navýšení koncentrace NAPQI. NAPQI je proto oxidován CYP (Mazer a Perrone, 2008; Gerriets et al., 2024). Tento toxický produkt metabolismu APAP je zodpovědný za poškození až odumření buněk, což vyvolává selhání jater nebo vážnou poruchu ledvin (Seth, 2019). Hepatotoxicita způsobená APAP je častější než nefrotoxicita. V případě předávkování se může stát, že dojde k akutnímu renálnímu selhání zapříčiněného hepatotoxicitou (Vrbová et al., 2016b). V důsledku toho je narušena homeostáza v těle a prostřednictvím aktivovaných kaspáz a enzymy lyzozomů je zahájena naprogramovaná smrt buněk, tzv. apoptóza. Díky tomu je tkáň nekrotická, což vede až k orgánové dysfunkci (Mazer a Perrone, 2008). Cesty biotransformace APAP se značně liší s věkem. Novorozenci odbourávají APAP převážně přes konjugáty se sulfátem, protože vývoj a správné fungování glukoronidační cesty nastává okolo druhého roku života. Se vzrůstajícím věkem a u dospělých je tomu naopak a převažuje glukoronidace nad sulfatací (Moriarty a Carroll, 2016).



Obrázek 6: **Biotransformační dráhy acetaminofenu.** CYP2E1 – cytochrom 2E1; GST – glutathion S-transferáza; NAPQI – N-acetyl-p-benzochinonimin; SUL – sulfotransferáza, UGT – UDP-glukoronosyltransferáza. Upraveno dle (Hodis, 2015).

1.2.4 Farmaceutické účinky a dávkování

Vzhledem k tomu, že APAP působí v centrálním nervovém systému, používá se při léčbě různých druhů naléhavých bolestí u dospělých. Jeho analgetické účinky se uplatňují při bolesti hlavy, zad, zubů, u menstruačních a osteoartritických bolestí a dále také u onemocnění pohybového aparátu nebo při bolestech po prodělané operaci. Na perifériích inhibovaná syntéza prostaglandinu nesouvisí s analgetickým působením léčiva APAP (Ayoub, 2021).

V klinické medicíně může být toto léčivo aplikováno intravenózně pomocí infuzí, rektálně v podobě čípků, a to hlavně pro dětské pacienty. Nejdostupnější forma je orální například ve formě tablet, šumivých tablet, kapslí nebo sirupů (Gerriets et al., 2024).

Dospělá osoba může užít dle potřeby perorálně až dvě tablety v jedné dávce, interval mezi dávkami musí být nejméně 4 hodiny. Jedná tableta obsahuje 500 mg APAP. Za 24 hodin je to tedy maximálně 8 tablet, což činí nejvyšší denní dávku 4 g. V případě dlouhodobého podávání, více než 10 dnů, je možno užít pouze 5 tablet denně, tedy 2,5 g APAP. U dětí je dávkování vázáno na tělesnou hmotnost, tzn. že se podává 15 mg/kg každých 6 hodin, a to až do maximální denní dávky 60 mg/kg. Jako chemická látka užívaná ve farmakologii je na trhu buď samostatně, anebo coby součást dalších analgetických látek obsahující například kofein, aspirin či jiná opioidní léčiva působící proti bolesti (Ayoub, 2021; Agrawal a Khazaeni, 2024). Vstřebávání acetaminofenu ze zažívacího traktu je rychlé, léčebná hladina, kdy dochází k úlevě od potíží se dostavuje přibližně po 30 minutách a vrcholí cca za 2 hodiny. Dojde-li k předávkování dochází k maximální koncentraci za 4 hodiny (Agrawal a Khazaeni, 2024).

Při nedávné pandemii COVID-19 byl APAP používán častěji než jiná volně dostupná analgetika jako např. ibuprofen. Ibuprofen byl dočasně vyřazen kvůli možné kontraindikaci jako je zhoršení celkového stavu, utlumení imunitního systému nebo by mohl přispět k rozvoji zápalu plic (Ayoub, 2021).

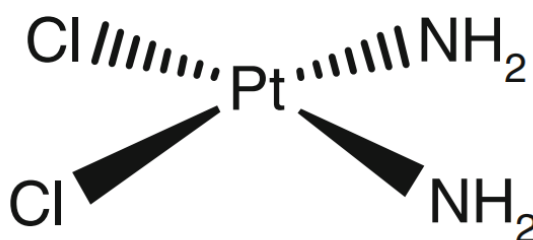
V USA a Spojeném království bylo zaznamenáno více než 20 000 případů předávkování léčivem APAP za rok. V celosvětovém měřítku se řadí jako příčina nutnosti transplantace jater na druhé místo (Vrbová et al., 2016b; Agrawal a Khazaeni, 2024).

1.3 Cisplatina

Cisplatina (CisPt, *cisplatin*) je protinádorové léčivo používané při chemoterapii a používá se v onkologii při léčbě rakoviny vaječníků, varlat, močového měchýře, nemalobuněčného i malobuněčného zhoubného nádoru plic, ale i zárodečných buněk a u celé řady dalších nádorů. Při radioterapii se využívá jako radiosenzibilizátor (Dasari a Tchounwou, 2014; Kwok et al., 2017). Struktura CisPt je znázorněna na obrázku č. 7. Z chemického hlediska se jedná o komplex těžkých kovů, kde je v centru celé sloučeniny obsažen atom platiny. V pozici *cis* je pak platina a na ní jsou navázané dvě aminoskupiny a dva chloridové ionty. Biochemickou vlastností, kterou se CisPt vyznačuje, je inhibice syntézy DNA a současné přerušení jejího řetězce prostřednictvím vybudování vnitrovláknových a mezivláknových transverzálních vazeb ve struktuře DNA (Kwok et al., 2017).

Jedná se o lék s platinou první generace, který je v lékařské praxi využíván jako terapeutikum první volby s příznivým inhibičním dopadem na solidní nádory. Nádory přenastavují metabolické procesy probíhající v buňce, aby se podpořilo rakovinné bujení. Přeprogramování těchto metabolických dějů má vliv na navozenou smrt CisPt u nádorových buněk. Zároveň to může ovlivnit i rezistenci nádorových buněk vůči smrti vyvolané CisPt. Ty představují další možný cíl pro vývoj nových potenciálních strategií, jak se vyhnout vzniklé CisPt rezistenci a teda selhání terapie rakoviny (Wang et al., 2021).

CisPt se používá jako protirakovinný lék při léčbě různých druhů rakovin. Jedním z nich je i rakovina prsu. Ve studii od Rangunathan et al. (2009) poukázali na to, že by NAT1 mohla mít význam v progresi této rakoviny, protože dochází k její expresi. NAT1 jakožto enzym acetylce v biotransformaci se stala cílem chemoterapeutického léku CisPt.



Obrázek 7: Schéma cisplatiny. Převzato z (Dasari a Tchounwou, 2014).

1.3.1 Historie cisplatiny

Poprvé byla CisPt uměle vytvořena v roce 1844, ale její struktura byla popsána až o padesát let později. Pozornost si získala v 60. letech 20. století, kdy byl objeven její inhibující vliv na dělicí buňky bakterie *Escherichia coli*. Vědci uvažovali, zda by nemohla být použita na léčbu rakoviny, a tak se začalo uvažovat o možném potenciálu aplikování jiných vzácných kovů, jako je paladium nebo sloučenin platiny v tomto oboru. Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv byla CisPt schválena v roce 1987 pro onkologickou léčbu. Šlo tak o první sloučeninu s obsahem platiny. Použití CisPt jako chemoterapeutika se stalo velmi efektivním a zastává tak významnou úlohu pro léčbu karcinomů. V klinickém použití našla uplatnění pro terapii rakoviny jakožto nová strategie v kombinaci s ostatními protinádorovými léčivy, aby se zamezilo možným nežádoucím vedlejším účinkům či potenciálním rezistencím na léky (Dasari a Tchounwou, 2014, Wang et al., 2021). CisPt je z organismu odstraňována převážně močí a v malé míře i žlučí. Biologický poločas na počátku je 20–30 min a koncový poločas je až 24 hod (Gold a Raja, 2024).

1.3.2 Mechanismus působení

Mechanismus působení CisPt je založen na principu, kdy dochází k zasíťování s purinovými bázemi DNA guaninem a adeninem. CisPt zároveň může narušit opravné procesy probíhající v DNA, což vede k jejímu poškození, a tak je u rakovinných buněk navozena jejich apoptóza (Dasari a Tchounwou, 2014).

Po vstupu do cytoplazmy buněk je CisPt aktivována substitucí chloridových skupin za molekulu vody. Následně je navázána na DNA na pozici N7 na purinových bázích. Dochází k tvorbě 1,2- vnitrovláknových příčných vazeb a případně v menší míře ke vzniku mezivláknových vazeb. To může vést u rakovinných buněk k poškození ve struktuře DNA a zamezení dalšího dělení buněk prostřednictvím zásahu do procesů replikace a transkripce. To může nakonec směřovat k navození buněčné smrti, konkrétně k apoptóze (Tchounwou et al., 2021; Wang et al., 2021).

Látky, které mohou přivodit poškození DNA, se vyznačují nižší toxicitou u buněk nepodléhajících proliferaci. Navzdory tomu ale CisPt poškozují buňky proximálních tubulů. Dle různých studií a výzkumů k poškození dochází vlivem zánětlivých reakcí, apoptózou nebo oxidačním stresem. CisPt je vychytávána buňkami ledviny, které jsou orgánem, jenž má na starost její eliminaci. V ledvinách se hromadí víc než v jiných orgánech a její koncentrace v buňkách proximálních tubulů je až 5krát větší než v séru, což se podílí na vzniklé nefrotoxicitě vyvolané CisPt (Yao et al., 2007). Efektivnost CisPt se uplatňuje při léčbě rychle se zvětšujících zhoubných nádorů, protože je možné se zaměřit na buňky procházející rychlou proliferací. Její prospěšnost tak klesá u nádorů rostoucích pomalu (Gold a Raja, 2024).

Buňky v těle udržují za fyziologických podmínek rovnováhu mezi hladinou reaktivních forem kyslíku (ROS, *reactive oxygen species*) a procesy, které mají na starost jejich vychytávání a eliminaci. V případě, kdy je tato rovnováha narušena a dochází k jejich nerovnováze ve prospěch ROS, dochází v buňce ke vzniku tzv. oxidačního stresu (Dasari a Tchounwou, 2014). ROS mají negativní vliv na buněčné složky, jako jsou lipidy, DNA nebo proteiny tím, že je oxidačně poškozují. Nádorové buňky podléhají většímu oxidačnímu stresu a tvoří se nadměrné množství ROS než u buněk zdravých. Jedná se o velmi důležitý mechanismus, který se účastní na cisplatinové toxicitě. ROS způsobují propustnost vnější membrány v mitochondriích, podílejí se na poškození DNA a apoptóze (Dasari a Tchounwou, 2014; Wang et al., 2021). Nádorové buňky mají zrychlený metabolismus a pro snazší proliferaci potřebují zvýšené koncentrace ROS, které mají vliv na signální proteiny podílející se na buněčném dělení (Tchounwou et al., 2021).

1.3.3 Nežádoucí účinky

I přesto, že CisPt našla své uplatnění při léčbě rakoviny, tak má i řadu nežádoucích účinků. Mezi nejzávažnější patří negativní vliv na ledviny, snížená odolnost imunitního systému proti infekcím, různé alergické reakce, potíže s GIT, hemoragie nebo ztráta sluchu. CisPt přichází o svůj účinek v důsledku odolnosti nádorových buněk na podávané léky, a to může vést k selhání chemoterapie a následně k progresi rakoviny (Dasari a Tchounwou, 2014; Wang et al., 2021).

Způsobená nefrotoxicita limituje množství použité dávky a až u 20 % pacientů, kterým je ve vysoké míře CisPt podávána, dochází k těžkému narušení správné funkce ledvin. V těch se CisPt akumuluje častěji než na jiných místech v těle, a právě její nerovnovážné hromadění v ledvinné tkáni přispívá k nefrotoxicitě. Na mechanismu vzniku nefrotoxicity způsobené CisPt se podílí více faktorů, mezi které patří oxidační stres, zánět, apoptóza a fibrogenese. Nižší koncentrace CisPt indukují apoptózu pomocí drah závislých na kaspázách-9 a naopak její vysoké koncentrace navozují nekrózu buněk proximálních tubulů. Fibrotická tkáň se tvoří peritubulárně a současně dochází k infiltraci lymfocytů a makrofágů (Yao et al., 2007).

Pro poškození nebo dysfunkci ledvin vyvolané CisPt neexistuje žádná speciální léčba. V rámci prevence je léčeným pacientům standardně podáván fyziologický roztok s elektrolyty, aby docházelo k jejich intenzivní hydrataci, čímž se snižuje riziko nefrotoxicity. Zároveň zvýšení objemu díky fyziologickému nebo hypertonickému roztoku umožňuje zrychlit odvádění CisPt ven z organismu. Přitom nedochází ke změně akumulace CisPt v buňce, ale k navození buněčného stresu, který upravuje její senzibilitu na CisPt. Ta obtížně proniká k DNA, buňky proximálních tubulů jsou odolnější k apoptóze a u nefrotoxinů ovlivňuje jejich metabolickou přeměnu. Současně jim jsou doplňovány hladiny draslíku a hořčíku pro zachování správné funkce ledvin, protože při léčbě CisPt mohou pacienti trpět nežádoucími gastrointestinálními problémy (Yao et al., 2007).

Výzkum se zaměřil na hledání možností, jak obejít nežádoucí účinky CisPt prostřednictvím aplikace jejích analogů, které se vyznačují nižší toxicitou, nebo na použití kombinované léčby s dalšími protirakovinnými léčivy či využití nanotechnologií (Tchounwou et al., 2021).

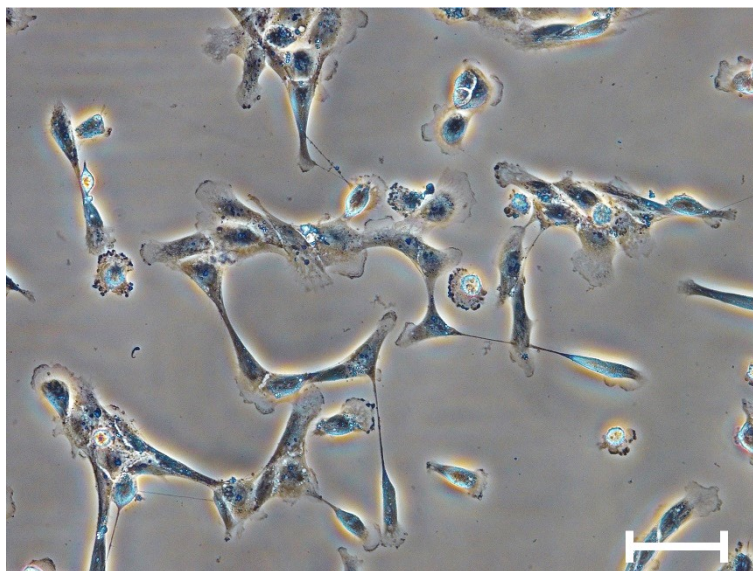
1.4 Lidské proximální tubulární buňky HK-2

Ledviny jsou orgán, který se významně podílí na vylučování, čímž kontroluje extracelulární prostředí a současně udržuje homeostázu. Pro léky se stává cílovým místem jejich toxicity, kdy velice často vlivem jejich působení dochází k poškození ledvin. Renální poškození je spojeno s nárůstem mortality a morbidit pacientů. Z tohoto důvodu dochází k selhání preklinických studií pro vývoj léčiv (Qiu et al., 2018).

S ohledem na zvýšenou potřebu testování nefrotoxicity na lidských buňkách se využívají primárně buňky proximálních tubulů lidských ledvin. Aby nedocházelo ke komplikacím ve výzkumu s použitím celých orgánů či zvířat, byly vytvořeny některé buněčné linie jako např. lidských proximálních tubulárních buňkách (HK-2, *Human Kidney-2*) (Ryan et al., 1994; Vrbová et al., 2016a). Mimo HK-2 buňky se pro testování nefrotoxicity mohou používat i jiné modely buněčných linií, jako je například buněčná linie prasečí ledviny (LLC-PK1, *pig kidney cell line*), buněčná linie lidské embryonální ledviny (HEK293, *Human Embryonic Kidney cell line*) nebo buněčná linie opičí ledviny (JTC-12, *monkey kidney cell line*). Hlavní rozdíl mezi těmito liniemi je především v jejich odlišném původu (Vrbová et al., 2016a).

Buněčná linie HK-2 je imortalizovaná, tzn. že dojde k znesmrtelnění buněk (Handl et al., 2020). Linie byla vyvinuta působením rekombinantního retroviru lidského papilomaviru 16 (HPV 16, *human papillomavirus 16*), který obsahuje gen E6/E7, na primární kulturu proximálních tubulárních buněk z kůry běžné lidské ledviny zdravého dospělého člověka. Tyto geny usměrňují replikační proces DNA a buněčné množení. Výhoda buněčné linie je, že si buňky zachovávají stejné fyziologické i chemické vlastnosti, jako mají fyziologické renální buňky a nejsou ovlivněny ději probíhajícími v organismu. Díky těmto vlastnostem se začaly používat jako základní nástroj pro testování *in vitro* (Ryan et al., 1994; Vrbová et al., 2016a). A právě toto testování vychází ze základních buněčných procesů, jako je jejich růst, metabolismus a smrt (Qiu et al., 2018). O těchto faktorech nás může informovat počet pasáží. Zároveň bylo prokázáno, že počet pasáží může mít vliv na reakci buněk na toxiny (Handl et al., 2020).

Právě jako *in vitro* model bývá buněčná linie HK-2 využívána pro studium nefrotoxicity způsobenou řadou sloučenin. Mezi tyto sloučeniny patří nefrotoxiny nebo léčiva například APAP, CisPt, tetracyklin, gentamicin, vankomycin, chlorid kademnatý a další (Qiu et al., 2018). Buněčnou linii HK-2 je možné vidět na obrázku č. 8.



Obrázek 8: HK-2 buňky. Fázový kontrast, zvětšení 200x, měřítko = 50 μm .

1.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) je průlomová laboratorní metoda molekulární biologie, která byla vynalezena v polovině 80. let 20. století. V současné době je to jedna z nejcennějších a nejvyužívanějších laboratorních technik. Uplatňuje se v případech, kdy je nutné zmnožit dané úseky DNA. Metoda PCR tedy jako první dala možnost pro specifickou detekci a tvorbu velkého množství DNA. Předpokládá se, že metoda PCR bude hojně využívána v laboratorní diagnostice i do budoucna (Zhu et al., 2020). Tento způsob je hojně používán nejen ve zdravotnictví k diagnostice nemocí pomocí detekce patogenů, ale i v dalších oborech ke klonování či sekvenaci genů. Pomocí této techniky lze vytvořit až miliardy kopií určitého segmentu DNA, které mohou sloužit pro následné analýzy (Green a Sambrook, 2019; Waters a Shapter, 2014). Při provádění PCR je nutné, aby byla přítomna templátová DNA, primery, nukleotidy a DNA polymeráza.

Metodu PCR je možné provádět s použitím výchozí DNA různých typů tkání nebo organismů, dále z periferní krve, slin, vlasů, kůže a mikroorganismů. Pro vytvoření dostatečného počtu kopií k analýze běžně používanými laboratorními metodami stačí stopové množství DNA. Proto je PCR pokládána za vysoce citlivou (Garibyan a Avashia, 2013). Průběh celého testování metodou PCR je prováděn automaticky pomocí přístroje zvaného termocykler,

ve kterém dochází k teplotnímu cyklování. Průběh PCR je oproti jiným metodám rychlý, výsledek může být znám během několika málo hodin (NHGRI, 2020).

PCR uplatňuje přirozené buněčné procesy, které jsou využity při replikaci nového řetězce DNA. Umožňuje amplifikaci neboli zmnožení určité sekvence DNA, a tak dochází v krátkém čase k vytvoření milionů kopií (Artika et al., 2022). Syntéza nového vlákna DNA je zprostředkována enzymem DNA polymerázou, jenž přiřazuje volné nukleotidy, kterými jsou dusíkaté báze adenin, guanin, thymin a cytosin. Výchozím bodem, kde začíná pracovat DNA polymeráza, jsou primery, krátké fragmenty DNA o definované délce nukleotidů, které se vážou na komplementární místa templátu a označují tak počátek celé reakce (Garibyan a Avashia, 2013; NHGRI, 2023b).

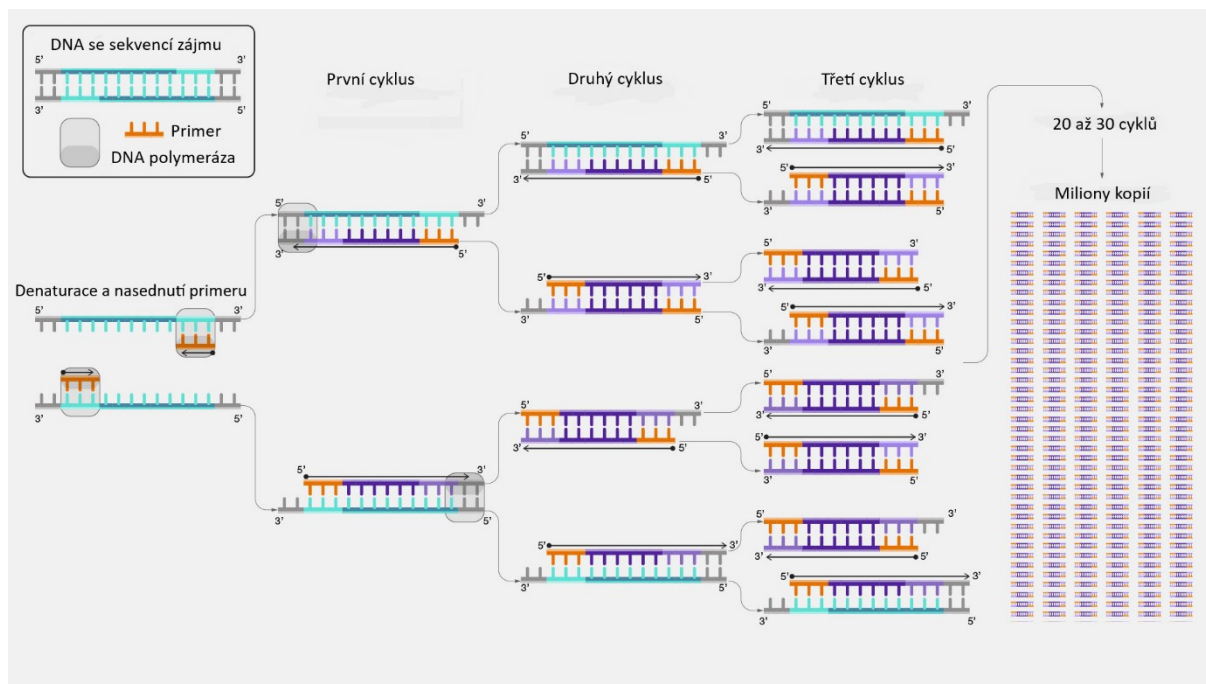
Metoda PCR má velkou řadu předností, jako je jednoduchost provedení postupu s rychlým získáním výsledků, citlivost, vytvoření velkého počtu kopií pro další analýzu jako sekvenování nebo klonování. Kvantitativní PCR (qPCR, *quantitative PCR*) má stejné výhody, a navíc dochází ke kvantifikování nasyntetizovaného produktu, a tak se uplatňuje při zkoumání modifikace hladin exprese genů u nádorů, mikroorganismů a u patologických stavů. Nevýhodami metody je přílišná citlivost, která je náchylná na kontaminaci vzorků, a to platí i pro stopové množství DNA, následkem mohou být chybné a zavádějící výsledky. DNA polymeráza může mylně zařadit do sekvence nukleotidy dle komplementarity. Pro návrh primerů jsou potřeba předešlá sekvenční data a zároveň nasedat nespecificky na cílovou DNA (Garibyan a Avashia, 2013).

1.5.1 Historie PCR

Proces replikace jednovláknových DNA (ssDNA, *single-stranded DNA*) z templátového vlákna za pomoci DNA polymerázy a syntetických primerů byl poprvé popsán v 70. letech 20. století. O objev metody PCR v současné podobě se zasloužil americký biochemik Kary Banks Mullis v roce 1983. V roce 1993 získal Kary Mullis za své zásluhy Nobelovu cenu za chemii (Maheaswari et al., 2016; Cheriyaedath, 2023). To způsobilo rozvoj v oblasti molekulární biologie s použitím nejen pro základní výzkum, ale i pro diagnostiku vrozených a podmíněně genetických či infekčních onemocnění, forenzní analýzu DNA, genotypování a testování v zemědělství (Thermo Fisher Scientific, 2023; Jalali, 2017). PCR je obecně pokládána za jeden z nejvýznamnějších vědeckých průlomů 20. století. Díky schopnosti identifikovat specifický úsek DNA a s přesností a rychlostí syntetizovat velký počet kopií si tato technika zasloužila přirovnání k „molekulární kopírce“. Do současné doby byla vyvinuta celá řada dalších postupů vycházejících z původní metody PCR (Jalali, 2017).

1.5.2 PCR cykly

PCR je cyklicky se opakující, tříkrokový proces skládající se z denaturace, teploty nasednutí primerů a elongace (Green a Sambrook, 2019). Opětovným provedením těchto jednoduchých kroků lze analýzou PCR zmnožit cílovou oblast (Analytical Methods Committee, 2014). Schéma PCR je znázorněno na obrázku č. 9 (NHGRI, 2023a).



Obrázek 9: **Schéma PCR.** Upraveno dle (NHGRI, 2023a).

Před samotným cyklováním je na termocykleru nastavena úvodní denaturace. Její teplota závisí na ideální teplotě pro správnou aktivitu DNA polymerázy a počtu komplementárního guanino-cytosinového páru (GC, *guanine-cytosine pair*) obsaženého v templátové DNA. Úvodní denaturace probíhá při 94–98 °C maximálně 3 min. Čas i teplota mohou záviset na výrobci reagentů. V případě, že by byl čas delší, by mohla být DNA polymeráza inaktivována a její enzymatická aktivita zničena (Lorenz, 2012).

Denaturace je prvotním krokem PCR, kdy je rozdělena dvouvláknová DNA (dsDNA, *double-stranded DNA*) za vzniku dvou ssDNA. Rozdělení dsDNA je zapříčiněno zahřátím na teplotu okolo 95 °C (Rogers, 2010; Green a Sambrook, 2019). Teplota i doba potřebná k oddělení vodíkových vazeb mezi páry dusíkatých bází záleží na počtu GC páru a adenino-thyminového páru (AT, *adenin-thymine pair*) v sekvenci DNA. Při větším zastoupení GC párů je potřebná teplota vyšší, protože mají tři vodíkové vazby oproti AT párům majícím dvě. Ostatní vazby vlákna zůstávají netknuté, aby vznikla ssDNA sloužící jako templát pro další fázi cyklu (Analytical Methods Committee, 2014).

Ve druhém kroku PCR nasedají dva oligonukleotidové primery na cílovou sekvenci denaturované ssDNA. Přední primer nasedá na 3' konec a syntéza horního vlákna probíhá ve směru od 3' k 5'. Reverzní primer nasedá na 5' konec a syntéza spodního vlákna jde ve směru od 5' ke 3'. Aby k tomuto ději mohlo dojít, musí být původní teplota snížena na 55–70 °C. Teplota je ovlivněna například obsahem GC párů nebo délkou nasedajícího primeru. Při vysoké teplotě by nemuselo dojít k nasednutí primeru (Lorenz, 2012; Analytical Methods Committee, 2014; Green a Sambrook, 2019).

Poslední částí PCR je extenze či elongace, kdy od 3' konce primerů probíhá prodlužování řetězce a nasedá termostabilní DNA polymeráza. Ta začleňuje nukleotidy dle komplementarity na primery a syntetizuje tak vznik nového vlákna (Rogers, 2010; Green a Sambrook, 2019). V tomto kroku musí dojít ke zvýšení teploty, která závisí na použité DNA polymeráze v reakci. Optimální teplota pro Taq DNA polymerázu je okolo 72 °C (Lorenz, 2012; Ferrini, 2021). Celá reakce se opakuje přibližně 25–35krát a během jednoho cyklu dochází ke zdvojnásobení kopií cílové sekvence. Jedná se o exponenciální nárůst amplifikovaného templátu DNA (Analytical Methods Committee, 2014; Green a Sambrook, 2019).

Na konec je nastavena závěrečná extenze, při které zůstává zachováno teplotní cyklování, ale čas bývá prodloužen na 5 min a déle. Tento krok umožňuje dokončení probíhané syntézy neúplných PCR produktů. Zároveň termostabilní DNA polymeráza může přidat na vzniklé produkty PCR zbytek adeninu na 3' konec, který slouží pro případné molekulární klonování (Lorenz, 2012).

Celý proces se odehrává v programovatelném termocykleru, který dokáže regulovat dle jednotlivých kroků cyklu teplotu i čas. Konec nastane ve chvíli, kdy se pod limitující koncentraci dostanou deoxynukleotid trifosfáty, primery nebo DNA polymeráza (Analytical Methods Committee, 2014; Green a Sambrook, 2019).

Technika PCR dospěla v průběhu let k vývoji, aniž by se měnily základní principy. Posunem dopředu bylo zdokonalení výkonosti DNA polymeráz, dalších činidel a inovace v použitých plastových nádobách a instrumentaci, tak aby odolala změnám teplot v průběhu reakce (Thermo Fisher Scientific, 2023).

1.5.3 Základní složky PCR

Nedílnou součástí celého procesu jsou komponenty zajišťující správný průběh PCR reakce. Pro tento děj je zapotřebí mít sadu primerů (popř. sond), termostabilní DNA polymerázu, volné nukleotidy, templátovou DNA, reakční pufr, hořčnaté ionty, vodu bez obsahu nukleáz a DNA. Celá reakce dále probíhá v termocykleru, o kterém bylo psáno výše (Analytical Methods Committee, 2014; Green a Sambrook, 2019).

1.5.3.1 Primery

Primer je malý úsek DNA, který na ni nasedá. Takto označuje místo odkud začíná tvorba nového vlákna (NHGRI, 2023a). Návrh dvou sad primerů interagujících s vazebnými místy na obou stranách cílové komplementární DNA, závisí na faktorech, jako je teplota tání, zastoupení GC párů, délce cílové DNA, produkce sekundárních struktur a velikosti primerů. Jejich délka může mít vliv na rychlost hybridizace na DNA templát. Sekvence by pak měla v optimálním rozmezí okolo 18–22 párů bází (bp, *base pair*). Při velikosti nad 17 nukleotidů dochází k zamezení jejich chybného párování. Delší primery se používají zřídka, aby nebyl snížena účinnost PCR reakce (Analytical Methods Committee, 2014; Ferrini, 2021). Koncentrace primeru v reakci je standardně v rozmezí 0,1–1,0 μM (Czerny, 1996).

Teplota tání primerů (T_m , *melting temperature*) je definována jako teplota, při níž se polovina DNA rozděluje do dvouvláknové struktury, zatímco druhá polovina zůstává v jednovláknové podobě. Optimální teplota by měla být menší až o 2 $^{\circ}\text{C}$ oproti T_m , čímž se vyhneme případnému vzniku chyb při hybridizaci primerů s templátovou DNA. Navrhnutá dvojice primerů má podobnou T_m tak, aby k jejich nasednutí mohlo dojít současně. Teoreticky je možné T_m vypočítat z rovnice (1), kdy se počítá množství jednotlivých nukleotidů v primerové sekvenci (Denomme et al., 2000; Analytical Methods Committee, 2014). V této rovnici (1) je T_m teplota tání primerů, G je počet guaninů v sekvenci primeru, C je počet cytosinů v sekvenci primeru, A je počet adeninů v sekvenci primeru a T je počet thyminů v sekvenci primeru.

$$T_m = 4[G + C] + 2[A + T] \quad (1)$$

Ideální možností, jak optimalizovat teplotní podmínky pro nasednutí primerů, je zkušební provedení PCR, při které se určí teploty dle nejnižší teploty tání pro pár primerů a použijí se teploty v rozmezí 2–10 $^{\circ}\text{C}$ (Green a Sambrook, 2019).

Obsah GC je dalším důležitým hlediskem, které je potřeba zvážit. Pro stabilní vazbu primerů na ssDNA je ideální množství 40–60 % GC. Důvodem je pevnější vazba GC oproti AT. Velikost výsledného produktu PCR zaleží na jeho dalším použití a je velmi obtížné získat velkou cílovou DNA, protože se snižuje efektivnost amplifikace. V poslední řadě jde o možnou tvorbu sekundárních struktur DNA, kdy by docházelo k navázání jednoho primeru na druhý, spojení s totožným primerem, anebo se dokonce může vázat sám k sobě. Současně se také zabráňuje vzniku sekundárních struktur, které by ještě jinak mohly znemožnit vazbě na ssDNA (Analytical Methods Committee, 2014).

1.5.3.2 DNA polymeráza

Klíčovým enzymem pro spojení jednotlivých nukleotidů, kdy vzniká konečný produkt PCR, je DNA polymeráza (Garibyan a Avashia, 2013; Maheaswari et al., 2016). DNA polymeráza je kritickým prvkem PCR kvůli její schopnosti syntetizovat podle templátové ssDNA nové komplementární vlákno. Má polymerázovou aktivitu, jež na 3' koncích primerů připojuje nukleotidy, a tím prodlužuje vlákno ve směru 5' až 3' (Mandal, 2022).

DNA polymeráza byla poprvé izolována v roce 1956 z bakterie *Escherichia coli* a o tento objev se zasloužil Arthur Kornberger. Ten popsál její funkci, kdy ze základních kamenů, volných nukleotidů neboli deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP, *deoxynucleoside triphosphate*) je schopna syntetizovat nový řetězec DNA dle komplementárního templátového vlákna. V roce 1959 získal za tento objev Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství (Kornberg a Baker, 2005; Maga, 2019). Nevýhodou této polymerázy byla její citlivost na teplo, kdy docházelo k jejímu zničení při vysoké teplotě denaturace. Polymeráza proto musela být přidána v každém kroku cyklu PCR (Analytical Methods Committee, 2014; Thermo Fisher Scientific, 2023).

Důležitým pokrokem bylo nalezení termostabilní DNA polymerázy umožňující stabilitu reakce po delší dobu, a tím větší možnosti pro vylepšení metody. V roce 1976 byla izolována DNA polymeráza I z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymeráza, *DNA polymerase I from Thermus aquaticus*), nejznámější termostabilní DNA polymeráza. Odolnost vůči teplotě nad 75 °C umožnilo cyklování bez nutnosti přidání čerstvého enzymu, což dalo možnost automatizovat celý proces. Při porovnání Taq DNA polymerázy s klasickou DNA polymerázou byla zjištěno, že generované PCR produkty jsou delší a prokazují větší citlivost, specifitu a lepší výtěžek. Avšak i Taq DNA polymeráza má určité nedostatky. Nevýhodou je její relativní nestabilita nad 90 °C v průběhu denaturace. Větší problém je templát DNA obsahující větší množství GC nebo silné sekundární struktury, jež potřebují pro separaci vyšší

teploty. Dalším nedostatkem tohoto enzymu je chybějící možnost opravit nesprávně začleněný nukleotid při syntéze DNA. Tato omezení mohou vést k neschopnosti DNA polymerázy amplifikovat delší fragment. Tyto nedokonalosti posouvají dopředu další vývoj výkonnějších DNA polymeráz (Thermo Fisher Scientific, 2023). Taq DNA polymeráza se používá při teplotě 72 °C. Při této teplotě je schopna zařazovat nukleotidy rychlostí 2–4 kilobáze za minutu (Denomme et al., 2000).

Termostabilní DNA polymerázy existují dva hlavní typy, konkrétně typy A a B. DNA polymerázy typ A jsou původem z bakterií a patří sem DNA polymerázy izolované z organismů z rodů jako je *Thermus* nebo *Thermotoga*. Druhým typem jsou DNA polymerázy typu B, které jsou izolovány ze skupiny *Archea* a řádu *Thermococcales*. Do této skupiny patří např. DNA polymeráza z *Pyrococcus furiosus*. Nejvíce používané jsou polymerázy z rodu *Thermus* jako je Taq DNA polymeráza a DNA polymerázy izolované z *Thermus flavus* nebo *Thermus thermophilus*. V závislosti na svém původu vykazují DNA polymerázy odlišné vlastnosti (Špibida et al., 2017).

1.5.3.3 Ostatní

Pro správné fungování potřebuje termostabilní DNA polymeráza hořčnaté kationty. V PCR reakci je pro výtěžek velmi důležitá jejich koncentrace. Ta by měla být od 0,5 do 5,0 mM. Pokud je koncentrace hořčnatých iontů nízká, tak primery nasedají neúčinně na DNA templát. V opačném případě, při vysoké koncentraci Mg^{2+} , dochází ke stabilizaci při párování a amplifikací vzniklé duplexy se při zahřívání špatně denaturují (Lorenz, 2012; Green a Sambrook, 2019).

Deoxynukleosidtrifosfáty, dNTPs, jsou zastoupeny v reakční směsi běžné PCR v ekvimolárním poměru všech jednotlivých volných nukleotidů adenin, guanin, thymin a cytsinu. Poslední složky je pufr udržující správnou hodnotu pH a čistá templátová DNA, aby se předešlo možné kontaminaci snižující účinek. (Jalali, 2017; Green a Sambrook, 2019). Templát může pocházet z DNA genomové, plazmidové syntetické, mitochondriální nebo z ribonukleové kyseliny (RNA, *ribonucleic acid*) celkové, mRNA či mikro. RNA je pomocí reverzní transkripce přepsána do komplementární DNA (cDNA, *complementary DNA*). Ta následně může být využita v PCR reakci jako templát (Paul et al., 2010).

1.5.4 Vizualizace a detekce PCR produktů

Analyzované produkty z PCR je možné vizualizovat dvěma způsoby. Amplifikovaný DNA produkt lze barvit použitím chemického barviva umístěného mezi dva řetězce duplexu, tzv. interkalátory. Druhá metoda je založena na značení primerů či nukleotidů pomocí fluorescenčních barviv (fluoroforů) ještě před samotnou amplifikací, a to dává možnost začlenit značky přímo do vytvořeného produktu PCR, tzv. amplikonu (Garibyan a Avashia, 2013).

Pro analýzu těchto amplikonů je využívána elektroforéza v agarózovém gelu, která rozděluje DNA produkty na základě jejich náboje a velikosti. Principem tohoto děje je separace nabitých částic v elektrickém poli. Tyto částice DNA mají záporný náboj a vlivem elektrického pole migrují směrem ke kladné elektrodě neboli anodě (Garibyan a Avashia, 2013; Jalali, 2017). Gelová elektroforéza je považována za jeden z nejjednodušších způsobů pro vizualizaci a také analýzu vzniklého produktu. Ten je na agarózový gel nanášen společně s molekulovým markerem o známé velikosti pro ulehčení stanovení velikosti vytvořeného produktu z PCR (Garibyan a Avashia, 2013). Gelová elektroforéza je rychlá, rutinní a dobře dostupná technika pro řadu diagnostických metod a oborů jako biochemie, molekulární biologie, genetika a forenzní věda. Následná detekce nukleových kyselin probíhá za pomoci specificky navázaných chemických barviv v UV transiluminátoru (Cunha et al., 2020).

Standardní PCR využívá k detekci amplifikovaného produktu elektroforézu, kdy detekci dochází v tzv. koncovém bodu PCR, čímž je zakončena závěrečná neboli *plateau* fáze celé reakce (Mo et al., 2012). Pokud je prokazováno, zda je produkt DNA přítomen anebo nepřítomen, tak dochází k tzv. kvalitativní PCR. Ta je využívána pro identifikaci možných patogenů nebo pro potřeby klonování (Garibyan a Avashia, 2013).

Jak již bylo zmíněno, pro kvantifikaci PCR produktu se používají dva způsoby detekce. Fluorescenční barviva interkalující s dsDNA a fluorescenční sondy specifické pro sekvenci DNA (Garibyan a Avashia, 2013). Příkladem často používaného interkalačního chemického barviva je ethidium bromid. Mezi další DNA vázající barviva patří také např. EvaGreen nebo SYBR Green I, které umožňují identifikaci produktů PCR (Navarro et al., 2015).

Fluorescenční sondy jsou oligonukleotidy značené fluoroforem a detekují pouze specifické amplikony. Fluorofory jsou fluorescenční molekuly absorbující světelnou energii o dané vlnové délce a následně emitují světlo o vlnové délce delší. Dvě varianty fluoroforů jsou reportér nebo donor a zhášeč či akceptor. Donorový fluorofor absorbuje světelnou energii, čímž se dostává do excitačního stavu a následně se deexcituje do základního energetického stavu. Během toho dochází k emisi energie v podobně fluorescence, která je přenesena na blízký akceptorový fluorofor. Tento přenos energie z donoru na akceptor bývá definován jako přenos

energie fluorescenční rezonancí (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Mechanismus FRET lze rozdělit dle způsobu, jakým je přenesená energie na akceptor rozptýlena. Při FRET-zhášení je energie z nefluorescenční molekuly neboli zhášeče uvolněna v podobě tepla. V druhém případě FRET je molekula akceptoru fluorescenční a emituje energii jako fluorescenci (Navarro et al., 2015; Artika et al., 2022). Do této skupiny řadíme sondy hydrolyzační, duální hybridizační, scorpion a molekulární majáky (Arya et al., 2005).

Hydrolyzační sondou je například sonda TaqMan. Ta má na 5' konci fluorescenční skupinu a na 3' konci zhášeč, který v neporušené sondě zháší emitovanou fluorescenci. Navázaná hydrolyzační sonda je v průběhu extenze degradována 5' exonukleázovou aktivitou Taq DNA polymerázou. Oddělením reportéru a zhášeče dochází k uvolnění fluorescence (Navarro et al., 2015; Artika et al., 2022).

Duální hybridizační sondy jsou dvě hybridizační sondy, jedna s donorovým fluoroforem na 3' konci a druhá s akceptorovým fluoroforem na svém 3' konci. Obě sondy s cílovou sekvencí hybridizují po denaturaci. Donor a akceptor se dostávají do těsné blízkosti a dochází k přenosu energie. Tímto typem jsou FRET sondy (Arya et al., 2005; Artika et al., 2022).

Scorpion sonda a molekulární maják jsou sondy obsahující na každém konci ssDNA buď reportér nebo zhášeč. Oba typy sond tvoří smyčku, která udržuje reportér a zhášeč blízko u sebe a energie není emitována. Molekulární maják hybridizuje s cílovou DNA, čímž dochází ke změně konformace ze smyčky do lineární podoby. Reportér a zhášeč se od sebe vzdálí a fluorescence je uvolněna. U Scorpion sondy dochází k prodlužování jejího primeru a vzniká amplikon. Následně dojde k otevření smyčky sondy, aby mohla hybridizovat s cílovou sekvencí. Reportér a zhášeč jsou odděleny a je detekován signál (Arya et al., 2005; Navarro et al., 2015; Artika et al., 2022).

1.5.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Při kvantitativní PCR (qPCR, *quantitative PCR*) nebo též nazývanou jako real-time PCR, tedy PCR reakci v reálném čase, jsou kroky amplifikace a detekce PCR spojeny do jednoho kroku. Oproti klasické PCR ta qPCR nevyžaduje postamplifikační analýzy jako je elektroforéza v agarózovém gelu, ale ke kvantifikaci amplikonu dochází v průběhu reakce, tzv. v reálném čase (Jalali, 2017). Konkrétně je amplikon detekován v růstové exponenciální fázi, čímž je přesnější a jednodušší kvantifikování DNA a RNA oproti klasické metodě. Lze teoreticky a kvantitativně určit poměr mezi množstvím počátečního vzorku a výsledného produktu PCR na konci libovolného počtu cyklů (Mo et al., 2012). Benefity real-time PCR

oproti klasické PCR jsou větší přesnost, citlivost, rychlost a kvantifikace. Přesná kvantifikace mRNA má velký význam hlavně pro analýzu genové exprese (Artika et al., 2022).

1.5.6 Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

Kvantitativní PCR je možné spojit s polymerázovou řetězovou reakcí s reverzní transkripcí (RT-PCR, *Reverse transcription-polymerase chain reaction*), jež zprostředkovává přepis mRNA do cDNA, která je kvantifikována metodou qPCR (Garibyan a Avashia, 2013).

Reverzní transkripce se odehrává s využitím enzymu reverzní transkriptázy a jedná se tak o opačný proces běžné probíhající transkripce, při které dochází k přepisu z RNA do DNA (Mo et al., 2012).

Sekvenci templátové RNA pro přepis lze získat purifikací z různých biologických vzorků. V průběhu extrakce a manipulace s RNA je třeba brát ohled na její nestabilitu. Enzymy reverzní transkriptázy jsou RNA dependentní DNA polymerázy. Odvozeny jsou od retrovirů, jež mají schopnost syntetizovat jednovláknovou cDNA z původního komplementárního templátu. Získaná cDNA se pak používá jako templát pro PCR reakci (Best a Roberts, 2014).

RT-PCR je nenákladná a relativně jednoduchá metoda používaná pro stanovení míry genové exprese cílových genů a má široké využití v biomedicíně výzkumu. qPCR dává možnost amplifikovaný produkt detekovat v růstové exponenciální fázi celé reakce (Mo et al., 2012). Tuto metodu lze provést dvěma způsoby. Buď reverzní transkripce a PCR reakce probíhá v jednom kroku ve stejné zkumavce, nebo obě reakce probíhají odděleně ve dvou krocích postupně za sebou (Bachman, 2013; Ferrini, 2021).

Pro celý děj je základem izolace kvalitní a nepoškozené RNA. Jedná se o kritický bod celé analýzy, protože RNA je velmi náchylná k degradaci kvůli všudypřítomným RNázám. Při izolaci RNA je velký důraz kladen na čistotu. Kvalitní, vysoce čistá výchozí RNA je nepostradatelná pro úspěšnou analýzu RT-PCR (Mo et al., 2012; Best a Roberts, 2014; Ferrini, 2021).

1.5.7 Další modifikace polymerázové řetězové reakce

Mezi další modifikace PCR reakce řadíme multiplexní PCR, PCR s horkým startem, nested PCR nebo například touchdown PCR.

Multiplexní PCR je metoda, při které dochází v jedné reakci k namnožení více různých cílů. Aby to bylo umožněno, tak se při analýze využívá více primerových sad, které jsou specificky namířeny na odlišné sekvence DNA. Benefitem této modifikace je minimalizace

požadovaného objemu vzorku pro reakci a současně není potřeba více reakčních nádob (Maheaswari et al., 2016).

Při PCR s horkým startem je navýšen čas počáteční denaturace a tento krok lze zařadit do klasického cyklu PCR reakce. Tato univerzální úprava postupu přinesla větší výtěžek amplikonu a současně větší specifitu reakce (Lorenz, 2012). Hlavní předností této metody je zamezení nespécifického zmnožení DNA v krocích PCR probíhajících při nižší teplotě. Nejprve dochází k zahřátí reakční směsi na 95 °C, což je teplota tání DNA. Následně je přidána DNA polymeráza (Gupta, 2019).

Nested PCR vyžaduje dvě sady primerů, vnější a vnitřní. Obě sady amplifikují stejnou oblast DNA (Lorenz, 2012). Metoda je složena ze dvou po sobě jdoucích kroků PCR. První pár primerů je použit v první reakci generující amplikon. Tento PCR produkt slouží jako templát pro druhý pár primeru (Maheaswari et al., 2016). Nested PCR zvyšuje specifitu amplifikace a zabráňuje tvorbě nespécifické vazby PCR produktu, která vzniká amplifikací nepředpokládaných míst pro vazbu primerů (Best a Roberts, 2014).

Při touchdown PCR je teplota v cyklu nasedání primerů na začátku vyšší o 10 °C než je T_m . Postupně dochází v průběhu každého cyklu k jejímu snižování. Na konci je teplota nižší o 2–5 °C než je vypočítaná T_m (Green a Sambrook, 2018). Výhodou této metody je větší specifita pro navázání primeru při vyšší teplotě a účinnější amplifikace umožněná nižší teplotou (Gupta, 2019).

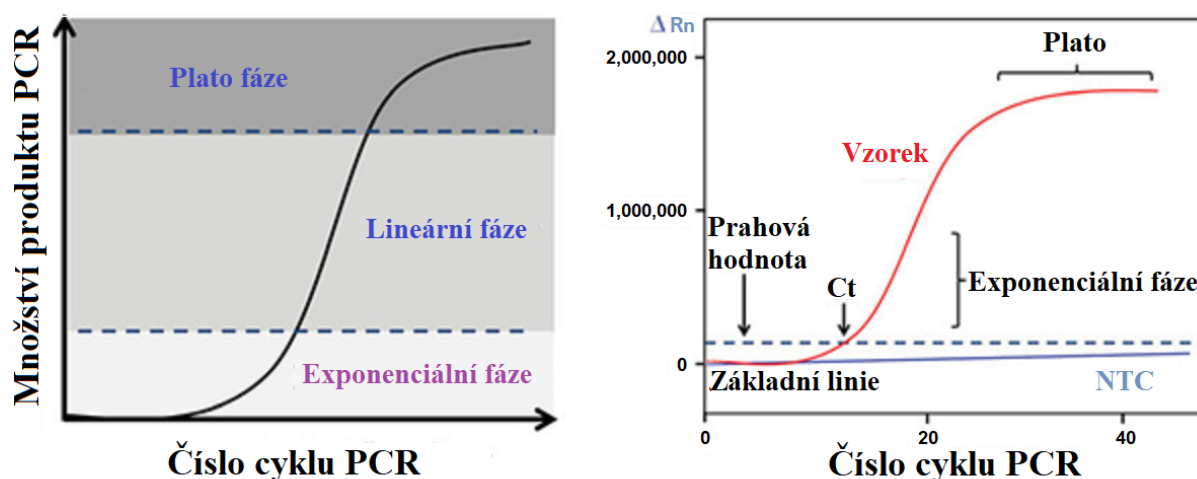
1.5.8 Vyhodnocení genové exprese

Pro laboratoře molekulárně biologické je určení míry genové exprese jedním ze základních vyšetření. Umožňuje to kvantifikovat expresi konkrétního genu při analýze množství RNA v buňce. Exprese genu se liší gen od genu a současně je také odlišná pro různé buňky. Ovlivnit ji lze i použitím rozdílných experimentálních podmínek. Příkladem hodnocení genové exprese je určení množství proteinu, míru transkripce genu, pozorování jejich rozdílů u patologických nebo fyziologických stavů, změny při diferenciaci buněk a mnoho dalších (Schmittgen a Livak, 2008).

Pro kvantifikaci změn genové exprese se nejvíce využívá qPCR a RT-PCR. Pro vyhodnocení jejich dat se používají dva postupy. Prvním z nich je absolutní kvantifikace, kdy se dle standardní křivky zjišťuje množství genu na počátku. Množství kopií zájmového genu se vypočítá ze signálu PCR reakce, který je dán právě standardní křivkou. Druhým z nich je relativní kvantifikace, která určuje změnu exprese genů v porovnání s referenčním vzorkem. Tím může být vnitřní kontrola genu nebo kalibrátor. Druhý postup, relativní kvantifikace,

je snadnější a není potřeba velkého počtu činidel jako u kvantifikace absolutní. Relativní množství genu má větší hodnotu než stanovení přesných čísel, a proto je relativní kvantifikace prováděna velmi často. Do relativní kvantifikace patří metoda delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, *delta-delta Ct method*) (Schmittgen a Livak, 2008; Rao et al., 2013).

Při qPCR reakci je detekováno množství PCR produktu na konci každého cyklu, kdy je generován signál a dochází k nárůstu fluorescence mimo šum pozadí. Prahová hodnota cyklu (Ct, *cycle of treshold*) je označení pro číslo cyklu PCR, kdy je možné rozlišit signál od pozadí šumu. Vyšším vstupním množstvím templátu lze vytvořit větší množství amplikonu, který je detekován rychleji a tím je dosaženo výsledné Ct dříve, což vede k nižší hodnotě Ct (Stephenson, 2016). Množství PCR produktu je tedy nepřímo úměrné Ct (Schmittgen a Livak, 2008). Na obrázku č. 10 je znázorněna amplifikační křivka qPCR. ΔRn je signál fluorescence, který je dán rozdílem fluorescence amplikonu v daném časovém bodě a fluorescence základní linie, Ct označuje prahovou hodnotu cyklu (Artika et al., 2022).



Obrázek 10: **Amplifikační křivka.** Ct – prahová hodnota cyklu; ΔRn – signál fluorescence; NTC – negativní kontrola. Převzato z (Nassiri et al., 2018).

Jak bylo uvedeno dříve, tak delta-delta Ct metoda je možností relativní kvantifikace, jež bývá součástí softwarů pro analýzu qPCR. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoda pro výpočet relativní exprese genů v kontrolních a cílových vzorcích používá Ct danou tímto systémem. Jako referenční geny se používají tzv. housekeepingové geny, jejichž exprese bývá stabilní i po působení jakékoliv léčby. Takovým genem je například glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoda lze vypočítat z rovnice (2.1) (Rao et al., 2013). V rovnici (2.1) je R poměr relativní exprese genu a $\Delta\Delta Ct$ je prahová hodnota cyklu. Ta je získána z rovnice (2.2) a je dána rozdílem ΔCt prahové hodnoty cyklu cílového genu a ΔCt referenčního vzorku v podobě příslušného kontrolního vzorku. Jednotlivé ΔCt

hodnoty jsou vypočítány z rovnice (2.3) a jsou dány rozdílem Ct prahové hodnoty cílového a referenčního genu.

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (2.1)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{cílový gen}) - \Delta Ct (\text{referenční vzorek}) \quad (2.2)$$

$$\Delta Ct = Ct (\text{cílový gen}) - Ct (\text{referenční gen}) \quad (2.3)$$

1.5.9 Aplikace

Jak už bylo zmíněno výše, objev metody PCR a následný rozvoj dalších technik založených na tomto principu způsobil převrat v biologických vědách s přesahem do dalších oborů od medicíny až po otázky týkající se životního prostředí. Má široké využití při diagnostice genetických mutací a onemocnění, ve forenzních vědách, virologii či bakteriologii, a i veterinárního lékařství, životního prostředí nebo v potravinovém průmyslu (Deepak et al., 2007).

Nepostradatelnou se PCR stala pro moderní molekulární biologii a vědecký výzkum. Umožnila zkoumat buněčné i molekulární procesy nejen v oblasti molekulární biologie, ale i jiných oborech. Metoda PCR se stala součástí i dalších technik a zprostředkovala tak možnost zkoumat genovou transkripci, genotypizaci klonování a mutagenezi, sekvenování (Ferrini, 2021).

Genová transkripce dala možnost zkoumat varianty transkripce genů u buněčných typů, tkání a organismů. Genotypizace slouží pro detekci sekvenčních variant v alelách specifické pro danou buňku nebo organismus. Široké použití má PCR při sledování mutací nebo klonování. Klonování je technika, kdy jsou fragmenty dsDNA získané amplifikací vkládány do vektorů. Současně může templátová DNA být použita pro sekvenování, které se stalo základní metodou nejen pro molekulárně-biologická odvětví (Ferrini, 2021).

2 CÍLE PRÁCE

1. Návrh oligonukleotidů pro detekci N-acetyltransferáz a referenčních genů.
2. Optimalizace podmínek pro použití oligonukleotidů pro metodu RT-PCR.
3. Použití metody RT-PCR pro detekci genové exprese N-acetyltransferáz u HK-2 buněk ovlivněných acetaminofenem a cisplatinou.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní pomůcky, přístroje a software

Pomůcky

- Automatické jednobanální pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifugační zkumavky (objem 15 mL; BioTech, Korea)
- Elektroforetický set (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio Rad, Česká republika)
- Kultivační lahve NUNC T75 s filtrem (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Mikrotitrační destička 6jamková (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Mikrozskumavky; objem 0,2; 1,5; 2,5; 5 mL (Eppendorf, Německo)
- Jednorázový plastový spotřební materiál: špičky, rukavice (Eppendorf, Německo)

Přístroje

- Analytické váhy (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Autokláv Tuttnauer ELV 3850 (Tuttnauer, USA)
- Biometra termocykler PCR (Biometra, Německo)
- Centrifuga 35R (Hettich, Německo)
- Centrifuga Mikro 20 (Hettich, Německo)
- CO₂ inkubátor (PHCbi, Japonsko)
- Cykler pro RT-PCR Rotor-Gene 3000 (Qiagen, Německo)
- DNA/RNA UV purifikační box UVC/T-AR (Biosan, Lotyšsko)
- Germicidní lampa Ultraviol NBVE110PL (Ultraviol, Polsko)
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (4 °C, -20 °C; Liebherr, Německo)
- Laminární box (Jouan, Francie)
- Mikrovlnná trouba (LG, Jižní Korea)
- Mraznička (-80 °C; Liebherr, Německo)
- NanoQuant Plate™ (Tecan, Rakousko)
- Počítačka buněk Z2 (Beckman, USA)
- Spektrofotometr a spektrofluorimetr Spark (Tecan, Rakousko)
- Stolní počítač (Hewlett-Packard, USA)
- Suchá lázeň s fixním blokem TDB-100 (Biosan, Lotyšsko)
- UV stanice Syngene G: BOX F3 (Syngene, USA)

- UV transiluminátor (Vilber Lourmant, Francie)
- Vortex (Heidolph, Německo)
- Výrobek ledu (EVERmed, Itálie)
- Zdroj proudu pro elektroforézu PowerPRO 300 (Cleaver Scientific Ltd, UK)

Software

- GeneSys (Syngene, USA)
- Microsoft Office – Excel (Microsoft, USA)
- Microsoft Office – Word (Microsoft, USA)
- OriginPro 9.0.0. (OriginLab, USA)
- Primer-BLAST (NCBI, USA)
- Rotor-Gene 6 (Qiagen, Německo)
- Tecan SPARKCONTROL (Tecan, Rakousko)

3.2 Seznam použitých chemikálií

- 1-bromo-3-chlorpropan (C_3H_6BrCl , $M_r=157,44$ g/mol; Merck, USA)
- Acetaminofen (APAP, $M_r= 151,1626$ g/mol; Merck, USA)
- Agaróza (Merck, USA)
- Kit pro reverzní transkripci gb Basic Reverse Transcription Kit (Generi Biotech, Česká republika)
- Cisplatina (CisPt; $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$; $M_r = 300,1$ g/mol; Merck, USA)
- Deionizovaná voda (Lonza, Belgie)
- Diethyl pyrokarbonát (DEPC; Merck, USA)
- Modifikované Eaglovo médium dle Dulbecca F-12 (1:1; DMEM/F-12; Merck, USA)
- EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara Bio, USA)
- Ethanol (EtOH, C_2H_5OH ; $M_r = 46,07$; Merck, Německo)
- Ethidium bromid (10 mg/mL; Top-Bio, Česká republika)
- Fetální bovinní sérum (FBS; Gibco, USA)
- Fosfátový pufovaný fyziologický roztok 10X (PBS 10X; Gibco, USA)
- gb SG Master Mix (Generi Biotech, Česká republika)
- Insulin/transferin/seleničitan sodný (ITS; Merck, USA)
- Izopropanol (C_3H_8O , $M_r=60,10$ g/mol; Merck, USA)

- Marker GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Penicilin/streptomycin (P/S; Gibco, USA)
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio; Česká republika)
- Pyruvát sodný (PYR; Gibco, USA)
- Rekombinantní epidermální růstový faktor (EGF; Gibco, USA)
- RNázový dekontaminační roztok RNázaZap (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Roztok Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Sterilní voda (Gibco, USA)
- Tris-borát-EDTA pufr (TBE pufr; Merck, USA)
- Trizol reagent (Merck, USA)

3.3 Biologický materiál

Immortalizovaná buněčná linie lidských ledvinných proximálních tubulárních buněk HK-2 (ATCC CRL-2190, USA).

3.4 Oligonukleotidy (5' - 3')

NAT1_F	GCC AGG AAG AAG CAG CAA TC
NAT1_R	CTC AAA GGG AAC AGC TCG GA
NAT2_F	TAC AGA CCT TGG AAG CAA GAG G
NAT2_R	AAG GGA ACA GCC CGG ATC T
GAPDH_F	GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC
GAPDH_R	ATC CGT TGA CTC CGA CCT TC

3.5 Příprava roztoků

Zásobní roztok APAP (10 mM): Roztok jsme připravili rozpuštěním 0,0075 g APAP v 5 mL kultivačního média. Roztok jsme připravovali vždy čerstvý.

Pracovní roztoky APAP (1; 5; 10 mM): Pracovní roztoky o koncentraci 1 a 5mM jsme připravili ze zásobní roztoku APAP 10 mM. Roztok o koncentraci 1 mM jsme připravili smícháním 0,4 mL zásobního roztoku a 3,6 mL kultivačního média. Roztok o koncentraci 5 mM jsme namíchali ze 2 mL zásobního roztoku a 2 mL kultivačního média. Roztoky jsme připravili před každým experimentem čerstvé.

Zásobní roztok CisPt (1 mM): Navážku 0,015 g CisPt jsme rozpustili v 5 mL deionizované vody. Roztok jsme skladovali při 4 °C.

Pracovní roztoky CisPt (5; 50 μM): Ze zásobního roztoku CisPt 1mM jsme nachystali pracovní roztoky o koncentraci 5 a 50 μM. 5 μM roztok jsme připravili smícháním 25 μL zásobního roztoku a 4975 μL kultivačního média. 50μM roztok jsme namíchali ze 250 μL zásobního roztoku a 4750 μL kultivačního média. Roztoky jsme připravovali před každým experimentem čerstvé.

Pracovní roztok DEPC voda: DEPC vodu jsme nachystali smísením 500 mL destilované vody a 500 μL DEPC. Ponechali jsme 24 hod stát při laboratorní teplotě a následně sterilizovali v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Pracovní roztok EtOH (75 %): EtOH jsme připravili smícháním 757 mL 99% EtOH a 243 mL deionizované vody. Roztok jsme skladovali za pokojové teploty.

Inaktivační médium: Inaktivační médium namíchali ze 100 mL media DMEM F-12 a 10 mL FBS.

Pracovní roztok PBS (1X): Roztok jsme si naředili z 10 mL PBS 10X a 10 mL sterilní vody.

Zásobní roztok TBE pufr (10X): Navážky 108 g báze Tris, 55 g kyseliny borité, 9,3 g Na₂EDTA jsme rozpustili v deionizované vodě a doplnili na objem 1000 mL.

Pracovní roztok TBE pufr (1X): TBE pufr 1X jsme připravili smícháním ze 100 mL TBE pufr 10X a 900 mL deionizované vody.

3.6 Kultivace HK-2 buněk

Buněčnou linii HK-2 jsme kultivovali v kultivačním médiu DMEM F-12 (1:1) a přidali jsme do něj další obohacující složky jako je 5% (v/v) FBS, 10 μg/mL inzulinu, 1 mM PYR, 5 ng/mL seleničitanu sodného, 5,5 μg/mL transferinu, 5 ng/mL EGF a 50 μg/mL P/S. Každé 4 dny jsme vyměnili kultivační médium za čerstvé. Po dosažení 70% konfluency jsme buňky pasážovali. Jejich celkové množství jsme určili pomocí počítačky buněk Z2 (Beckam Coulter,

USA). Buněčnou suspenzi jsme dále ředili kultivačním médiem dle potřeby pro příslušné experimenty. Pro všechny experimenty jsme používali buňky ze 7. a 15. pasáže.

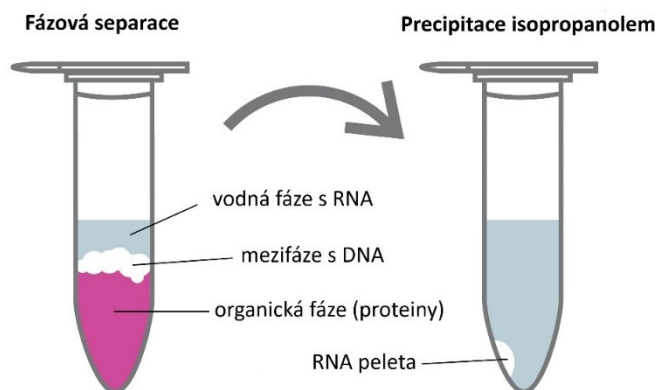
Pro analýzy jsme HK-2 buňky nasadili do 6jamkových destiček v počtu $1-2 \cdot 10^6$ buněk na jamku ve 2 mL kultivačního média. Takto jsme je ponechali 24 hod v CO₂ inkubátoru při 37 °C, aby přisedly na dno destičky. Po uplynutí času jsme původní kultivační médium odsáli a buňky ovlivnili 2 mL roztoku APAP (1; 5 a 10 mM) a CisPt (5 a 50 μM). Buňky jsme inkubovali s toxiny dalších 24 hod. Následně jsme buňky uvolnili ze dna destičky pomocí 1 mL trypsinu a inkubovali 5 min v termostatu vyhřátém na 37 °C. Následně jsme přidali 1 mL inaktivačního média, které inhibovalo působení trypsinu. Obsah jamek jsme přenesli do centrifugačních zkumavek. Jamky mikrotitrační destičky jsme opláchli 1 mL roztoku PBS 1x, také prepipetovali do příslušných centrifugačních zkumavek a centrifugovali 5 min při 1500g. Poté jsme odsáli supernatant a pelety zamrazili na -80 °C.

3.7 Práce s RNA

RNA je nestabilní a rychle degradovatelná RNázami, které se běžně nachází v okolním prostředí. Případné kontaminaci se lze vyhnout dodržováním určitých pravidel. Izolace RNA jsme prováděli v prostorách laboratoře vyhrazených pouze pro práci s RNA. Tuto místnost jsme před i po práci nechali vysvítit pomocí germicidních lamp Ultraviol NBVE110PL (Ultraviol, Polsko), zavírali jsme dveře a během práce docházelo k filtraci vzduchu pomocí systému vzduchotechniky. Samotnou práci jsme prováděli v laminárním boxu (Jouan, Francie) s vlastním prouděním vzduchu a vlastními UV lampami, kterými jsme nechali vysvítit box před i po ukončení práce. Stejně požadavky jsme kladli i na laboratorní pomůcky. Špičky, zkumavky a další pomůcky jsme sterilizovali v autoklávu Tuttnauer ELV 3850 (Tuttnauer, USA). Vždy jsme pracovali v rukavicích, používali pipety určené na práci s RNA, DEPC vodu, chemikálie bez RNáz a hlavně RNázový dekontaminační roztok RNázaZap, kterým jsme otírali veškeré povrchy, pomůcky a materiály před použitím.

3.8 Izolace RNA

Při izolaci RNA pomocí činidla Trizol dochází vlivem centrifugace k separaci na horní vodnou fázi s RNA, mezifázi s DNA a organickou fázi s proteiny. RNA vlivem izopropanolu precipituje a dochází k vytvoření pelety. Schéma izolace RNA je znázorněno na obrázku č. 11.



Obrázek 11: **Schéma izolace RNA.** Upraveno dle (Zymo Research, 2024).

Zamražené pelety HK-2 buněk, které byly ovlivněny APAP (1–10 mM) a CisPt (5–50 μM) po dobu 24 hod, jsme použili pro izolaci RNA. Do každé zkumavky jsme přidali Trizol a 1-bromo-3-chlorpropan, jejichž pipetované objemy závisely na počtu buněk v peletě, jak je znázorněno v tabulce č. 2. Zkumavky jsme promíchali na vortexu a ponechali inkubovat 10 min při pokojové teplotě. Následně jsme je centrifugovali po dobu 15 min při 12000g a teplotě 4 °C. Po vytažení z centrifugy jsme přenesli horní fáze RNA do nových mikrozkuvek a přidali příslušný objem izopropanolu.

Tabulka 2: **Objemy pipetovaných reagentů pro izolaci RNA.**

Počet buněk	Trizol (μL)	1-bromo-3-chlorpropan (μL)	Izopropanol (μL)
$1 \cdot 10^6$	100	10	50
$2 \cdot 10^6$	200	20	100

Následně jsme obsah mikrozkuvek promíchali na vortexu, ponechali srážet v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min a mikrozkuvky znovu centrifugovali (12000g, 10 min, 4 °C). Poté jsme odstranili supernatant a pelety omyli 1 mL 75% EtOH. Vzorky jsme promíchali na vortexu a centrifugovali (12000g, 5 min, 4 °C). Přebytečný supernatant jsme odstranili a peletu nechali oschnout 5 min na vzduchu. V dalším kroku jsme peletu resuspendovali ve 40 μL DEPC vody a vložili na 10 min do termobloku vyhřátého na 60 °C. Po uplynutí požadované doby jsme napipetovali 2 μL jednotlivých vzorků RNA do pozic ve speciální kovové destičce NanoQuant PlateTM (Tecan, Rakousko). Destičku je možné vidět na obrázku č. 12. Současně jsme přidali ve stejném objemu dva blanky (slepé vzorky), kterými byla DEPC voda. Destičku jsme uzavřeli a vložili do spektrofluorimetru Spark (Tecan,

Rakousko). V softwaru Tecan SPARKCONTROL (Tecan, Rakousko) jsme navolili kvantifikaci nukleových kyselin a konkrétně zvolili měření RNA. Nejdříve dochází ke změření hodnot blanku, které nám určily hodnotu pozadí a poté jsou proměřeny samotné vzorky RNA. Měření koncentrace a čistoty RNA probíhá při vlnových délkách 260 a 280 nm. Část získané RNA HK-2 buněk jsme použili pro reverzní transkripci a zbytek jsme uložili do mrazáku s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 12: Destička NanoQuant Plate™.

3.9 Reverzní transkripce

Při reverzní transkripci je vlivem reverzní transkriptázy RNA přepisována do cDNA. Vzniklá cDNA je složena pouze z kódujících oblastí, tj. exonů.

Pro reverzní transkripci jsme použili Kit pro reverzní transkripci gb Basic Reverse Transcription Kit. Sada obsahuje Mix A a Mix B, jejichž smícháním vzniká Basic Reverse Transcription Master Mix. Ze zkumavky Mix A jsme přenesli $200\text{ }\mu\text{L}$ do zkumavky Mix B. Do reakční směsi jsme použili $10\text{ }\mu\text{L}$ Basic Reverse Transcription Master Mixu. Z izolované RNA jsme použili maximálně $10\text{ }\mu\text{L}$ vzorku RNA tak, abychom dávkovali 1000 ng RNA dle výrobce. Dle množství přidaného vzorku jsme reakci doplnili PCR vodou tak, aby objem celé reakční směsi byl $20\text{ }\mu\text{L}$. Takto vytvořené zkumavky jsme promíchali a následně inkubovali v termobloku po dobu 60 min při teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a cDNA vzniklou reverzní transkripcí jsme do použití uchovávali v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.10 Návrh oligonukleotidů

Krátké oligonukleotidy neboli primery označují místo, odkud dochází k replikaci DNA nebo RNA a je to místo pro nasednutí DNA polymerázy. Obvykle se používá pár primerů, přední a reverzní primer.

V biomedicínské databázi Národní centrum pro biotechnologické informace (NCBI, Nation Center for Biotechnology Information) jsme vyhledali referenční sekvence sledovaných lidských genů NAT1 (NM_000662.8) a NAT2 (NM_000015.3) a dále pro referenční gen GAPDH (NM_002046.7). Použili jsme mRNA sekvenci, která obsahuje pouze exony. Vložili jsme ji do softwaru Primer-BLAST (NCBI, USA) pro návrh primerů a navolili další požadovaná kritéria jako je teplota tání v rozmezí 58–62 °C a požadovanou délku PCR produktu 100 bp. T_m by měla být téměř totožná. Primery by vůči sobě měly mít nízkou vzájemnou komplementaritu, aby nedocházelo k jejich párování. Pokud to bylo možné, tak byly primery navrženy tak, aby se nacházely ve dvou různých exonech daného genu.

3.11 Gradientová PCR

Gradientová PCR slouží pro stanovení optimální teploty nasednutí primerů. Teplotní gradient umožňuje testovat více různých teplot pro nasedání primerů v rámci jedné analýzy.

Pro optimalizaci podmínek nasednutí primerů jsme použili EmeraldAmp GT PCR Master Mix. Tento Master Mix obsahuje DNA polymerázu, dNTP, optimalizovaný reakční pufr, $MgCl_2$ a zelené barvivo pro následnou elektroforézu. Celkový objem jedné reakce byl 12 μL a objemy jednotlivých reagensů jsou uvedeny v tabulce č. 3. Koncentrace primeru v reakci gradientové PCR byla 0,42 μM . Pro negativní kontroly (NTC) bylo v reakci místo templátu cDNA použito 0,5 μL dH_2O .

Tabulka 3: Objemy pipetovaných reagensů pro gradientovou PCR.

Reagencie	Objem v reakci (μL)
EmeraldAmp GT PCR Master Mix	6
Přední primer	0,5
Reverzní primer	0,5
dH_2O	4,5
Templát cDNA	0,5

Po smíchání všech reagensů jsme je důkladně promíchali a vložili do termocyklu Biometra PCR (Biometra, Německo) s nastaveným teplotním profilem. Úvodní denaturace probíhala při 98 °C 2 min. Následoval 35krát se opakující cyklus denaturace při teplotě 98 °C a 10 s, nasednutí primerů v gradientu teplot v rozmezí od 51–58 °C, 30 s; extenze při 72 °C po dobu 30 s. Závěrečná extenze probíhala při 72 °C a trvala 5 min. Gradient teplot pro nasedání primerů je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Teplotní gradient pro gradientovou PCR.

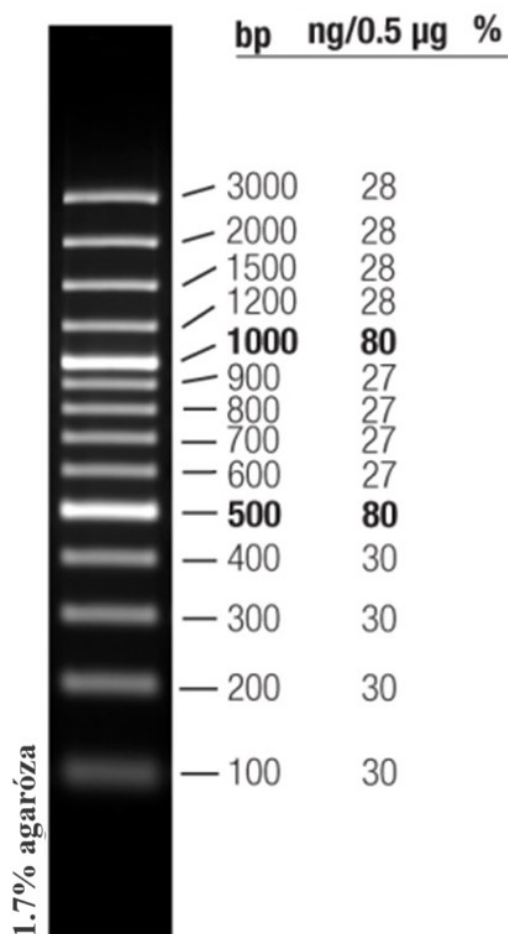
Pozice	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Teplota (°C)	51	51,2	51,8	52,6	53,5	54,4	55,4	56,3	57,2	58

3.12 Elektroforéza

Pro vizualizaci produktů z gradientové PCR jsme provedli elektroforézu v agarózovém gelu. Při této metodě dochází k separaci PCR produktů v agarózovém gelu na základě jejich velikosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Do gelu se přidává EtBr, který slouží jako interkalátor a absorbuje záření při vlnové délce 260 a 360 nm. Následně pak emituje oranžovo-červené světlo o vlnové délce 590 nm. Rozdělené látky je tedy možné detekovat pomocí UV záření.

V závislosti na velikosti použité elektroforetické vany jsme připravili agarózový gel pro elektroforézu. Například pro velkou vanu o objemu 120 mL jsme pro vytvoření 1,2% agarózového gelu navážili 1,44 g agarózy, jenž jsme resuspendovali ve 120 mL TBE pufru 1X a následně zahřáli na 2 min v mikrovlnce při maximálním výkonu. Po ochlazení jsme přidali 10 µL EtBr, promíchali a nalili do nosiče na gel utěsněného v předem připravené elektroforetické vaně. Zkontrolovali jsme případné bublinky vzduchu, které by mohly ovlivnit průchod vzorku gelem, vložili jsme hřeben a ponechali tuhnout cca 60 min. Po zatuhnutí a vytažení hřebene jsme elektroforetickou vanu po rysku naplnili TBE pufrem 1X. Vzorky jsme mohli dávkovat přímo do příslušných pozic, protože součástí EmeraldAm GT PCR Mater Mix je i zelené barvivo, které se rozdělí v agarózovém gelu na žluté a modré barvivo. Dávkovali jsme 10 µL vzorků, a nakonec jsme přidali na začátek 8 µL markeru GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder o určené velikosti fragmentů pro pozdější vyhodnocení. Marker je znázorněn na obrázku č. 13. Elektroforetickou vanu jsme uzavřeli víkem a kabely zapojili do zdroje. Elektroforézu jsme nechali běžet při napětí 180 V po dobu 60 min nebo dle potřeby. Současně jsme provedli elektroforézu, jejíž součástí byly negativní kontroly pro všechny teploty z tabulky č. 4. Po ukončení elektroforézy a odpojení od zdroje jsme gel vyjmuli z nosiče na gel a produkty

detekovali pomocí UV transiluminátoru (Vilber Lourmant, Francie) nebo UV stanice Syngene G: BOX F3 (Syngene, USA).



Obrázek 13: **Marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder**. bp – párů bází. Upraveno dle (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

3.13 Real-time PCR

Real-time PCR vychází ze základů klasické PCR, ale ke kvantifikaci vytvořených produktů dochází v reálném čase. Zaznamenává se přítomnost fluorescence, která je přímo úměrná množství DNA.

Pro analýzu real-time PCR jsme použili gb SG PCR Master Mix. Tento mix je složen z reakčního pufru, hot-start Taq DNA polymerázy, dNTP, barviva SYBR Green, MgCl₂ a aditiv, která zabraňují případné inhibici celé reakce. Z reagentů jsme připravili reakční směs, kdy jedna PCR reakce měla objem 20 µL. Složení jedné RT-PCR reakce je uvedeno v tabulce č. 5. Dle doporučení výrobcem jsme použili pro RT-PCR reakci 40 ng cDNA a zároveň dbali na to, aby objem templátu vzniklého reverzní transkripcí nepřekročil 10 % celého objemu RT-PCR reakce. Koncentrace primeru v reakci pro real-time PCR byla 0,25 µM. Do každé

analýzy byly zařazeny i NTC, kdy byl namísto 1 μL templátu cDNA nahrazen stejným množstvím vody. Současně pro možnost porovnání jednotlivých analýz mezi sebou jsme zvolili kalibrátor, který jsme zařadili do každé analýzy.

Tabulka 5: Objemy pipetovaných reagensů pro RT-PCR.

Reagencie	Objem v reakci (μL)
gb SG PCR Master Mix	10
Přední primer	1
Reverzní primer	1
dH ₂ O	7
Templát cDNA	1

Vytvořenou reakční směs jsme promíchali a centrifugovali. Na cykleru pro RT-PCR Rotor-Gene 3000 (Qiagen, Německo) jsme nastavili příslušný teplotní profil. Úvodní denaturace probíhala 2 min při 95 °C. Následovaly série denaturace 95 °C 30 s, nasednutí primerů 56,3 °C 30 s a extenze 72 °C 30 s. Tento cyklus se opakoval 40krát. Závěrečnou extenzi jsme nastavili na 72 °C 5 min s navazující melting analýzou v teplotním rozmezí 40–90 °C. Pro detekci jsme zvolili formát SYBR Green a filtr FAM pro měření vlnové délky ve 470 a 510 nm. Ze softwaru Rotor-Gene 6 (Qiagen, Německo) jsme získali Ct hodnoty jednotlivých RT-PCR produktů a použili je pro vyhodnocení Delta-delta Ct metodou. Tato metoda slouží pro výpočet relativní exprese genů v kontrolních a cílových vzorcích. Rovnice 2.1; 2.2; a 2.3 pro výpočet jsou uvedeny v teoretické části.

3.14 Statistická analýza naměřených dat

Experimentální data jsme měřili vždy alespoň ve 2–3 opakováních. Pro vyhodnocení jsme použili software Origin 9.0.0. (OriginLab, USA). Použili jsme statistickou jednosměrnou analýzu rozptylu (ANOVA) a dále post-test Bonferroni s hladinou významnosti $p=0,05$.

4 VÝSLEDKY

4.1 Izolace RNA a reverzní transkripce

Po izolaci RNA z buněčné linie HK-2 v 7. a 15. pasáži jsme změřili koncentrace a čistoty RNA na spektrofotometru Spark (Tecan, Rakousko). Koncentrace a čistota RNA měřené při 260 a 280 nm jsou uvedeny v tabulce č. 6. U čistoty se posuzuje poměr absorbance měřené při 260 a 280 nm. Vzorek RNA je považován za čistý při poměru blízkému 2. Pokud by bylo toto číslo menší než 2, tak je RNA znečištěná proteiny, fenolem nebo jinými kontaminanty absorbujícími při vlnové délce 280 nm. Poměr absorbancí našich vzorků RNA byla v rozmezí 2,02–2,10. Tyto hodnoty jsou blízké 2,0 a to znamená, že naše RNA byla čistá, a tedy vhodná pro použití do dalších analýz. Následně byla provedena reverzní transkripce, kdy jsme z izolované RNA získali cDNA, kterou jsme dále používali.

Tabulka 6: **Změřená koncentrace a čistota RNA.** CTRL – neovlivněné buňky, APAP – acetaminofen, CisPt – cisplatina, 7.p. – 7. pasáž, 15.p. – 15. pasáž.

Pasáž	Typ vzorku	Koncentrace (ng/μL)	Čistota 260/280 nm
7.p.	CTRL	628,89	2,05
	APAP 1 mM	581,81	2,08
	APAP 5 mM	808,96	2,04
	APAP 10 mM	242,24	2,02
	CisPt 5 μM	933,47	2,06
	CisPt 50 μM	804,62	2,05
15.p.	CTRL	849,68	2,03
	APAP 1 mM	710,47	2,06
	APAP 5 mM	654,78	2,10
	APAP 10 mM	747,12	2,02
	CisPt 5 μM	258,29	2,03
	CisPt 50 μM	941,96	2,03

4.2 Návrh oligonukleotidů

Pro potřeby PCR experimentů bylo nutné navrhnout primery pro geny NAT1, NAT2 a GAPDH. Z primerů vygenerovaných z Primer-BLAST (NCBI, USA) jsme vybrali ty, které splňovaly námi požadovaná kritéria na délku PCR produktu, umístění primerů ve dvou různých exonech daného genu a nízkou vzájemnou komplementaritu danou blízkou T_m , aby nedocházelo k jejich párování. Sekvence vybraných primerů jsou uvedeny v tabulce č. 7. Umístění přední i reverzní primerů v příslušném genu je uvedeno v přílohách 1–3, tj. pro NAT1 v příloze 1, pro NAT2 v příloze 2 a pro GAPDH v příloze 3.

Tabulka 7: **Charakteristiky navržených primerů.** GC – guanino-cytosinový pár, T_m – teplota tání primeru, NAT1 – N-acetyltransferáza 1, NAT2 – N-acetyltransferáza 2, GAPDH – glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza, F – přední primer, R – reverzní primer.

Název primeru	Sekvence (5' - 3')	T_m (°C)	Obsah GC (%)	Velikost produktů (bp)
NAT1_F	GCC AGG AAG AAG CAG CAA TC	56,8	55	192
NAT1_R	CTC AAA GGG AAC AGC TCG GA	57,1	55	
NAT2_F	TAC AGA CCT TGG AAG CAA GAG G	56,3	50	173
NAT2_R	AAG GGA ACA GCC CGG ATC T	58,8	58	
GAPDH_F	GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC	57,8	60	107
GAPDH_R	ATC CGT TGA CTC CGA CCT TC	56,8	55	

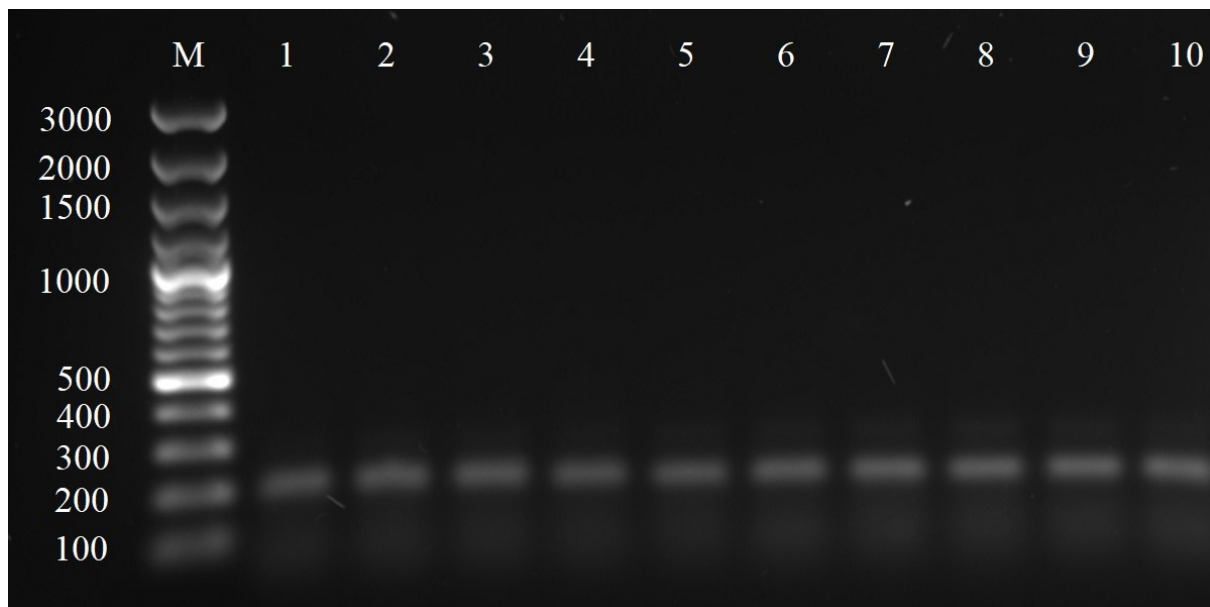
4.3 Gradientová PCR a elektroforéza

Účelem gradientové PCR bylo zjištění optimální teploty pro nasednutí námi navržených primerů pro sledované geny NAT1, NAT2 a referenční gen GAPDH. Pro gradientovou PCR jsme použili cDNA z kontrolních neovlivněných buněk.

Produkty gradientové PCR z proběhlé elektroforézy jsme detekovali pomocí UV transiluminátoru (Vilber Lourmant, Francie) a UV stanice Syngene G: BOX F3 (Syngene, USA). Výsledky jednotlivých elektroforéz produktů z gradientové PCR jsou uvedeny na obrázcích 14, 15 a 16. Pro určení velikosti vzniklých fragmentů jsme použili marker, který byl vždy napipetován do první pozice na gelu (M).

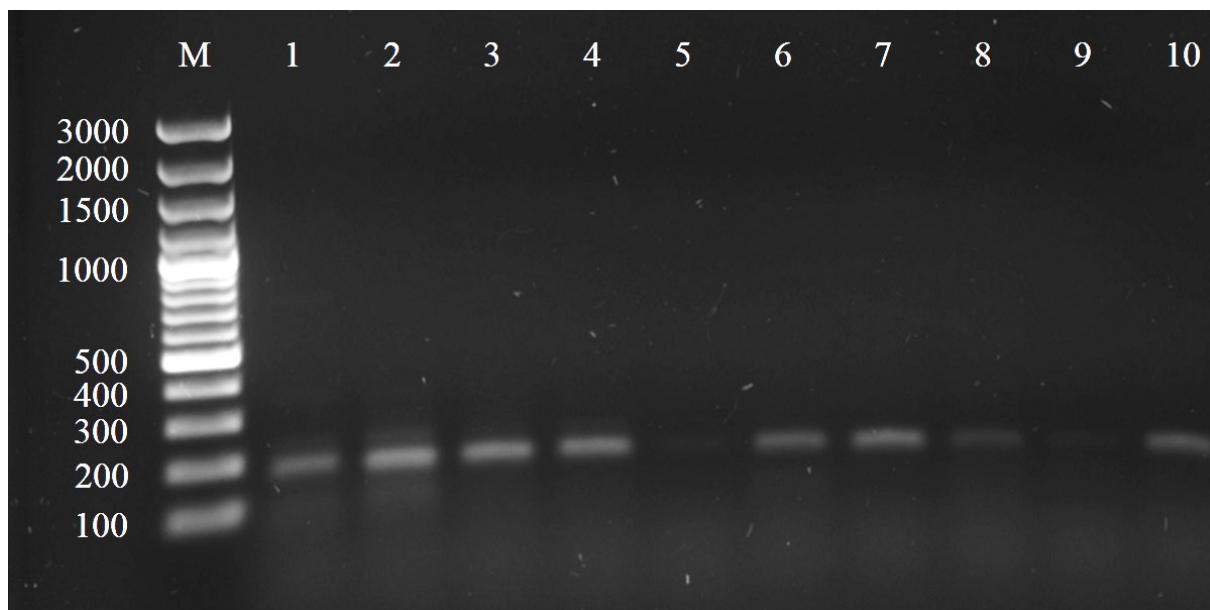
Na obrázku č. 14 jsou uvedeny výsledky elektroforézy PCR produktů pro NAT1 primery. U této dvojice primerů jsme očekávali produkt o velikosti 192 bp. Na gelu jsme detekovali při všech testovaných teplotách právě jeden produkt, jehož velikost odpovídala

velikosti očekávaného produktu. U žádné z testovaných teplot jsme nezaznamenali tvorbu vedlejších produktů. U teplot 56,3 °C (8) a 57,2 °C (9) jsme zaznamenali silnější proužky na gelu, proto se tyto dvě teploty nasedání primerů zdály jako nejlepší pro další použití.



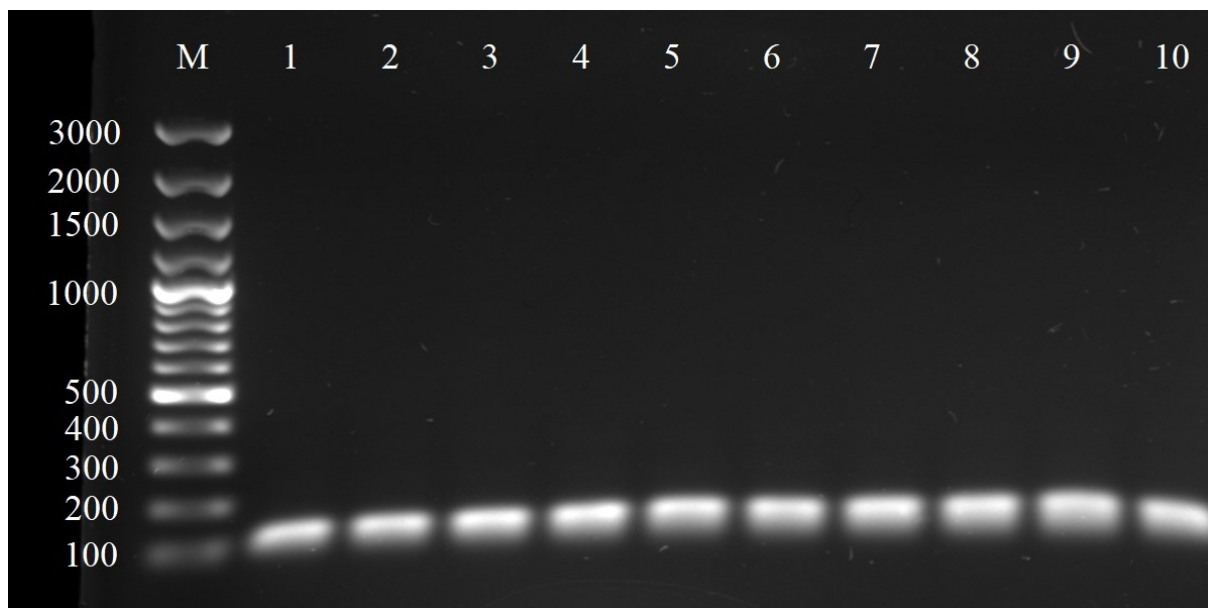
Obrázek 14: **Gelová elektroforéza PCR produktů pro primery NAT1.** Očekávaná velikost produktu 192 bp. Tm: 1 – 51 °C; 2 – 51,2 °C; 3 – 51,8 °C; 4 – 52,6 °C; 5 – 53,5 °C; 6 – 54,4 °C; 7 – 55,4 °C; 8 – 56,3 °C; 9 – 57,2 °C; 10 – 58 °C; Marker (M): 3000 bp; 2000 bp; 1500 bp; 1000 bp; 500 bp; 400 bp; 300 bp; 200 bp; 100 bp.

Na obrázku č. 15 jsou uvedeny výsledky elektroforézy PCR produktů pro NAT2 primery. Pro tuto dvojici primerů jsme očekávali velikost produkt 173 bp. Na gelu jsme detekovali výraznější produkty u všech testovaných teplot kromě teplot 53,5 °C (5) a 57,2 °C (9). U teplot 51 °C (1), 51,2 °C (2), 51,8 °C (3), 52,6 °C (4) jsme na gelu zaznamenali tvorbu vedlejších produktů. U ostatních jsme pozorovali právě jeden produkt, jehož velikost odpovídala velikosti očekávaného produktu. Jako vhodné teploty pro nasedání primerů bychom mohli použít teploty 54,4 °C (6), 55,4 °C (7), 56,3 °C (8), 58 °C (10).



Obrázek 15: **Gelová elektroforéza PCR produktů pro primery NAT2.** Očekávaná velikost produktu 173 bp. T_m: 1 – 51 °C; 2 – 51,2 °C; 3 – 51,8 °C; 4 – 52,6 °C; 5 – 53,5 °C; 6 – 54,4 °C; 7 – 55,4 °C; 8 – 56,3 °C; 9 – 57,2 °C; 10 – 58 °C; Marker (M): 3000 bp; 2000 bp; 1500 bp; 1000 bp; 500 bp; 400 bp; 300 bp; 200 bp; 100 bp.

Na obrázku č. 16 jsou uvedeny výsledky elektroforézy PCR produktů pro primery GAPDH. U této dvojice primerů jsme očekávali produkt o velikosti 107 bp. Na gelu jsme detekovali při všech testovaných teplotách právě jeden jasně ohraničený produkt, jehož velikost odpovídala vypočítané velikosti 107 bp. U žádné testované teploty nasedání primerů jsme nezaznamenali tvorbu vedlejších produktů. Všechny teploty nasedání primerů se jeví jako vhodné pro další použití.

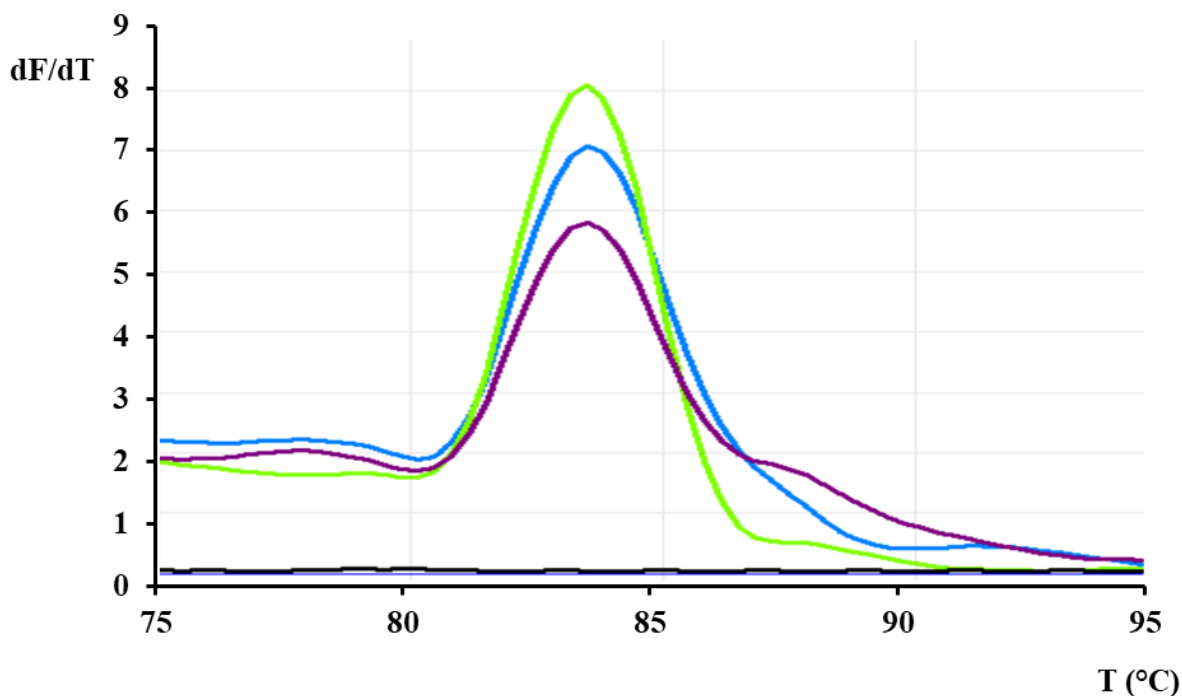


Obrázek 16: **Gelová elektroforéza PCR produktů pro primery GAPDH.** Očekávaná velikost produktu 107 bp. Tm: 1 – 51 °C; 2 – 51,2 °C; 3 – 51,8 °C; 4 – 52,6 °C; 5 – 53,5 °C; 6 – 54,4 °C; 7 – 55,4 °C; 8 – 56,3 °C; 9 – 57,2 °C; 10 – 58 °C; Marker (M): 3000 bp; 2000 bp; 1500 bp; 1000 bp; 500 bp; 400 bp; 300 bp; 200 bp; 100 bp.

Na gelech docházelo u většiny testovaných teplot k tvorbě specifického produktu. Převážně jsme se řídili výsledky elektroforézy pro NAT2, kde výsledek teplot nebyl jednoznačný. Pro následnou analýzu pomocí RT-PCR jsme vybrali jednotnou teplotu nasednutí primeru 56,3 °C, v gelech na pozici č. 8. Pro každý pár primerů byla provedena negativní kontrola. Gely z elektroforézy negativních kontrol jsou vloženy do příloh č. 4, 5 a 6.

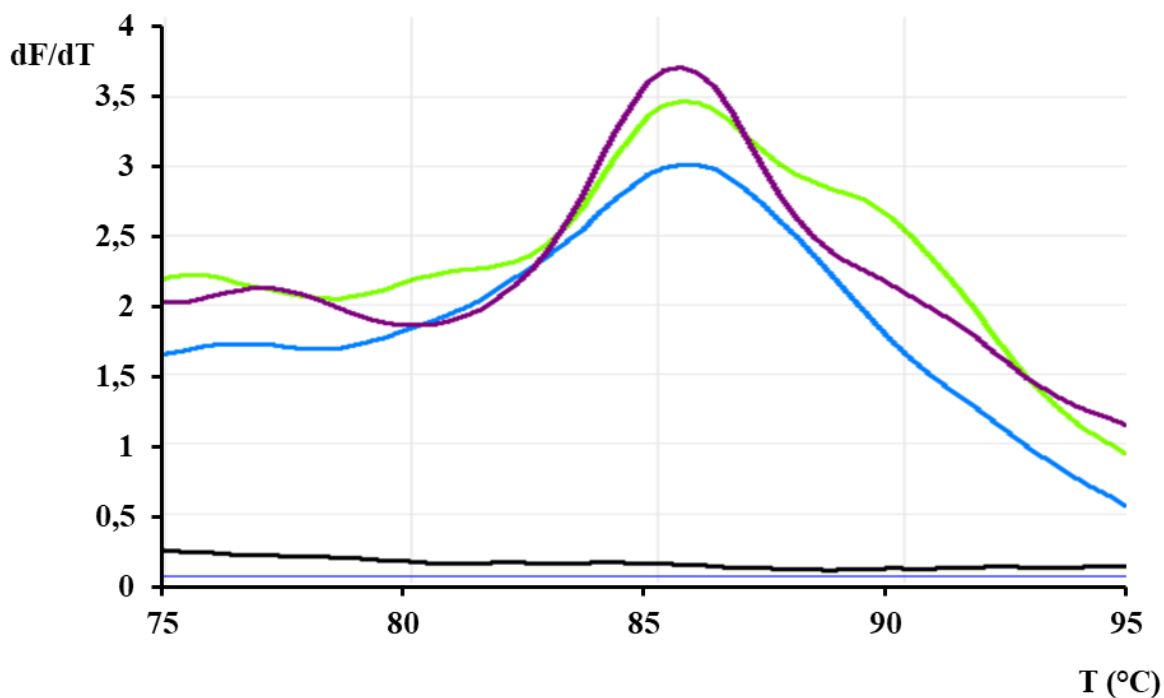
4.4 Real-time PCR

Optimalizovanou teplotu nasedání primerů 56,3 °C jsme následně použili pro detekci genové exprese NAT1, NAT2 a GAPDH pomocí RT-PCR. Pro RT-PCR jsme použili cDNA z kontrolních HK-2 buněk a z buněk ovlivněných APAP (1–10 mM) a CisPt (5–50 μM) po 24 hod. Pomocí analýzy teploty tání jsme ověřili tvorbu specifických produktů pro dané primery. Přestože jsme pro detekci využili teploty v rozmezí 40–90 °C, tak výsledky ukázaly, že produkty jsou detekovatelné v rozmezí teplot 75–95 °C. Křivky tání jsou uvedeny v grafech č. 2, 3 a 4.

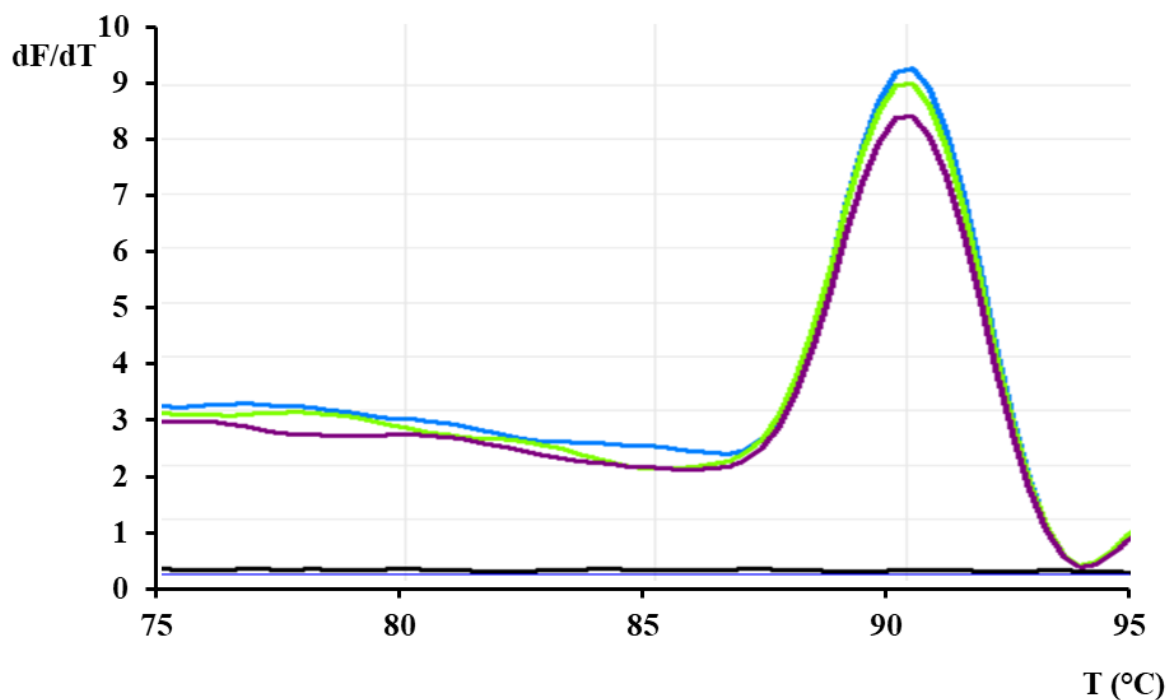


Graf 2: **Křivka tání produktů pro primery NAT1 v 15. pasáži.** dF/dT – podíl změny intenzity fluorescence a změny teploty; T – teplota; kontrolní neovlivněné buňky – fialová; 10 mM acetaminofen – modrá; 50 μ M cisplatina – zelená; negativní kontrola – černá.

Výsledky ukazují, že u všech křivek tání nedochází k tvorbě nespecifických produktů. Pro křivku tání produktů primerů NAT1 (graf 2) se tvořil jeden specifický produkt při teplotě 84 °C. U křivky tání produktů primerů NAT2 (graf 3) se tvořil právě jeden produkt v podobě nižšího vrcholu v teplotě 85,5 °C. Specifický produkt se tvořil také u křivky tání pro primery GAPDH (graf 3), kde můžeme pozorovat jednotný vrchol při teplotě 90 °C. Tímto jsme ověřili, že u všech primerů detekujeme tvorbu právě jednoho specifického produktu a mohli jsme pokračovat v další analýze.



Graf 3: Křivka tání produktů pro primery NAT2 v 15. pasáži. dF/dT – podíl změny intenzity fluorescence a změny teploty; T – teplota; kontrolní neovlivněné buňky – fialová; 10 mM acetaminofen – modrá; 50 μM cisplatin – zelená; negativní kontrola – černá.



Graf 4: Křivka tání produktů pro primery GAPDH v 7. pasáži. dF/dT – podíl změny intenzity fluorescence a změny teploty; T – teplota; kontrolní neovlivněné buňky – fialová; 10 mM acetaminofen – modrá; 50 μM cisplatin – zelená; negativní kontrola – černá.

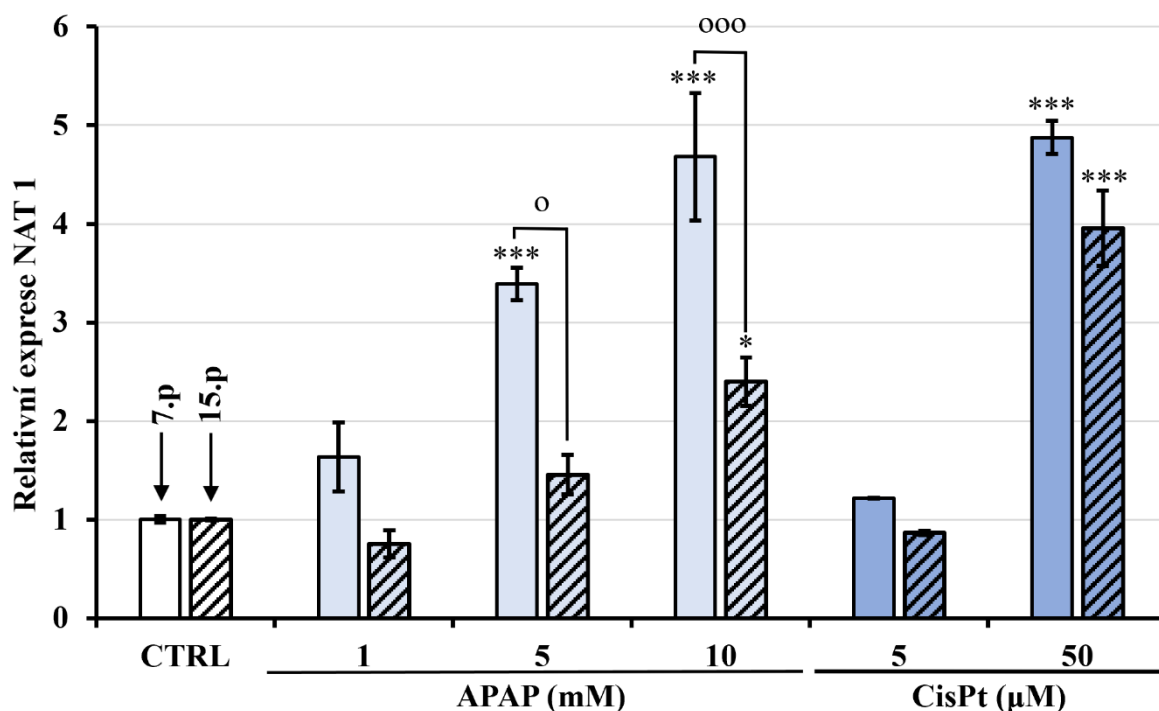
Po proběhlé RT-PCR jsme po nastavení prahové hodnoty ze softwaru Rotor-Gene 6 (Qiagen, Německo) získali Ct hodnoty. Tyto hodnoty byly použity pro následné vyhodnocení. Zároveň jsme detekovali, že dochází k expresi všech sledovaných genů. Tato data jsme použili pro kvantifikaci změn exprese genů a pomocí delta-delta Ct metody jsme vypočítali relativní expresi genů. Získané Ct hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 8. Ct hodnoty z jednotlivých měření si byly navzájem blízké. K odchylce Ct hodnoty došlo u APAP 10 mM v 7. i 15. pasáži pro gen NAT2. Tyto hodnoty jsou vyšší oproti ostatním, a proto nebyly pro další analýzu použity. V tabulce č. 8 jsou označeny červeně. Součástí všech analýz byl i kalibrátor, který sloužil k porovnání jednotlivých analýz mezi sebou. Jako kalibrátor jsme zvolili neovlivněné kontrolní HK-2 buňky z 15. pasáže.

Tabulka 8: **Ct hodnoty naměřené RT-PCR.** CTRL – neovlivněné buňky, APAP – acetaminofen, CisPt – cisplatina, NAT1 – N-acetyltransferáza 1, NAT2 – N-acetyltransferáza 2, GAPDH – glycerinaldehyd 3-fosfátdehydrogenáza. Červeně označené hodnoty nebyly použity pro další výpočty.

	7.p.			15.p.		
	NAT1	NAT2	GAPDH	NAT1	NAT2	GAPDH
CTRL	26,52	24,8	14,76	26,18	24,87	15,25
	26,72	24,7	14,89	26,15	24,9	15,27
	26,94	24,86	15,89	26,23	25,94	15,4
	26,87	24,74	16,06	26,18	25,88	15,8
APAP 1mM	25,82	22,85	14,4	26,82	23,67	14,86
	25,19	22,72	14,37	27,36	23,64	16,65
APAP 5mM	24,65	22,44	14,56	27,03	23,16	16,48
	24,51	22,47	14,53	26,63	22,98	16,44
APAP 10mM	26,71	24,33	17,39	25,26	24,07	15,45
	27,42	24,35	17,43	24,76	24,07	15,31
	26,55	26,98	17,93	25,15	27,72	15,75
CisPt 5μM	25,13	24,14	14,5	28,07	26,17	17,33
	25,14	24,25	14,48	28	26,14	17,11
CisPt 50μM	22,96	23,79	13,46	25,66	24,47	17,32
	23,06	23,99	13,54	25,38	24,34	15,88

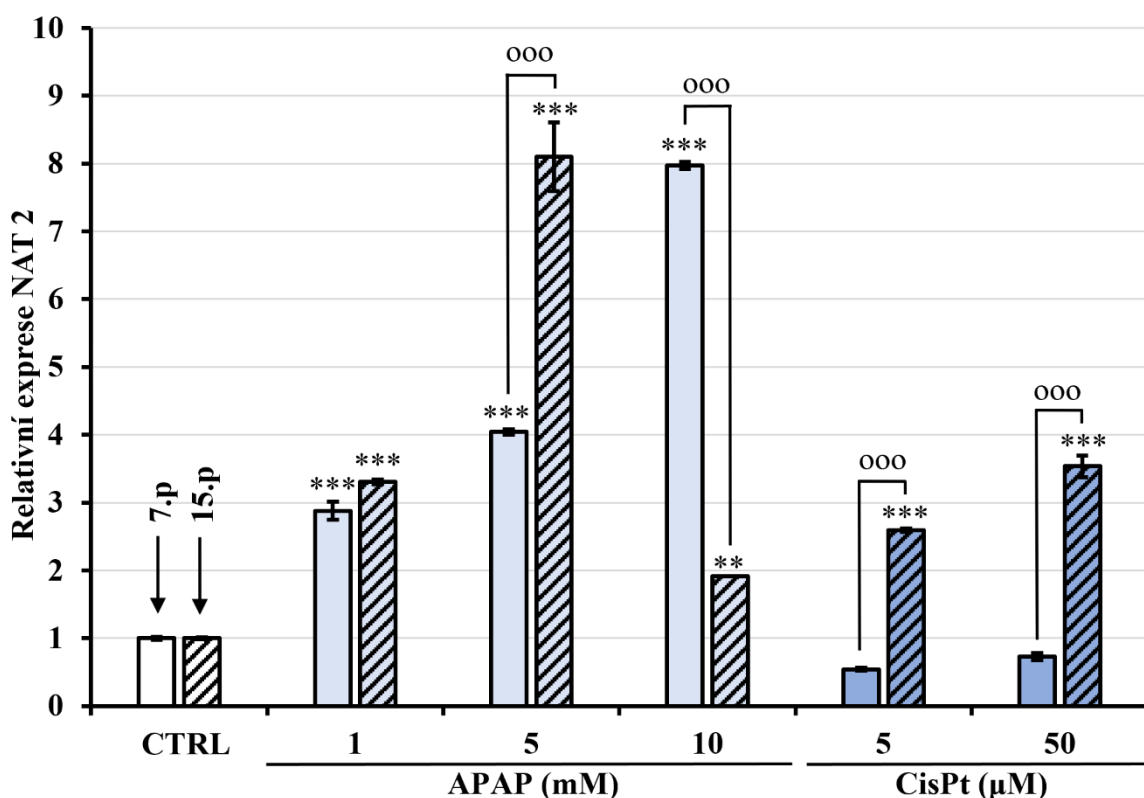
Výsledné Ct hodnoty jednotlivých vzorků byly vztaženy k příslušnému kalibrátoru tak, aby je bylo možné vzájemně porovnat. Následně jsme data zprůměrovali. Z rozdílu hodnot sledovaných genů NAT1 nebo NAT2 od referenčního genu GAPDH jsme pro jednotlivé vzorky vypočítali hodnotu $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ jsme zprůměrovali a vypočítali střední chybu průměru (SEM). Tyto hodnoty jsme použili pro vytvoření grafů znázorňujících relativní expresi genů NAT1 (graf 5) a NAT2 (graf 6). Z obou grafů je patrné, že v rámci 7. a 15. pasáže dochází k rozdílné relativní expresi příslušných genů.

Signifikantní zvýšení exprese NAT1 (graf 5) jsme detekovali u HK-2 buněk v 7. pasáži ovlivněných 5 a 10 mM APAP ($p < 0,001$) a 50 μ M CisPt ($p < 0,001$) v porovnání s kontrolními buňkami. V 15. pasáži jsme našli statisticky signifikantní zvýšení exprese NAT1 u buněk ovlivněných 10 mM APAP ($p < 0,05$) a 50 μ M CisPt ($p < 0,001$). Po porovnání 7. a 15. pasáže mezi sebou jsme našli signifikantní rozdíl u 5 mM ($p < 0,05$) a 10 mM APAP ($p < 0,001$). Na základě těchto výsledků lze říci, že míra exprese NAT1 se liší napříč oběma pasážemi u buněk ovlivněných 5 a 10 mM APAP, exprese NAT1 se však neliší u buněk ovlivněných CisPt.



Graf 5: **Relativní exprese genu NAT1 v 7. a 15. pasáži.** CTRL – kontrolní neovlivněné buňky; APAP 1–10 mM – acetaminofen; CisPt 5–50 μ M – cisplatina. Měřeno v 7. a 15. pasáži. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM ($n=2-3$; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; vs. negativní kontrola v příslušné pasáži; o; $p < 0,05$; ooo; $p < 0,001$; vs. buňky ovlivněné příslušným toxinem v různých pasážích).

U NAT2 (graf 6) jsme detekovali statisticky signifikantní zvýšení exprese u HK-2 buněk v 7. pasáži ovlivněných 10 mM APAP ($p < 0,001$) v porovnání s kontrolními buňkami. V 15. pasáži došlo ke statisticky signifikantnímu zvýšení exprese NAT2 buněk ovlivněných 1,5 ($p < 0,001$) a 10 mM APAP ($p < 0,01$) a 5 a 50 μ M CisPt ($p < 0,001$). Po porovnání 7. a 15. pasáže mezi sebou jsme našli signifikantní rozdíl u 5 a 10 mM APAP ($p < 0,001$) a u 5 a 50 μ M CisPt ($p < 0,001$). Na základě těchto výsledků lze říci, že míra exprese NAT2 se liší napříč oběma pasážemi u buněk ovlivněných 5 a 10 mM APAP a u buněk ovlivněných 5 a 50 μ M CisPt.



Graf 6: Relativní exprese genu NAT2 v 7. a 15. pasáži. CTRL – kontrolní neovlivněné buňky; APAP 1–10 mM – acetaminofen; CisPt 5–50 μ M – cisplatina. Měřeno v 7. a 15. pasáži. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM ($n=2-3$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; vs. negativní kontrola v příslušné pasáži; ooo, $p < 0,001$; vs. buňky ovlivněné příslušným toxinem v různých pasážích).

5 DISKUZE

Ledviny jsou základním orgánem, kde dochází k detoxikaci a eliminaci cizích látek, chemikálií, léčiv a toxických metabolitů. Díky tomu jsou však zpravidla toxickému působení těchto látek vystaveny. Pokud mechanismy detoxikace a eliminace cizorodých látek nefungují správně, může docházet k ledvinnému poškození. Léky vyvolaná nefrotoxicita je jedním z častých nežádoucích faktorů při vývoji nových léků. Za účelem testování nefrotoxicity způsobené léky byly postupně vyvíjeny různé *in vitro* buněčné modely, které umožňují zkoumání dějů probíhajících v lidském organismu. Právě díky studiím na buněčných modelech lze získat cenné informace o možném riziku poškození ledvin a využít tyto informace pro další vývoj léčiv nebo klinickou praxi (Kim a Moon, 2012; Yu et al., 2021).

Obvykle jsou při *in vitro* testování využívány buněčné kultury kultivované v podobě monovrstvy buněk tzv. 2D buněčná kultivace. Toto uspořádání však odpovídá charakteristické morfologické struktuře a funkci neporušených ledvinných tubulů jen částečně. Výhodnějším uspořádáním buněk pro *in vitro* buněčné studie se jeví 3D uspořádání buněčného modelu. Takovýto model zpravidla více odpovídá skutečnému stavu v organismu (Bajaj et al., 2018; Kapałczyńska et al., 2018). Ve výzkumu se ale 3D modely využívají zřídka s ohledem na strukturální změny ve fenotypu buněk, jejich vyšší ceny a zároveň pro některé studie nemusí být použití 3D modelu výhodnější (Yu et al., 2021; Yu et al., 2023). Pro účely této práce bylo využito 2D buněčného modelu dostačující.

Pro simulaci fyziologického stavu ledvin jsou s výhodou využívány lidské ledvinné buňky (Bajaj et al., 2018). Životnost těchto buněk je omezená Hayflickovým limitem, což znamená, že je nelze kultivovat neomezeně dlouhou dobu. Zároveň existuje riziko, že vlivem nevhodných podmínek kultivace, mohou postupem času přijít o svůj původní fenotyp. Tyto limity kultivovaných primárních buněk lze překonat využitím imortalizované buněčné linie. Ta se vyznačuje neomezeným růstem a dělením. Znesmrtelnění buněk však může v průběhu dlouhodobé kultivace částečně měnit buněčné funkce (Yu et al., 2021).

Pro testování nefrotoxicity *in vitro* jsou používány buněčné modely jako HK-2, HEK293, LLC-PK1 a JTC-12 (Vrbová et al., 2016a). Pro naši studii jsme vybrali imortalizovanou adherentní buněčnou linii proximálních tubulů HK-2. Buněčná linie HK-2 se běžně využívá jako model pro testování nefrotoxicity léčiv, jako je například ifosfamid a acyklovir. Na rozdíl od prasečí buněčné linie LLC-PK1 má HK-2 výhodu v tom, že se jedná o buněčnou linii odvozenou z lidské ledviny. To eliminuje možný mezidruhový rozdíl v toxikologii a farmakologii léčiv (Gunness et al., 2010).

Existuje celá řada prací, které se zabývají studiem cytotoxicity látek. Mezi často testované látky patří například gentamicin, penicilin, aspirin, chlorid kademnatý, APAP a CisPt (Qiu et al., 2018; Kwiatkowska et al., 2021; Yu et al., 2021). V naší studii jsme buňky HK-2 vystavili působení právě APAP a CisPt. APAP je neopioidní analgetikum a antipyretikum (Gerriets et al., 2024). CisPt je nejúčinnější a nejrozšířenější protinádorové léčivo, které indukuje apoptózu nádorových buněk. Omezením při použití CisPt jsou její možné vedlejší účinky na ledviny, kde se CisPt akumuluje (Sohn et al., 2013). Obě látky se běžně používají v klinické praxi a je známá jejich schopnost cytotoxického působení na ledviny. Pro náš experiment jsme zvolili koncentrace modelových toxinů pro vyvolání cytotoxicity v ledvinných buňkách na základě literatury a zkušeností naší laboratoře. Pro APAP jsme použili koncentrace 1, 5 a 10 mM (Vrbová et al., 2016b; Hauschke et al., 2017; Qiu et al., 2018); pro CisPt 5 a 50 μ M (Sohn et al., 2013; Wang et al., 2021). HK-2 buňky byly inkubovány s APAP a CisPt v 6jamkových destičkách po dobu 24 hod.

V lidském organismu jsou léčiva metabolizována v játrech, GIT nebo právě v ledvinách (Kwiatkowska et al., 2021). Biotransformaci a mechanismus působení léčiv je možné studovat s využitím různých metod. Jedním ze způsobů sledování působení léčiv je sledování genové exprese, kdy se stanovuje exprese vybraných genů (Mori a Kida, 2020). Studium genové exprese umožňuje náhled na buněčnou fyziologii v určitém časovém bodě. Sledování změn genové exprese může přispět k pochopení progresu onemocnění, určení konkrétního léčebného cíle nebo určení míry závažnosti symptomů. Při genové expresi dochází k syntéze funkčního produktu genu z genetické informace získané z DNA (Singh et al., 2018). Biotransformace xenobiotik, včetně léčiv a karcinogenů, probíhá ve dvou fázích. Mezi geny účastníci se biotransformační fáze II patří NAT. Geny NAT kódují enzymy se stejným názvem, které katalyzují reakci, kdy dochází k přenosu acetylové skupiny z acetyl CoA a následně je acetylován substrát za vzniku CoA (Husain et al., 2007a). NAT tedy mají důležité postavení v metabolismu xenobiotik a následné detoxikaci organismu (Guangping, 2020). Jedním z hlavních cílů této diplomové práce bylo sledovat genovou expresi NAT1 a NAT2 v HK-2 buňkách metodou RT-PCR.

Prvním krokem byla izolace RNA z HK-2 buněk ovlivněných APAP (1–10 mM) a CisPt (5–50 μ M) po dobu 24 hod. Tato RNA byla nezbytná pro optimalizaci primerů a RT-PCR. Extrakce RNA může být provedena pomocí několika různých činidel, jako je např. Trizol a GENEzol, nebo prostřednictvím kolonek (Tesena et al., 2017). Tyto tři metody izolace RNA ze vzorků tkáňové biopsie z části žaludku koní porovnávali ve studii autorů Tesena et al. (2017) a vyhodnocovali pomocí RT-PCR. Izolace pomocí Trizolu měla vyšší výtěžek, ale současně

i vyšší kontaminaci proteiny a DNA. Kolonková metoda měla nejlepší čistotu RNA a zároveň nejnižší výtěžek. Na závěr vyhodnotili jako nejlepší metodu GENEzol, která poskytla dostatečně purifikovanou RNA, vysoký výtěžek a zároveň byla cenově dostupnější než předchozí dvě metody. V našich experimentech byla využita izolace Trizolem, protože je efektivní, poskytuje vyšší výtěžek a je snadno proveditelná. Eventuální použití jiné metody by bylo nutné optimalizovat a korelovat.

Při izolaci RNA je důležité dbát na čistotu a zabránit tak možné kontaminaci vzorku, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků. Po izolaci RNA je nezbytné provést hodnocení čistoty izolované RNA. Ve studii autorů Gouveia et al. (2014) považovali RNA za čistou v případě, že poměr absorbancí 260/280 nm byl větší nebo roven 1,9. Nižší poměr by značil přítomnost fenolu, proteinů nebo dalších možných kontaminantů. Námi izolované vzorky RNA z dostupného buněčného materiálu získaly dobré výtěžky a zároveň poměr absorbancí 260/280 nm vycházel okolo 2. Po zvážení všech dostupných informací jsme posuzovali naši izolovanou RNA. Naše vyhodnocení potvrdilo, že RNA je čistá, bez kontaminace a je tudíž vhodná pro další experimenty. Tato zjištění byla klíčová pro následný průběh našeho experimentu, což nám poskytlo jistotu v kvalitě našich biologických vzorků.

Následná cDNA vznikla přepisem z RNA tzv. reverzní transkripcí. Pro tento proces jsou dostupné komerční sady, které jsou běžně využívány (Millner et al., 2012; Tesena et al., 2017; Salazar-González et al., 2020). Získanou cDNA jsme použili pro další analýzu.

Abychom mohli sledovat genovou expresi NAT pomocí RT-PCR, tak bylo nezbytné absolvovat několik kroků. Prvním cílem mé diplomové práce bylo navrhnutí oligonukleotidů pro detekci NAT a referenčního genu GAPDH. Návrh oligonukleotidů je klíčovým bodem jakéhokoliv experimentu, který ke zmnožení specifické sekvence nukleotidů využívá metodu PCR. Primery zvyšují účinnost amplifikace a zároveň vykazují vysokou specifitu vůči cílové sekvenci (Li a Brownley, 2010). Pro návrh jsme použili software Primer-BLAST. Tento univerzální nástroj používaný pro návrh cílově specifických primerů pro PCR popsali Ye et al. (2012), kde objasňují uživatelské rozhraní a nastavitelné parametry tohoto softwaru. Zároveň je srovnávají s alternativními možnostmi, které se dříve používaly pro návrh primerů, jako je QuantPrime nebo PRIMEGENS. V porovnání s nimi je Primer-BLAST citlivější v detekci požadovaného cíle a zároveň dokáže identifikovat potenciálně nespecifické cíle. Jedná se o vylepšenou verzi, která je propojena s NCBI, ze které je možné čerpat další potřebné informace ze sekvenčních databází. Umožňuje vstup do Genbank, souborů FASTA nebo umožňuje také použití primeru z odlišného zdroje. Dle námi vybraných parametrů nám Primer-BLAST vygeneroval páry primerů, z nichž jsme vybrali pro každý gen vždy jeden pár

na základě podobnosti jejich T_m , délky výsledného PCR produktu a vzájemné komplementarity. Tyto primery jsme označili jako NAT1, NAT2 a GAPDH v závislosti na komplementární sekvenci příslušného genu.

Naším dalším cílem bylo optimalizovat podmínky použití nově navržených a syntetizovaných primerů. Pro správnou optimalizaci teploty nasedání primerů se využívá gradientová PCR s nastavením teplotního gradientu (Park et al., 2020). Gradient teplot pro nasedání primerů byl vybrán s ohledem na konkrétní vlastnosti primerů, zejména jejich T_m . Naše primery NAT1, NAT2 a GAPDH měly T_m v rozmezí 56,3–58,8 °C. Proto jsme se rozhodli použít gradient teplot od 51 °C do 58 °C. I přesto, že je T_m pomocným ukazatelem pro zvolení vhodné teploty nasedání primerů, nejlepší volbou je vlastní experimentální ověření. My jsme pro další analýzu jako nejvhodnější teplotu vyhodnotili 56,3 °C.

Koncentrace námi navržených primerů v gradientové PCR byla 0,42 μ M. Je nutné brát v potaz, že komerční oligonukleotidy se mohou mírně odlišovat v teplotě, při které specificky nasedají na cílový úsek DNA. Různé T_m mohou mít vliv na specifitu a účinnost amplifikace produktu. Při plánování, realizaci a vyhodnocování experimentu je možná variabilita teplot zohledňována (Bustin a Huggett, 2017).

Po optimalizaci teploty nasedání primerů pomocí gradientové PCR jsme přistoupili k vlastní detekci změn genové exprese NAT1, NAT2 a GAPDH pomocí RT-PCR. Kvantifikace genové exprese se provádí řadou metod, jako jsou např. Northern blot (Singh et al., 2018), ribonukleázový ochranný test, sériová analýza genové exprese (Romkes a Buch, 2005; Moustafa a Cross, 2016), PCR čipy nebo mikročipy (Singh et al., 2018) a RT-PCR. RT-PCR je považována za levný, jednoduchý, velmi citlivý a specifický nástroj, který umožňuje stanovit úroveň exprese požadovaných genů (Mo et al, 2012; Bachman, 2013). Ve studii Mo et al. (2012) popsali obecný postup pro studium genové exprese. Využili pro to metodu real-time PCR s interkalátorem SYBR Green, který jsme v naší studii použili i my.

Relativní exprese u NAT1 i NAT2 jsme sledovali u HK-2 buněk ovlivněných 1, 5 a 10 mM APAP, 5 a 50 μ M CisPt oproti kontrolním neovlivněným buňkám pomocí RT-PCR. Z analýzy RT-PCR jsme nastavením prahové hodnoty získali C_t hodnoty. Ty jsme použili pro výpočet relativní genové exprese delta-delta C_t metodou.

Expres NAT1 byla signifikantně zvýšena u HK-2 buněk ovlivněných APAP (5, 10 mM) a CisPt (50 μ M). Ačkoliv NAT 1 je klíčovou součástí acetylačních reakcí biotransformace xenobiotik, neexistuje příliš mnoho studií, které by se věnovaly genové expresi NAT1 ve spojení s našimi modelovými toxiny nebo HK-2 buňkami. Ve studii Millner et al. (2012) sledovali haplotyp NAT1*10 u buněk vaječníků čínského křečka, které byly vystaveny

působení 4-aminobifenyly v různých koncentracích (1,56, 3,13, 6,25 a 12,5 μM). V této studii porovnávali nejběžnější haplotyp NAT1, NAT1*10 s NAT1*4. U NAT1*10 byla exprese mRNA a proteinu vyšší než u NAT1*4. Exprese mRNA byla hodnocena pomocí RT-PCR a exprese proteinu byla analyzována metodou Western blot. Tato studie se stejně jako náš experiment věnovala expresi NAT s využitím buněčné linie pro sledování nefrotoxicity ve spojení s modelovými toxiny. Přestože se odlišovali v použitém buněčném modelu a toxinu, tak poskytli náhled na možný mechanismus působení exprese NAT a její vliv na nefrotoxicitu.

V naší práci jsme detekovali expresi NAT2 signifikantně zvýšenou u HK-2 buněk ovlivněných APAP (5, 10 mM) a CisPt (5 a 50 μM). NAT 2 stejně jako NAT1 je důležitou součástí biotransformace xenobiotik. Sledování genové exprese NAT2 u HK-2 buněk nebo jiných *in vitro* modelů ovlivněných modelovými toxiny, jako je právě APAP a CisPt se moc dostupných studií nevěnovalo. Je pravděpodobné, že by takové studie mohly mít velký přínos právě pro hodnocení a charakterizaci nefrotoxicity vyvolané léky (Garcia et al., 2020). Ve studii Garcia et al. (2020) zkoumali nefrotoxicitu působenou ve spojení s chemoterapií CisPt a jednonukleotidovými polymorfismy v genech NAT1 a NAT2 u pacientů s rakovinou. Zatímco gen NAT1 je více exprimován v centrálním nervovém systému a NAT2 je specificky exprimován játrech, tlustém a tenkém střevě. Vzorek pro analýzu genové exprese pomocí čipů Illumina byl získáván ze slin pacientů, kterým byla v rámci léčby podávána CisPt (20 mg/m²). Účelem bylo vytvořit model, který by před zahájením léčby rozpoznal pacienty s rakovinou varlat, u nichž by bylo riziko případné nefrotoxicity. V závěru shledali, že by geny NAT mohly být v budoucnosti uplatňovány při hodnocení nefrotoxicity v klinické praxi. Tento poznatek nabízí perspektivu pro další výzkum v oblasti farmakogenomiky a farmakotoxikologie, který by mohl vést k pokroku v diagnostice a léčbě nefrotoxicity způsobené léčivými.

Jedním z faktorů, který jsme dále hodnotili, byl vliv opakovaného pasážování HK-2 buněk. Při srovnání 7. a 15. pasáže byl významný rozdíl pozorován u obou NAT ovlivněných APAP (5 a 10 mM) a u NAT2 navíc CisPt (5 a 50 μM). Experimenty s HK-2 buňkami v 3., 6., 9., 12. a 15. pasáži prokázaly, že výsledky mohou být ovlivněny právě použitím různých pasáží buněk. Pasážování HK-2 buněk může mít vliv na citlivost vůči toxickým látkám, jako je například 10 mM APAP a 100 μM CisPt, kterým buňky byly vystaveny 24 hod (Handl et al., 2020). V současné době není příliš velké množství vědeckých studií, které by hodnotily počet pasáží HK-2 buněk a jejich vliv na expresi genu. Ve studii Neumann et al. (2010) sledovali vliv počtu pasáží, v rozmezí 8 pasáží, na genovou expresi v synoviálních fibroblastech, jejichž patofyziologie souvisí s onemocněním revmatoidní artritida. Ve 2. a 4. pasáži k expresi mRNA nedocházelo. Odlišná exprese byla pozorována od 5. pasáže dále, přičemž největší

rozdíl byl zaznamenán u 7. a 8. pasáže. Ve studii dospěli k závěru, že je důležité brát ohled na počet pasáží buněk při interpretaci výsledků, což ukazuje, že při provádění experimentů je nutné vzít v potaz počet pasáží buněk.

6 ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo sledování genové exprese N-acetyltransferáz v adherentní buněčné linii proximálních ledvinných tubulů HK-2. Geny N-acetyltransferáz kódují enzym s identickým názvem. Tyto enzymy katalyzují fázi II biotransformace. Proces biotransformace je pro lidský organismus důležitý z hlediska odbourávání xenobiotik a to hlavně léčiv. Umožňuje detoxikaci a vyloučení látek z těla, čímž minimalizuje potenciální toxické působení látky. To je důležité pro udržení homeostázy a zamezení možným zdravotním problémům. Biotransformace probíhá převážně v játrech, ale také v ledvinách.

Důležitým orgánem pro eliminaci léčiv jsou právě ledviny. Vlivem škodlivých látek může docházet k jejich poškození a následnému vzniku nefrotoxicity. Ta hraje klíčovou roli v rámci farmakologie a toxikologie léčiv. Z tohoto důvodu je nutné dbát na správné užívání léků. Pro testování nefrotoxicity *in vitro* se využívá modelových látek jako je acetaminofen nebo cisplatina. Jedná se o hojně využívaná léčiva v klinické praxi. Testování se provádí na ledvinných buňkách, kterými je například adherentní buněčná linie HK-2.

V rámci této diplomové práce jsme z HK-2 buněk v 7. a 15. pasáži ovlivněných APAP a CisPt izolovali RNA. Genovou expresi jsme sledovali pomocí RT-PCR, pro kterou bylo nutné nejprve navrhnout a optimalizovat oligonukleotidy. Pro optimalizaci teploty nasedání oligonukleotidů jsme použili gradientovou PCR. Sledovaná genová exprese NAT1 i NAT2 byla u většiny koncentrací APAP a CisPt zvýšená v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami a v rámci pasáží byla rozdílná.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- 1) ABOU-DONIA, M. B. Metabolic Biotransformation of Xenobiotics. *Mammalian Toxicology*. 2015, 101-129. ISBN 97811186834841, DOI: 10.1002/9781118683484.ch6.
- 2) AGRAWAL, S., KHAZAENI, B. Acetaminophen Toxicity. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2024 [cit. 2024-03-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441917/>.
- 3) ALSANOSI, S. M. M., SKIFFINGTON, C., & PADMANABHAN, S. Chapter 17 – Pharmacokinetic Pharmacogenomics. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. Academic Press. 2014, 341-364. ISBN 978-0-12-386882-4, DOI:10.1016/b978-0-12-386882-4.00017-7.
- 4) ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. PCR – the polymerase chain reaction. *Analytical Methods*. 2014, 6(2), 333-336. ISSN 1759-9660, DOI: 10.1039/c3ay90101g.
- 5) ARTIKA, I. M., DEWI, Y. P., NAINGGOLAN, I. M., SIREGAR, J. E., ANTONJAYA, U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applicationa, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes (Basel)*. 2022, 13(12), 2387. ISSN 2073-4425, DOI: 10.3390/genes13122387.
- 6) ARYA, M., SHERGILL, I. S., WILLIAMSON, M., GOMMERSALL, L., ARYA, N., PATEL, H. R. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review Molecular Diagnostics*. 2005, 5(2), 209-219. ISSN 1473-7159, DOI: 10.1586/14737159.5.2.209.
- 7) ASTASHKINA, A. I., MANN, B. K., PRESTWICH, G. D., GRAINGER, D. W. Comparing predictive drug nephrotoxicity biomarkers in kidney 3-D primary organoid culture and immortalized cell lines. *Biomaterials*. 2012, 33(18), 4712-4721. ISSN 0142-9612, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.001.
- 8) ATHERSUCH, T. J., ANTOINE, D. J., BOOBIS, A. R., COEN, M., DALY, A. K., POSSAMAI, L., NICHOLSON, J. K., WILSON, I. D. Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective. *Toxicology Research (Camb)*. 2018, 7(3), 347-357. ISSN 2045-452X, DOI: 10.1039/c7tx00340d.
- 9) AYOUB, S. S. Paracetamol (acetaminophen): A familiar drug with an unexplained mechanism of action. *Temperature: Multidisciplinary Biomedical Journal*. 2021, 8(4), 351-371. ISSN 2332-8940, DOI: 10.1080/23328940.2021.1886392.
- 10) BACHMAN, J. (2013). Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*. 2013, 530, 67-74. ISSN 0076-6879, DOI:10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6.
- 11) BAJAJ, P., CHOWDHURY, S. K., YUCHA, R., KELLY, E. J., XIAO, G. Emerging Kidney Models to Investigate Metabolism, Transport, and Toxicity of Drugs and Xenobiotics. *Drug Metabolism & Disposition*. 2018, 46(11), 1692-1702. ISSN 1521-009X, DOI:10.1124/dmd.118.082958.

- 12) BEST, D. H., ROBERTS, K. A. In Vitro Amplification Techniques. Pathobiology of Human Disease. 2014, 4064-4073. ISBN 9780123864574, DOI:10.1016/b978-0-12-386456-7.07702-9.
- 13) BUSTIN, S. HUGGETT, J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2017, 14, 19-28. ISSN 2214-7535, DOI: 10.1016/j.bdq.2017.11.001.
- 14) CHHABRA, R. S. Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics. *Environmental Health Perspectives*. 1979, 33, 61-69. ISSN 1552-9924, DOI:10.1289/ehp.793361.
- 15) CHERIYEDATH, S. History of Polymerase Chain Reaction (PCR). News-Medical. 2023 [cit. 2024-03-10]. Dostupné z [https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-2023.-Polymerase-Chain-Reaction-\(PCR\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-2023.-Polymerase-Chain-Reaction-(PCR).aspx).
- 16) CONNEY, A. H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Research*. 1982, 42(12), 4875-4917, ISSN 0008-5472.
- 17) CUNHA, E. N., DE SOUZA, M. F. B., LANZA, D. C. F., LIMA, J. P. M. S. A low-cost smart system for electrophoresis-based nucleic acids detection at the visible spectrum. *PLoS One*. 2020, 15(10). ISSN 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0240536.
- 18) CZERNY, T. High Primer Concentration Improves PCR Amplification from Random Pools. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24(5), 985-986. ISSN 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/24.5.985.
- 19) DASARI, S., TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014, 740, 364-378. ISSN 0014-2999, DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- 20) DEEPAK, S., KOTTAPALLI, K., RAKWAL, R., OROS, G., RANGAPPA, K., IWAHASHI, H., MASUO, Y., AGRAWAL, G. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics*. 2007, 8(4), 234-51. ISSN 1875-5488, DOI: 10.2174/138920207781386960.
- 21) DENOMME, G. A., RIOS, M., REID, M. E. Part 2 - General Considerations. *Molecular Protocols in Transfusion Medicine*. Academic Press. 2000, 9-18. ISBN 9780122093708, DOI:10.1016/b978-012209370-8/50003-9.
- 22) FERRINI, A. An Introduction to PCR. *Technology Networks: Genomics Research*. 2021 [cit. 2024-04-02]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/an-introduction-to-pcr-345445>.
- 23) GARCIA, S. L., LAURITSEN, J., ZHANG, Z., BANDAK, M., DALGAARD, M. D., NIELSEN, R. L., DAUGAARD, G., GUPTA, R. Prediction of Nephrotoxicity Associated With Cisplatin-Based Chemotherapy in Testicular Cancer Patients. *JNCI Cancer Spectrum*. 2020, 23, 4(3), pkaa032. ISSN 2515-5091, DOI: 10.1093/jncics/pkaa032.

- 24) GARIBYAN, L., AVASHIA, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, 133(3), 1-4. ISSN 1523-1747, DOI:10.1038/jid.2013.1.
- 25) GERRIETS, V., ANDERSON, J., PATEL, P., et al. Acetaminophen. In: StatPearls. Treasure Island (FL): TRETarls Publishing. 2024 [cit. 2024-03-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482369/>.
- 26) GOLD, J. M., RAJA, A. Cisplatin. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2024, [cit. 2024-03-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547695/>.
- 27) GOUVEIA, G. R., FERREIRA, S. C., FERREIRA, J. E., SIQUEIRA, S. A., PEREIRA, J. Comparison of two methods of RNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. *BioMed Research International*. 2014, 2014(2), 51724. ISSN 2314-6141, DOI:10.1155/2014/151724.
- 28) GREEN, M. R., SAMBROOK, J. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018, 5. ISSN 1559-6095, DOI:10.1101/pdb.prot095133.
- 29) GREEN, M. R., SAMBROOK, J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019, 6, 436-456. ISSN 1559-6095, DOI:10.1101/pdb.top095109.
- 30) GUANGPING, Ch. Chapter 3 – Xenobiotic metabolism and disposition. An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, Academic Press. 2020, 31-42. ISBN 9780128136027, DOI: 10.1016/B978-0-12-813602-7.00003-X.
- 31) GUNNESS, P., ALEKSA, K., KOSUGE, K., ITO, S., KOREN, G. Comparison of the novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010, 88(4), 448-455. ISSN 1205-7541, DOI: 10.1139/y10-023.
- 32) GUPTA N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*. 2019, 36(2), 116-117. ISSN 0974-5165, DOI: 10.4103/JOC.JOC_110_18.
- 33) HANDL, J., ČAPEK, J., MAJTNEROVÁ, P., BÁČOVÁ, J., ROUŠAR, T. The Effect of Repeated Passagigng on the Susceptibility of Human Proximal Tubular HK-2 Cells to Toxic Compounds. *Physiological research*. 2020, 69(4), 731-738. ISSN 1802-9973, DOI: 10.33549/physiolres.934491.
- 34) HARRIS, R. Z., BENET, L. Z., & SCHWARTZ, J. B. Gender Effects in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Drugs*. 1995, 50(2), 222-239. ISSN 0012-6667, DOI:10.2165/00003495-199550020-00003.
- 35) HAUSCHKE, M., ROUŠAROVÁ, E., FLÍDR, P., ČAPEK, J., LIBRA, A., ROUŠAR, A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin production negatively correlates with HK-2 cell impairment: Evaluation of NGAL as a marker of toxicity in HK-2 cells. *Toxicology in Vitro*. 2017, 39, 52-57. ISSN 0887-2333, DOI: 10.1016/j.tiv.2016.11.012.

- 36) HODIS, J. Nová fakta o paracetamolu, rizika předávkování, intoxikace a jejich zvládní. *Praktické lékařství*. 2015, 11(3), 90-93. ISSN 1803-5329.
- 37) HUSAIN, A., ZHANG, X., DOLL, M. A., STATES, J. C., BARKER, D. F., HEIN, D. W. Functional analysis of the human N-acetyltransferase 1 major promoter: quantitation of tissue expression and identification of critical sequence elements. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007, 35(9), 1649-1656. ISSN 0090-9556, DOI: 10.1124/dmd.107.016485.
- 38) JALALI, M., ZABOROWSKA, J., JALALI, M. Chapter 1 – The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, Academic Press. 2017, 1-18. ISBN 9780128030776, DOI: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1.
- 39) JÓŹWIAK-BEBENISTA, M., NOWAK, J. Z. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Poloniae Pharmaceutice*. 2014, 71(1), 11-23. ISSN 0001-6837, PMID: 24779190.
- 40) KAPAŁCZYŃSKA, M., KOLENDA, T., PRZYBYŁA, W., ZAJĄCZKOWSKA, M., TERESIAK, A., FILAS, V., IBBS, M., BLIŹNIAK, R., ŁUCZEWSKI, Ł., LAMPERSKA, K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. 2018, 14(4), 910-919. ISSN 1896-9151, DOI: 10.5114/aoms.2016.63743.
- 41) KAWAKAMI, H., OHTSUKI, S., KAMIIE, J., SUZUKI, T., ABE, T., TERASAKI, T. Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, 100(1), 341-52. ISSN 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.22255.
- 42) KIM, S. Y., MOON, A. Drug-induced nephrotoxicity and its biomarkers. *Biomolecules & Therapeutics*. 2012, 20(3), 268-72. ISSN 2005-4483, DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.3.268.
- 43) KLAASSEN, C. D. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition. McGraw Hill Professional. 2007. ISBN 9780071470513, DOI: 10.1036/0071470514.
- 44) KORNBERG, A., BAKER, T. A. DNA Replication, Second Edition. University Science Books, 2005. ISBN: 1-891389-44-0.
- 45) KUBIAK, X., LI DE LA SIERRA-GALLAY, I., CHAFFOTTE, A. F., PLUVINAGE, B., WEBER, P., HAOUZ, A., DUPRET, J. M., RODRIGUES-LIMA, F. Structural and biochemical characterization of an active arylamine N-acetyltransferase possessing a non-canonical Cys-His-Glu catalytic triad. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, 288(31), 22493-505. ISSN 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M113.468595.

- 46) KWIATKOWSKA, E., DOMAŃSKI, L., DZIEDZIEJKO, V., KAJDY, A., STEFAŃSKA, K., KWIATKOWSKI, S. The Mechanism of Drug Nephrotoxicity and the Methods for Preventing Kidney Damage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 6, 22(11), 6109. ISSN 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms22116109.
- 47) KWOK, K. K., VINCENT, E. C., GIBSON, J. N. 36 – Antineoplastic Drugs. *Harmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)*, Mosby. 2017, 530-562. ISBN 9780323393072, DOI: 10.1016/B978-0-323-39307-2.00036-9.
- 48) LANG, N. P., BUTLER, M. A., MASSENGILL, J., LAWSON, M., STOTTS, R. C., HAUER-JENSEN, M., KADLUBAR, F. F. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1994, 3(8), 675-682. ISSN 1538-7755.
- 49) LI, K., BROWNLEY, A. Primer design for RT-PCR. *Methods in molecular biology*. 2010, 630, 271-299. ISSN 1940-6029, DOI: 10.1007/978-1-60761-629-0_18.
- 50) LORENZ, T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (63), e3998. ISSN 1940-087X, DOI:10.3791/3998.
- 51) MAGA, G. DNA Polymerases. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. 2019. ISBN 9780128012383, DOI:10.1016/B978-0-12-801238-3.62185-2.
- 52) MAHEASWARI, R., KSHIRSAGAR, J. T., LAVANYA, N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2016, 20(2), 128-135. ISSN: 0975-1580, DOI:10.4103/0972-124X.176391.
- 53) MANDAL, A. What is DNA Polymerase? News-Medical. 2022 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-DNA-Polymerase.aspx>.
- 54) MANIKANDAN, P., NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets*. 2018, 19(1), 38-54. ISSN 1873-5592, DOI: 10.2174/1389450118666170125144557.
- 55) MAZER, M., PERRONE, J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Journal of Medical Toxicology*. 2008, 4(1), 2-6. ISSN 1937-6995, DOI: 10.1007/BF03160941.
- 56) MCCARTHY, T. C., SINAL C. J. Biotransformation. *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*, Elsevier. 2005, 299-312. ISBN 9780123694003, DOI:10.1016/B0-12-369400-0/00137-X.

- 57) MCGILL, M. R., JAESCHKE, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*. 2013, 30(9), 2174-87. ISSN 1573-904X, DOI: 10.1007/s11095-013-1007-6.
- 58) MILLNER, L. M., DOLL, M. A., STEPP, M. W., STATES, J. C., HEIN, D. W. Functional analysis of arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) NAT1*10 haplotypes in a complete NATb mRNA construct. *Carcinogenesis*. 2012, 33(2), 348-355. eISSN 1460-2180, DOI:10.1093/carcin/bgr273.
- 59) MO, Y., WAN, R., ZHANG, Q. Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Methods in molecular biology*. 2012, 926, 99-112. ISSN 1940-6029, DOI: 10.1007/978-1-62703-002-1_7.
- 60) MORI, N., KIDA, Y. S. Expression of genes involved in drug metabolism differs between perfusable 3D liver tissue and conventional 2D-cultured hepatocellular carcinoma cells. *FEBS Open Bio*. 2020, 10(10), 1985-2002. ISSN 2211-5463, DOI: 10.1002/2211-5463.12948.
- 61) MORIARTY, C., CARROLL, W. Paracetamol: pharmacology, prescribing and controversies. *Archives of Disease in Childhood: Education & Practice Edition*. 2016, 101(6), 331-334. ISSN 1743-0593, DOI: 10.1136/archdischild-2014-307287.
- 62) MOUSTAFA, K., CROSS, J. M. Genetic Approaches to Study Plant Responses to Environmental Stresses: An Overview. *Biology (Basel)*. 2016, 17, 5(2):20. ISSN 2079-7737, DOI:10.3390/biology5020020.
- 63) MOWAT, C. G., CHAPMAN, S. K. Cytochromes. In: Roberts, G.C.K. (eds) *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2013. ISBN 978-3-642-16712-6, DOI: 10.1007/978-3-642-16712-6_36.
- 64) NASSIRI, M., ELAHI TORSHIZI, M., GHOVVATI, S., DOOSTI, M. Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in silico approach for analysis of real-time PCR data. *Journal of Applied Statistics*. 2018, 45(2), 306-319. ISSN 1360-0532, DOI: 10.1080/02664763.2016.1276890.
- 65) NAVARRO, E., SERRANO-HERAS, G., CASTAÑO, M. J., SOLERA, J. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2015, 439, 231-250. ISSN 0009-8981, DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
- 66) NEUMANN, E., RIEPL, B., KNEDLA, A., LEFÈVRE, S., TARNER, I. H., GRIFKA, J., STEINMEYER, J., SCHÖLMERICH, J., GAY, S., MÜLLER-LADNER, U. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy*. 2010, 12(3):R83. ISSN: 1478-6362, DOI:10.1186/ar3010.

- 67) NHGRI (NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE). Polymerase chain reaction (PCR). 2023a [cit. 2023-11-05]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>.
- 68) NHGRI (NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE). Primer. 2023b [cit. 2023-11-05]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Primer>.
- 69) NHGRI (NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE). Polymerase Chain Reaction (PCR) Fact Sheet, 2020 [cit. 2023-11-05]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>.
- 70) PARK, M., WON, J., CHOI, B.Y. *et al.* Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020, 52, 963–977. ISSN 2126-3613, DOI: 10.1038/s12276-020-0452-7.
- 71) PARK, Y.-D., CHAE, Y.-J., MAENG, H.-J. Investigation of N-Acetyltransferase 2-Mediated Drug Interactions of Amifampridine: In Vitro and In Vivo Evidence of Drug Interactions with Acetaminophen. *Pharmaceutics*. 2023, 15(5), 1471. ISSN 1999-4923, DOI: 10.3390/pharmaceutics15051471.
- 72) PATTERSON, A. D., GONZALEZ, F. J., IDLE, J. R. Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer. *Chemical Research in Toxicology*. 2010, 23(5), 851-860. ISSN 1520-5010, DOI: 10.1021/tx100020p.
- 73) PAUL, N., SHUM, J., LE, T. Hot Start PCR. In: King, N. (eds) RT-PCR Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana Press. 2010, 301-318. ISBN 978-1-60761-628-3, DOI: 10.1007/978-1-60761-629-0_19.
- 74) PHANG-LYN, S., LLERENA, V. A. Biochemistry, Biotransformation. In: StatPearls. Treasure Island (FL): TRETarls Publishing. 2023 [cit. 2024-03-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544353/>.
- 75) POSTOLLEC, F., FALENTIN, H., PAVAN, S., COMBRISSE, J., SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*. 2011, 28(5), 848-861. ISSN 0740-0020, DOI:10.1016/j.fm.2011.02.008.
- 76) QIU, X., ZHOU, X., MIAO, Y., LI, B. An *in vitro* method for nephrotoxicity evaluation using HK-2 human kidney epithelial cells combined with biomarkers of nephrotoxicity. *Toxicology Research (Camb)*. 2018, 7(6), 1205-1213. ISSN 2045-452X, DOI: 10.1039/c8tx00095f.
- 77) RAGUNATHAN, N., DAIROU, J., PLUVINAGE, B., MARTINS, M., DUPRET, J.M., RODRIGUES-LIMA, F. Human arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) as a target of chemotherapeutic drugs in breast cancer: cisplatin as a model. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 2009, 1, 7-10. ISSN 1938-1247, DOI: 10.4255/mcpharmacol.09.02.

- 78) RAMACHANDRAN, A., JAESCHKE, H. Chapter 6 – Acetaminophen. Liver Pathophysiology, Academic Press. 2017, 101-112. ISBN 9780128042748, DOI: 10.1016/B978-0-12-804274-8.00006-0.
- 79) RAO, X., LAI, D., HUANG, X. A New Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. *Journal of Computational Biology*. 2013, 20(9), 703-711. ISSN 1557-8666, DOI:10.1089/cmb.2012.0279.
- 80) RODRIGUES-LIMA, F., DAIROU, J., BUSI, F., DUPRET, J.-M. Human Arylamine N-acetyltransferase 1: From Drug Metabolism to Drug Target. *Cell Signaling & Molecular Targets in Cancer*. 2011, 23-35. ISBN 9781461407300, DOI: 10.1007/978-1-4614-0730-0_2.
- 81) ROGERS, K. New Thinking About Genetics. First Edition. The Rosen Publishing Group, Inc, 2010. ISBN: 978-1-61530-169-0.
- 82) ROMKES, M., BUCH, S. C. Strategies for Measurement of Biotransformation Enzyme Gene Expression. In: Keohavong, P., Grant, S. G. (eds) *Molecular Toxicology Protocols. Methods in Molecular Biology*, Humana Press. 2005, 291, 387-398. ISBN 978-1-59259-840-3, DOI: 10.1385/1-59259-840-4:387.
- 83) ROURKE, J. L., SINAL, C. J. Biotransformation/Metabolism. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press. 2014, 490-502. ISBN 9780123864550, DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00007-5.
- 84) ROUZER, C. A., MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*. 2009, 50, 29-34. ISSN 0022-2275, DOI: 10.1194/jlr.R800042-JLR200.
- 85) RUIZ, J. D., AGÚNDEZ, J. A., MARTÍNEZ, C., GARCÍA-MARTIN, E. NAT2 (N-acetyltransferáza 2 (arylamin-N-acetyltransferáza)). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2009, DOI: 10.4267/2042/44659.
- 86) RYAN, M. J., JOHNSON, G., KIRK, J., FUERSTENBERG, S. M., ZAGER, R. A., TOROK-STORB, B. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International*. 1994, 45(1), 48-57. ISSN 2157-1724, DOI: 10.1038/ki.1994.6.
- 87) SALAZAR-GONZÁLEZ, R. A., DOLL, M. A., HEIN, D. W. Arylamine N-Acetyltransferase 1 Activity is Regulated by the Protein Acetylation Status. *Frontiers in Pharmacology*. 2022, 13. ISSN 1663-9812, DOI: 10.3389/fphar.2022.797469.
- 88) SCHMITTGEN, T. D., LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 2008, 3(6), 1101-1108. ISSN 1750-2799, DOI:10.1038/nprot.2008.73.
- 89) SETH, B. Non-opioid analgesics. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2019, 20, 8, 456-459. ISSN 1472-0299, DOI: 10.1016/j.mpaic.2019.06.001.

- 90) SHIMADA, T., YAMAZAKI, H., MIMURA, M., WAKAMIYA, N., UENG, Y. F., GUENGERICH, F. P., INUI, Y. Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. *Drug Metabolism and Disposition*. 1996, 24(5), 515-522. ISSN 0090-9556.
- 91) SIM, E., ABUHAMMAD, A., RYAN, A. Arylamine N-acetyltransferases: from drug metabolism and pharmacogenetics to drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. 2014, 171(11), 2705-25. ISSN: 1476-5381, DOI: 10.1111/bph.12598.
- 92) SIM, E., PAYTON, M., NOBLE, M., MINCHIN, R. An update on genetic, structural and functional studies of arylamine N-acetyltransferases in eucaryotes and procaryotes. *Human Molecular Genetics*. 2000, 9. ISSN 1460-2083, DOI:10.1093/hmg/9.16.2435.
- 93) SIM, E., WALTERS, K., BOUKOUVALA, S. Arylamine N-acetyltransferases: From Structure to Function. *Drug Metabolism Reviews*. 2008, 40(3), 479-510. ISSN 1097-9883, DOI:10.1080/03602530802186603.
- 94) SIM, E., WESTWOOD, I., FULLAM, E. Arylamine N-acetyltransferases. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2007, 3(2), 169-184. ISSN 1744-7607, DOI: 10.1517/17425255.3.2.169.
- 95) SINGH, K. P., MIASKOWSKI, C., DHRUVA, A. A., FLOWERS, E., KOBER, K. M. Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biological Research for Nursing*. 2018, 20(4), 369-382. ISSN 1099-8004, DOI: 10.1177/1099800418772161.
- 96) SKÁLOVÁ, L. et al. Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Vyd. 2. upravené. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 978-80-246-3762-4.
- 97) SOHN, S. J., KIM, S. Y., KIM, H. S., CHUN, Y. J., HAN, S. Y., KIM, S. H., MOON, A. In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicology Letters*. 2013, 217(3), 235-242. ISSN 0378-4274, DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.12.015.
- 98) SOUCEK, P. Xenobiotics. In: Schwab, M. (eds) Encyclopedia of Cancer. 2011. ISBN 978-3-642-16483-5, DOI: 10.1007/978-3-642-16483-5_6276.
- 99) STEPHENSON, F. H. Real-Time PCR. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology. 2016, 215-320. ISBN 978-01-280-2211-5, DOI: 10.1016/b978-0-12-802211-5.00009-6.
- 100) SUDHAKARAN, S., ARCHANA, T. M., AGUILAR, C.N. Biotransformation Enzymes. Bioresources and Bioprocess in Biotechnology. 2017, 129-150. ISBN 978-981-10-4284-3, DOI: 10.1007/978-981-10-4284-3_5.
- 101) ŠPIBIDA, M., KRAWCZYK, B., OLSZEWSKI, M., KUR, J. Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *Journal of Applied Genetics*. 2017, 58(1), 133-142. ISSN 2190-3883, DOI:10.1007/s13353-016-0371-4.

- 102) TCHOUNWOU, P. B., DASARI, S., NOUBISSI, F. K., RAY, P., KUMAR, S. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2021, 18, 13, 303-328. ISSN 1179-1454, DOI: 10.2147/JEP.S267383.
- 103) TESENA, P., KORCHUNJIT, W., TAYLOR, J., WONGTAWAN, T. Comparison of commercial RNA extraction kits and qPCR master mixes for studying gene expression in small biopsy tissue samples from the equine gastric epithelium. *Journal of Equine Science*. 2017, 28(4), 135-141. ISSN 1340-3516, DOI: 10.1294/jes.28.135.
- 104) THERMO FISHER SCIENTIFIC. PCR Basics. ©2006-2023 [cit. 2023-11-24]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>.
- 105) TIMBRELL, J. A., MARRS, T. C. Biotransformation of Xenobiotics. General and Applied Toxicology. 2011. ISBN 9780470723272, DOI: 10.1002/9780470744307.gat004.
- 106) TOUSSAINT, K., YANG, X. C., ZIELINSKI, M. A., REIGLE, K. L., SACAVAGE, S. D., NAGAR, S., RAFFA, R. B. What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2010, 35, 617-638. ISSN 1365-2710, DOI: 10.1111/j.1365-2710.2009.01143.x.
- 107) VRBOVÁ, M., DASTYCHOVÁ, E., ROUŠAR, T. Renal cell lines for study of nephrotoxicity in vitro. *Military Medical Science Letters*. 2016a, 85(2), 69-74. ISSN 2571-113X, DOI: 10.31482/mmsl.2016.013.
- 108) VRBOVÁ, M., ROUŠAROVÁ, E., BRŮČKOVÁ, L., ČESLA, P., ROUŠAR, T. Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiological Research*. 2016b, 8, 65(4), 627-635. ISSN 0862-8408, DOI: 10.33549/physiolres.933158.
- 109) WALKER, K., GINSBERG, G., HATTIS, D., JOHNS, D. O., GUYTON, K. Z., & SONAWANE, B. Genetic Polymorphism in N-Acetyltransferase (NAT): Population Distribution of NAT1 and NAT2 Activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2009, 12(5-6), 440-472. ISSN 1093-7404, DOI:10.1080/10937400903158383.
- 110) WANG G, BI Y, XIONG H, BO T, HAN L, ZHOU L, ZHANG C, ZHANG Y. Wedelolactone protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice via inhibition of organic cation transporter 2. *Human and Experimental Toxicology*. 2021, 40(12), 447-459. ISSN 1477-0903, DOI: 10.1177/096032712111047915.
- 111) WANG, L., ZHAO, X., FU, J., XU, W., YUAN, J. The Role of Tumour Metabolism in Cisplatin Resistance. *Frontiers of Molecular Biosciences*. 2021, 23, 8, 691795. ISSN 2296-889X, DOI:10.3389/fmolb.2021.691795.

- 112) WATERS, D. L., SHAPTER, F. M. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods in molecular biology*. 2014, 1099, 65-75. ISSN 1940-6029, DOI: 10.1007/978-1-62703-715-0_7.
- 113) WINDMILL, K. F., GAEDIGK, A., DE LA M. HALL, P., SAMARATUNGA, H., GRANT, D. M., MCMANUS, M. E. Localization of *N*-Acetyltransferases NAT1 and NAT2 in Human Tissues. *Toxicological Sciences*. 2000, 54, 19-29. ISSN 1096-6080, DOI: 10.1093/toxsci/54.1.19.
- 114) WU, H., DOMBROVSKY, L., TEMPEL, W., MARTIN, F., LOPPNAU, P., GOODFELLOW, G. H., GRANT, D. M., PLOTNIKOV, A. N. Structural Basis of Substrate-binding Specificity of Human Arylamine *N*-Acetyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282, 41, 30189-30197. ISSN 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M704138200.
- 115) YAO, X., PANICHPISAL, K., KURTZMAN, N., NUGENT, K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *The American journal of the medical sciences*. 2007, 334(2), 115-24. ISSN 1538-2990, DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e.
- 116) YE, J., COULOURIS, G., ZARETSKAYA, I., CUTCUTACHE, I., ROZEN, S., MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012, 13, 134. ISSN 1471-2105, DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.
- 117) YU, P., DUAN, Z., LIU, S., PACHON, I., MA, J., HEMSTREET, G. P., ZHANG, Y. Drug-Induced Nephrotoxicity Assessment in 3D Cellular Models. *Micromachines (Basel)*. 2021, 13(1), 3. ISSN 2072-666X, DOI: 10.3390/mi13010003.
- 118) YU, P., ZHU, H., BOSHOLM, C. C., BEINER, D., DUAN, Z., SHETTY, A. K., MOU, S. S., KRAMER, P. A., BARROSO, L. F., LIU, H., CHENG, K., IHNAT, M., GORRIS, M. A., ALOI, J. A., WOLDEMICHAEL, J. A., BLEYER, A., ZHANG, Y. Precision nephrotoxicity testing using 3D in vitro models. *Cell & Bioscience*. 2023, 13(1), 231. ISSN 2045-3701, DOI: 10.1186/s13578-023-01187-0.
- 119) ZANGER, U. M., SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013, 138(1), 103-141. ISSN 0163-7258, DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
- 120) ZHAO, M., MA, J., LI, M., ZHANG, Y., JIANG, B., ZHAO, X., HUAI, C., SHEN, L., ZHANG, N., HE, L., QIN, S. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(23), 12808. ISSN 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms222312808.
- 121) ZHOU, X., MA, Z., DONG, D., WU, B. Arylamine *N*-acetyltransferases: a structural perspective. *British Journal of Pharmacology*. 2013, 169(4), 748-60. ISSN:1476-5381, DOI: 10.1111/bph.12182.

- 122) ZHU, H., ZHANG, H., XU, Y., LAŠŠÁKOVÁ, S., KORABEČNÁ, M., NEUŽIL, P. PCR past, present and. *BioTechniques*. 2020, 1-10. ISSN 1940-9818, DOI: 10.2144/btn-2020-0057.
- 123) ZYMO RESEARCH. What is TRIzol®? 2024 [cit. 2024-04-05]. Dostupné z: <https://zymoresearch.eu/pages/what-is-trizol>.

8 PŘÍLOHY

8.1 Sekvence pro návrh primerů

Příloha 1: **Referenční sekvence NAT1 s navrženými primery.** NAT1 ID: NM_000662.8; FASTA formát; 1799 bp; mRNA; přední primer – podtržený, tučný; reverzní primer – tučný.

```
ACTTCCTCATAGACCTTGGATGTGGGAGGATTGCATTTCAGTCTAGTTCCTGGTTGCCGGCTGAAATAACCTGAAT
TCAAGCCAGGAAGAAGCAGCAATCTGTCTTCTGGATTAATAACTGAAGATCAACCTACTTTCAACTTACTAAGAAA
GGGGATCATGGACATTGAAGCATATCTTGAAGAATTGGCTATAAGAAGTCTAGGAACAAATTGGACTTGGAAAC
ATTAACCTGACATTCCTTCAACACCAGATCCGAGCTGTTCCCTTTGAGAACCTTAACATCCATTGTGGGGATGCCAT
GGACTTAGGCTTAGAGGCCATTTTTGATCAAGTTGTGAGAAGAAATCGGGGTGGATGGTGTCTCCAGGTCAATCA
TCTTCTGTACTGGGCTCTGACCACTATTGGTTTTGAGACCACGATGTTGGGAGGGTATGTTTACAGCACTCCAGC
CAAAAAATACAGCACTGGCATGATTCACCTTCTCCTGCAGGTGACCATTGATGGCAGGAACCTACATTGTTCGATGC
TGGGTTTTGGACGCTCATACCAGATGTGGCAGCCTCTGGAGTTAATTTCTGGGAAGGATCAGCCTCAGGTGCCTTG
TGTCTCCGTTTGACGGAAGAGAATGGATTCTGGTATCTAGACCAAATCAGAAGGGAACAGTACATTCCAAATGA
AGAATTTCTTTCATTCGATCTCCTAGAAGACAGCAAATACCGAAAAATCTACTCCTTTACTCTTAAGCCTCGAAC
AATTGAAGATTTTGAGTCTATGAATACATACCTGCAGACATCTCCATCATCTGTGTTTACTAGTAAATCATTTTG
TTCTTGCAGACCCAGATGGGGTTCAGTGTGGTGGGCTTCACCCTCACCCATAGGAGATTCAATTATAAGGA
CAATACAGATCTAATAGAGTTCAAGACTCTGAGTGAGGAAGAAATAGAAAAAGTGCTGAAAAATATATTTAATAT
TTCTTGCAGAGAAAGCTTGTGCCCAAACATGGTGATAGATTTTTTACTATTTAGAATAAGGAGTAAAAACAATCT
TGTCTATTTGTCATCCAGCTCACCAGTTATCAACTGACGACCTATCATGTATCTTCTGTACCCTTACCTTATTTT
GAAGAAAATCCTAGACATCAAATCATTTACCTATAAAAAATGTCATCATATATAAATAAACAGCTTTTTAAAGAA
ACATAACCACAAACCTTTTCAAATAATAATAATAATAATAATAAAAAATGTATTTTAAAGATGGCCTGTGGTTAT
CTTGGAAATGGTGATTTATGCTAGAAAGCTTTAATGTTGGTTTTATTGTTGAATTCCTAGAAAAGTTTTATTGG
TAGATGAGTAAATAAAATATTTGTAAAAAAACTTATTGTCTATAAAGTATATTTAAACATTGTTGGCTAATATAAT
TTGAAAAAAAGTGGTTTTTTGGAAGACTTAGGATATTATGGTGCTACATAATTTTTTCTCGATGCTCTCTTCCCTC
TCATCTTTCTTGTCTCTTAAATTACTTTACTTCTTGCACACTTTGCCATACAAGAATGAACATGAGCTTTTCTT
GTGTAGATCTGAGTTGAAATCCTGTGGACACTGGGCGAATTACTTTTTAGATCTGTAGCTCTGACTCCTCAGGCA
TAAATGGGAATAATGCTTTTACAGTTTAGTGGCGGAACCTAACTCCCAAATTTATTTGTTATATGGATCAAGTA
ATAACGTCAGTAATGTTTTTGGTACAAAGTCATTATTTAATAAAAGTTATTGTTCCATCTTGCTTGCCCCCCA
```

Příloha 2: **Referenční sekvence NAT2 s navrženými primery.** NAT2 ID: NM_000015.3; FASTA formát; 1285 bp; mRNA; přední primer – podtržený, tučný; reverzní primer – tučný.

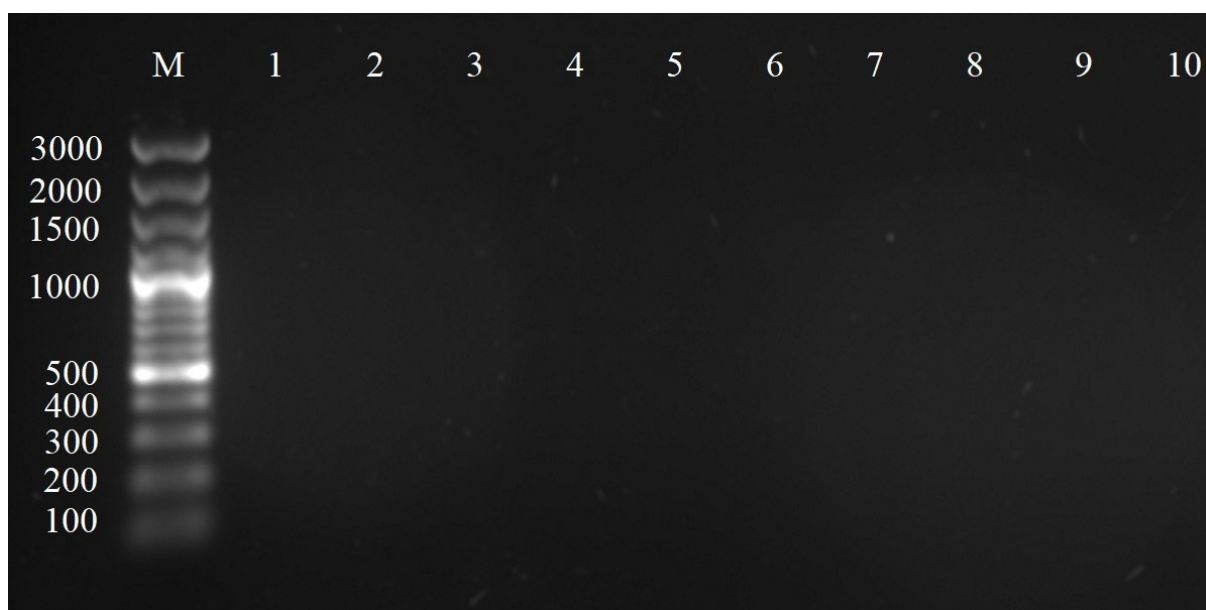
```
ACTTTATTACAGACCTTGGGAAGCAAGAGGATTGCATTTCAGCCTAGTTCCTGGTTGCTGGCCAAAGGGATCATGGA
CATTTGAAGCATATTTTGAAGAATTGGCTATAAGAACTCTAGGAACAAATTGGACTTGGAAACATTAACCTGACAT
TCTTGAGCACCAGATCCGGGCTGTTCCCTTTGAGAACCTTAACATGCATTGTGGGCAAGCCATGGAGTTGGGCTT
AGAGGCTATTTTTGATCACATTGTAAGAAGAAACCGGGGTGGGTGGTGTCTCCAGGTCAACTCAACTTCTGTACTG
GGCTCTGACCACAATCGGTTTTTCCAGACCACAATGTTAGGAGGGTATTTTTACATCCCTCCAGTTAACAAATACAG
CACTGGCATGGTTCACCTTCTCCTGCAGGTGACCATTGACGGCAGGAATTACATTGTTCGATGCTGGGTCTGGAAG
CTCCTCCCAGATGTGGCAGCCTCTAGAATTAATTTCTGGGAAGGATCAGCCTCAGGTGCCTTGCATTTTTCTGCTT
GACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTACCTGGACCAAATCAGGAGAGAGCAGTATATTACAAACAAAGAATTTCTTAA
TTCTCATCTCCTGCCAAAGAAGAAACACCAAAAAATATACTTATTTACGCTTGAACCTCGAACAATTGAAGATTT
TGAGTCTATGAATACATACCTGCAGACGTCTCCAACATCTTCAATTTATAACCACATCATTTTTGTTCCCTGCAGAC
CCCAGAAGGGGTTTACTGTTTTGGTGGGCTTCATCCTCACCTATAGAAAATTCGAATTTATAAAGACAATACAGATCT
GGTCGAGTTTTAAACTCTCACTGAGGAAGAGGTTGAAGAAGTGCTGAGAAATATATTTAAGATTTCTTGGGGAG
AAATCTCGTGCCCAAACCTGGTGATGGATCCCTTACTATTTAGAATAAGGAACAAATAAACCTTGTGTATGTA
TCACCCAACCTCAATTAATCAACTTATGTGCTATCAGATATCCTCTCTACCCTCACGTTATTTTTGAAGAAAATC
CTAAACATCAAATACTTTTATCCATAAAAAATGTCAGCATTTATTAATAAAACAATAACTTTTTTAAAGAAAACATAAG
GACACATTTTCAAATTAATAAAAAATAAAGGCATTTTAAAGGATGGCCTGTGATTATCTTGGGAAGCAGAGTGATTC
ATGCTAGAAAACATTTAATATTGATTTATTGTTGAATTCATAGTAAATTTTTTACTGGTAAATGAATAAAGAATAT
TGTGGAATAA
```

Příloha 3: **Referenční sekvence GAPDH s navrženými primery.** GAPDH ID: NM_002046.7; FASTA formát; 1285 bp; mRNA; přední primer – podtržený, tučný; reverzní primer – tučný.

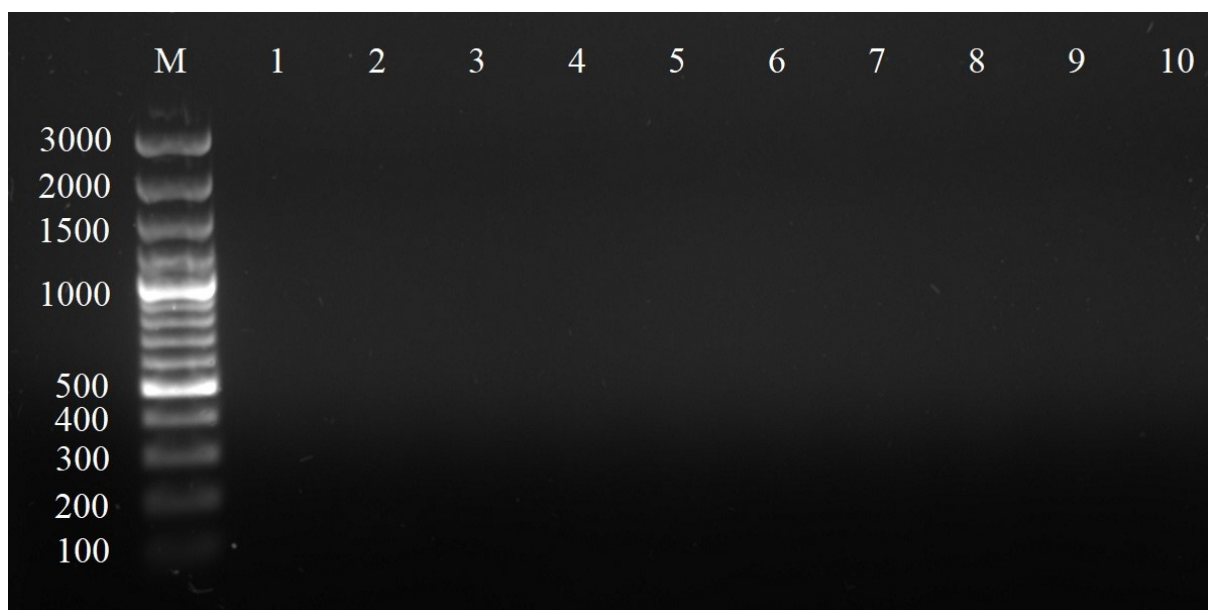
GCTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGGCGTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACAC
 CATGGGGAAGGT**GAAGGTCGGAGTCAACGGAT**TTGGTCGTATTGGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACTC
 TGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCAATGACCCCTTCAATTGACCTCAACTACATGGTTTTACATGTTCCAATATGA
 TTCCACCCATGGCAAATTCATGGCACCCTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTTCATCAATGGAAATCCCATCAC
 CATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGGCGATGCTGGCGCTGAGTACGTCGTGGAGTCCACTGG
 CGTCTTACCACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCATTTCAGGGGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCCCCTC
 TGCTGATGCCCCCATGTTTCGTTCATGGGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGC
 CTCTGCACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGGTATCGTGGAAAGGACTCAT
 GACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCG
 CGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAA
 CGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGA
 AAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGG
 CTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGG
 CATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGT
 GGACCTCATGGCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAG
 AGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTT
 GCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTG
 TGCTCAACCA

8.2 Výsledky agaróзовé gelové elektroforézy NTC

Příloha 4: **Gelová elektroforéza PCR produktů negativních kontrol pro primery NAT1.**
 Tm: 1 – 51 °C; 2 – 51,2 °C; 3 – 51,8 °C; 4 – 52,6 °C; 5 – 53,5 °C; 6 – 54,4 °C; 7 – 55,4 °C;
 8 – 56,3 °C; 9 – 57,2 °C; 10 – 58 °C; Marker (M): 3000 bp; 2000 bp; 1500 bp; 1000 bp;
 500 bp; 400 bp; 300 bp; 200 bp; 100 bp.



Příloha 5: Gelová elektroforéza PCR produktů negativních kontrol pro primery NAT2.
T_m: 1 – 51 °C; 2 – 51,2 °C; 3 – 51,8 °C; 4 – 52,6 °C; 5 – 53,5 °C; 6 – 54,4 °C; 7 – 55,4 °C;
8 – 56,3 °C; 9 – 57,2 °C; 10 – 58 °C; Marker (M): 3000 bp; 2000 bp; 1500 bp; 1000 bp;
500 bp; 400 bp; 300 bp; 200 bp; 100 bp.



Příloha 6: Gelová elektroforéza PCR produktů negativních kontrol pro primery GAPDH.
T_m: 1 – 51 °C; 2 – 51,2 °C; 3 – 51,8 °C; 4 – 52,6 °C; 5 – 53,5 °C; 6 – 54,4 °C; 7 – 55,4 °C;
8 – 56,3 °C; 9 – 57,2 °C; 10 – 58 °C; Marker (M): 3000 bp; 2000 bp; 1500 bp; 1000 bp;
500 bp; 400 bp; 300 bp; 200 bp; 100 bp.

