

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VLIV GLUTAMÁTEM NAVOZENÉ OBEZITY
NA DETOXIKAČNÍ ENZYMY OBSAHUJÍCÍ
GLUTATHION**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Mgr. Kateřina Duchačová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Mgr. Kateřina Duchačová

Zde bych ráda poděkovala vedoucí práce, doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, a v neposlední řadě také za trpělivost s mými několikerými pauzami z důvodu těhotenství a prvního roku mateřství v průběhu vypracovávání této rigorózní práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Kateřina Ducháčová

Školitel: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Název rigorózní práce: **Vliv glutamátem navozené obezity na detoxikační enzymy obsahující glutathion**

Obezita a s ní spojené zdravotní komplikace se v populaci vyskytují stále častěji a patří k nejstudovanějším zdravotním tématům dneška. Také stárnutí organismu je velmi diskutované. Používá se různých zvířecích modelů a sledují se změny v organismu na orgánové, tkáňové, buněčné i molekulární úrovni. Úkolem této práce bylo porovnání specifických aktivit a proteinové exprese enzymů glutathionperoxidasy (GPx) a glutathionreduktasy (GR) a specifické aktivity glutathion-S-transferasy (GST) v játrech obézních myší a zdravých kontrol z hlediska patologického stavu, stárnutí a pohlaví. Použity byly skupiny myší s obezitou navozenou glutamátem sodným (MSG), osmolální kontroly (NaCl) a myši bez léčby obou pohlaví a stáří 8 a 20 týdnů. Specifické aktivity enzymů byly stanoveny spektrofotometricky. Proteinová exprese byla stanovena pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy a imunoblottingu. Největší změny v aktivitě enzymu v souvislosti s obezitou jsem zjistila u GST, jejíž aktivita klesla u obézních samců přibližně o 50 %, zatímco u samic nebyl výrazný rozdíl. Specifická aktivita enzymů GR a GPx se navozením obezity výrazně nezměnila. Pohlaví nejvíce ovlivnilo aktivitu enzymu GST. Samci kontrolních skupin měli dvojnásobně vyšší aktivitu GST než samice stejného věku, obezita tento rozdíl potlačila. S věkem se aktivita studovaných detoxikačních enzymů příliš neměnila. Proteinová exprese GR se vlivem obezity zvýšila přibližně o jednu až dvě třetiny oproti kontrolním skupinám. S věkem proteinová exprese GR většinou mírně klesala a ve většině skupin měli samci mírně nižší expresi GR než samice. Exprese GPx2 se měnila nejednoznačně a převážně u samců.

ABSTRACT

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Kateřina Ducháčová
Supervisor: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.
Title of rigorous thesis: **Influence of glutamate-induced obesity on detoxification enzymes contains glutathione**

Obesity and related comorbidities occur more frequently in the population and belong to the most studied contemporary health topics. Aging of the organism is much discussed topic as well. Various animal models are used to observe changes in the organism at the organ, tissue, cellular and molecular levels. Comparison of specific activities and protein expressions of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), and specific activity of glutathione-S-transferase (GST) in the liver of obese mice and healthy controls according to the pathological state, aging and sex was the aim of this study. Mice with monosodium glutamate (MSG)-induced obesity, osmolal controls (NaCl) and mice without treatment of both sexes and at 8 and 20 weeks of age were used. Specific enzyme activities were determined spectrophotometrically. Protein expressions were determined using polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting. The biggest obesity-related changes in enzyme activity were observed in GST, which activity declined in obese male mice by 50%, while in female mice was the difference insignificant. The specific activities of GR and GPx enzymes did not change significantly upon obesity induction. Among studied enzymes, the activity of GST was the most influenced by the gender. Male mice in control groups had twice as high GST activity as females of the same age; this difference was suppressed by obesity. The activity of studied detoxification enzymes remained almost unchanged with increasing age. Protein expression of GR has increased by one- or two-thirds due to obesity in comparison with control groups. GR protein expression usually slightly decreased with age and in most groups was GR expression slightly lower in males than in females. GPx2 protein expression changed ambiguously and mainly in males.

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Současný stav řešené problematiky	9
2.1. Obezita.....	9
2.1.1. Definice a klasifikace obezity	9
2.1.2. Etiopatogeneze obezity.....	10
2.1.3. Léčba obezity	13
2.1.4. Komplikace obezity.....	26
2.2. Enzymový systém s glutathionem	26
2.2.1. Glutathionperoxidasy	31
2.2.2. Glutathionreduktasa.....	32
2.2.3. Glutathion-s-transferasy	33
3. Cíle práce	34
4. Materiál a metodika.....	36
4.1. Chemikálie a přístroje.....	36
4.2. Příprava 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4)	37
4.3. Navození obezity glutamátem sodným u nmri myši a stanovení základních biochemických parametrů	37
4.4. Příprava subcelulárních frakcí.....	38
4.5. Bca metoda pro stanovení koncentrace bílkoviny	38
4.6. Stanovení aktivity glutathionperoxidasy	40
4.7. Stanovení aktivity glutathionreduktasy	42
4.8. Stanovení aktivity glutathion-s-transferasy	44
4.9. Polyakrylamidová gelová elektroforéza	45
4.10. Imunoblotting	49

4.11. Chemiluminiscenční detekce proteinů	52
5. Výsledky	53
5.1. Biochemické charakteristiky jednotlivých skupin myší.....	53
5.2. Aktivita a exprese glutathionperoxidasy	55
5.3. Aktivita a exprese glutathionreduktasy	62
5.4. Specifická aktivita glutathion-s-transferasy	69
6. Diskuze.....	74
7. Závěr	80
8. Seznam použité literatury.....	82
9. Seznam použitých zkratk.....	86
10. Seznam obrázků a tabulek.....	89

1. Úvod

Rigorózní práci jsem vypracovávala na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy pod odborným vedením doc. PharmDr. Ivy Boušové, Ph.D. Pro studium obezity je na katedře zaveden model myši s obezitou navozenou glutamátem sodným. Tento model jsem využila také při vypracování své diplomové práce, kde jsem se zabývala vlivem glutamátem navozené obezity na antioxidační enzymy u myši (konkrétně na katalasu, superoxidodismutasu a peroxidasy). Tuto práci jsem pojala jako prohloubení znalostí a pokračování ve studiu vlivu tohoto typu obezity na další enzymy, tentokrát na detoxikační enzymy obsahující glutathion. Stanovovala jsem specifické aktivity glutathionperoxidasy, glutathionreduktasy a glutathion-S-transferasy a porovnávala je s ohledem na věk, pohlaví a patologický stav pokusných zvířat. U glutathionperoxidasy a glutathionreduktasy jsem stanovovala a porovnávala také proteinovou expresi.

Obezita a s ní související onemocnění jsou důležitým veřejným zdravotním tématem nejen v bohatých společnostech, ale i v některých rozvojových zemích (Segula et al. 2014). Příčiny vzniku obezity jsou velmi diskutované a zabývá se jimi mnoho vědeckých týmů. Jedná se o chronické onemocnění, kdy přesná etiologie není vždy známá, ale zejména u morbidní obezity bývá příčinou více faktorů (Fobi et al. 2004). V organismu dochází při obezitě ke zvýšení oxidačního stresu. Glutathion je jedním z nejdůležitějších hydrofilních intracelulárních nebílkovinných antioxidantů. Mezi enzymy podílející se na antioxidační funkci glutathionu patří glutathionperoxidasy, glutathionreduktasa a glutathion-S-transferasy (Nýdlová et al. 2014), kterými se ve své práci zabývám.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1. Obezita

2.1.1. Definice a klasifikace obezity

Definovat pojem obezita není snadné. Lze říci, že se jedná o nadbytek tělesného tuku. U dospělého člověka by mělo být v těle přítomno asi 15-20% tuku, u žen je obsah tuku vyšší (až 25-30%) z celkové tělesné hmotnosti. Jiní však mohou oponovat, že nejde o množství, ale o rozložení tuku v těle (Kopelman et al. 2010).

Obezita vzniká při pozitivní energetické bilanci. Tato skutečnost má významný zdravotní dopad, protože zvyšuje riziko vzniku řady dalších chorob (Vlček a Fialová 2010). Obezita významně zvyšuje nemocnost, úmrtnost, zhoršuje kvalitu života a přináší závažné socioekonomické problémy. Její prevalence roste a lze hovořit již o epidemii. Nejedná se o kosmetický problém, či o selhání jedince, ale o komplexní onemocnění, při jehož rozvoji se uplatňují jak vrozené predispozice, tak vlivy současného obezitogenního prostředí (Hainer 2011).

Pro klasifikaci obezity se používá index tělesné hmotnosti (BMI, z anglického *body mass index*), což je poměr hmotnosti v kg a výšky v metrech na druhou.

- Normální hmotnost: BMI **18,5-24,9**
- Nadváha: BMI **25,0-29,9**
- Obezita 1. stupně (mírná): BMI **30,0-34,9**
- Obezita 2. stupně (střední): BMI **35,0-39,9**
- Obezita 3. stupně (těžká): BMI **40 a víc** (Vlček a Fialová 2010)

Nicméně, riziko komorbidit spojených s obezitou roste také u jedinců s normální váhou a BMI, kteří mají větší obvod pasu. Jestliže má muž více než **102 cm** a žena více než **88 cm** v pase, značí to významné riziko vzniku zdravotních komplikací (Kaila a Raman 2008). Dalším kritériem je poměr obvodu těla v pase a kolem boků, který by měl být u mužů do **0,95** a u žen do **0,85** (Masopust 2006).

Obezita, definovaná jako BMI větší než 30 kg/m^2 , je skutečný zdravotní problém. Dosahuje globálních rozměrů epidemie a Světová zdravotnická organizace odhaduje, že na světě je více než miliarda lidí s nadváhou a minimálně 300 milionů obézních

(Kanasaki a Koya 2011). Přibližně 2,4 % finančních nákladů ve zdravotnictví je vynaloženo na léčbu obezity (Kaila a Raman 2008).

2.1.2. Etiopatogeneze obezity

V etiopatogenezi obezity se uplatňuje řada faktorů zahrnujících interakce mezi genetikou, hormony a prostředím. Zkoumá se řada genů, které mohou být zapojeny do vzniku obezity a některé závěry nejsou jednotné. Jedná se například o gen pro β_3 -adrenergní receptor, gen pro melanokortinový receptor 4, chromosom 10p a gen pro receptor PPAR γ_2 (*peroxisome proliferators-activated receptors*). Mezi hormony zapojené do patofyziologie obezity patří hormony vylučované ze střeva, adipokiny a další. Sekundárními příčinami vzniku obezity jsou některá léčiva a neuroendokrinní nemoci, např. onemocnění hypothalamu, hypofýzy, štítné žlázy a nadledvinek (Kaila a Raman 2008).

2.1.2.1. Genetické a vrozené příčiny obezity

Genetické faktory ovlivňují energetickou rovnováhu jak s ohledem na energetický příjem, tak na energetický výdej. Obezita je všeobecně považována za onemocnění významně související s životním stylem, tedy s prostředím, a podíl genetických faktorů je podceňován. Významný vliv určitého chromozomálního lokusu se uplatňuje zejména u těžkých obezit. Polygenní vliv se vztahuje k různým stupňům akumulace tělesného tuku a tyto vlivy jsou častější než monogenní. Obezita je poté výsledkem interakce prostředí s geny obezitogenními a také s geny, které naopak rozvoji obezity brání, tedy leptogenními. Úpravou životního stylu, prevencí a léčbou obezity můžeme významně modifikovat prostředí a zabránit tak manifestaci genů zvyšujících náchylnost ke vzniku obezity. Mezi geneticky determinované faktory ovlivňující rozvoj obezity řadíme například regulaci příjmu potravy v hypothalamu, expresi a aktivitu hormon-senzitivní lipasy a lipoproteinové lipasy, expresi β -adrenergních receptorů v tukové tkáni, složení kosterního svalstva, klidový energetický výdej a spontánní pohybovou aktivitu (Hainer 2011).

Populační genetické studie zkoumají kandidátní geny. Nejslibnější se zdají být například gen pro receptor TNF α (tumor-nekrotizující faktor α), gen sdružený s vysokou hladinou triacylglycerolů nebo lokus související s transientním neonatálním diabetem mellitem. Mutace v leptinovém systému jsou vzácné. Ve vysoké frekvenci se u obézních

vyskytuje mutace genu pro β_3 -adrenergní receptor v tukové tkáni (regulace metabolismu lipidů a termogeneze). Na ovlivnění BMI u lidí s predispozicí k obezitě se pravděpodobně podílí mutace nukleárního receptoru PPAR γ , který je důležitý pro adipogenezi a insulinovou signalizaci (Masopust 2006). Vrozenou příčinou obezity může být dědičná choroba, např. Prader-Williho syndrom nebo Bardetův-Biedlův syndrom (Hainer 2011, Vlček a Fialová 2010).

Nízká porodní hmotnost, respektive nízký poměr hmotnosti k délce, předurčuje zvýšené riziko rozvoje metabolického syndromu a výskytu kardiovaskulárních onemocnění v pozdějším věku. Jedná se o tzv. prenatální naprogramování šetřícího energetického metabolismu (Masopust 2006).

2.1.2.2. Hormonální regulace energetického metabolismu

Regulace energetického metabolismu je komplexní děj, který je ovlivňován mechanickými signály ze zažívacího traktu, nutričními signály, termogenními signály a také neurohumorálními signály z hypothalamu. Ventromediální hypothalamus je centrem sytosti, zatímco laterální centrem hladu. Destrukce ventromediálního nebo stimulace laterálního hypothalamu vedou ke zvýšení hmotnosti a vzniku morbidní obezity. Signály působící zvýšení příjmu potravy jsou anabolické, orexigenní a naopak signály působící snížení příjmu potravy jsou katabolické, anorexigenní (Hainer 2011).

Energetický metabolismus ovlivňují, kromě jiných faktorů, látky produkované v CNS, GIT a také látky produkované v tukové tkáni.

- Látky z CNS

Z neuropřenašečů se na ovlivňování sytosti a řízení příjmu potravy podílí serotonin, noradrenalin, dopamin, opioidy, endokanabinoidy a glutamát (Hainer 2011). Mezi orexigenní faktory patří například orexin A a B, neuropeptid Y, galamin a naopak mezi anorexigenní faktory řadíme neurotensin, hormon uvolňující kortikotropin a α -MSH (melanocyty-stimulující hormon) (Masopust 2006).

- Látky z GIT

V trávicí soustavě se na udržení homeostázy energetického metabolismu podílí cholecystokinin, glukagon, ghrelin, bombesin, somatostatin a amylin (Masopust 2006).

- Látky z tukové tkáně

Tuková tkáň je metabolicky aktivní orgán, který je nejen primárním místem uložení nadbytečné energie, ale slouží také jako endokrinní orgán zodpovědný za syntézu mnoha biologicky aktivních látek, které se podílejí na regulaci energetické homeostázy (Coelho et al. 2012). Buňky tukové tkáně tvoří a secernují tzv. adipokiny, jsou to hormony leptin, resistin, adiponektin, visfatin, angiotensinogen, cytokiny TNF α , IL-6 (interleukin), IL-8, enzymy aromatasu a triacylglycerolová lipasa, prostacykliny, růstové faktory a faktory komplementu (například properdin). Adipokiny spolupůsobí při regulaci chuti k jídlu, termogenezi, citlivosti tkání k insulinu, ovlivňují zánět a imunitu a mají i další funkce (Masopust 2006). Aktivita tukové tkáně není všude stejná, záleží na lokalizaci v těle.

V tukové tkáni dochází k expresi všech složek renin-angiotensin-aldosteronového systému (RAAS). Angiotensin II stimuluje syntézu prostacyklinů, diferenciaci adipocytů a lipogenezi (Coelho et al. 2012). Leptin je produktem tukové tkáně, je považovaný za prozánětlivý cytokin patřící do rodiny IL-6. Jedná se o anorexigenní peptid, který inhibuje lipogenezi, dává mozku signály o stavu tukové zásoby. Množství tukové tkáně a koncentrace leptinu v plazmě jsou závislé na množství energie uložené v tuku stejně jako na stavu energetické rovnováhy. Proto je hladina leptinu zvýšena u obézních jedinců a snížena při přejídání. Regulace příjmu potravy leptinem je zprostředkována částečně insulinem. Leptin vzrůstá v odpovědi na nízké hladiny insulinu a naopak se jeho hladina snižuje po jídle nebo jako odpověď na stimulaci vyššími hladinami insulinu. Syntéza leptinu je vyšší v podkožní než ve viscerální tukové tkáni, proto u žen můžeme zjistit vyšší koncentrace leptinu v plazmě. Resistin byl objeven v roce 2001. Produkují ho adipocyty a také velké množství imunokompetentních buněk. Uvolňování resistinu se zdá být stimulováno při zánětu, hyperglykémii, růstovými a pohlavními hormony. Má velký vliv na zvýšení lipogeneze translokací glukosového transportéru GLUT (Coelho et al. 2012).

Mezi vzácné příčiny obezity způsobené poruchou žláz s vnitřní sekrecí řadíme Cushingův syndrom, hypotyreózu, hypothalamické poruchy, hypopituitarismus, hyperprolaktinémii, hypogonadismus, hyperestrinismus nebo také pseudohypoparatyreózu (Vlček a Fialová 2010, Hainer 2011).

2.1.2.3. Zevní příčiny obezity

Některé adenovirové infekce, perzistující organické polutanty životního prostředí, nebo nepřiměřený spánek mohou přispět ke vzniku obezity. Dalšími zevními příčinami jsou také některé léky, které ovlivňují regulaci tělesné hmotnosti, nebo přímo adipogenezi v tukové tkáni (Hainer 2011). K nárůstu hmotnosti může docházet u diabetiků při léčbě léky zvyšujícími hladinu insulinu, nebo při léčbě vyššími dávkami glukokortikoidů, staršími antihistaminiky zvyšujícími chuť k jídlu, antipsychotiky typu chlorpromazinu, či po olanzapinu, při léčbě tricyklickými antidepresivy nebo lithiem (Vlček a Fialová 2010).

2.1.3. Léčba obezity

2.1.3.1. Dieta, energetický výdej a psychoterapie

Léčbu obezity je vhodné začít nízkoenergetickou dietou, zvýšením fyzické aktivity, psychoterapií vedoucí ke změně postoje k jídlu a následně pokračovat farmakoterapií léky, které snižují pocit hladu nebo omezují vstřebávání tuků. K chirurgické léčbě se přistupuje až při neúspěchu předchozích metod. Nejtěžší bývá po úspěšném snížení hmotnosti tento výsledek udržet. Je třeba pacientovi navrhnout reálné cíle, abychom se vyhnuli následnému zvýšení váhy a poté opakovanému snižování a následnému zvyšování váhy, kterému se říká „jo-jo efekt“. Při léčbě obezity musíme tedy v první řadě navodit negativní energetickou bilanci (Vlček a Fialová 2010).

V organismu se na regulaci energetické rovnováhy podílí mnoho mechanismů. Je ovlivňována mechanickými signály ze zažívacího traktu, nutričními signály příjmu základních živin, termogenními signály a neurohumorálními signály z hypothalamu. Uplatňuje se také role sympatického nervového systému, který má vliv na energetický výdej, spontánní pohybovou aktivitu a postprandiální termogenezi. Vztah mezi sníženou aktivitou sympatiku a nárůstem hmotnosti byl potvrzen klinickými studiemi. Je prokázána souvislost mezi sníženou exkrecí noradrenalinu a vzestupem hmotnosti a vztah mezi nízkou exkrecí adrenalinu a vznikem centrální obezity. Se zvýšeným energetickým příjmem stoupá aktivita sympatiku a tím se snižuje pravděpodobnost dalšího nárůstu hmotnosti. Ze živin aktivují sympatikus například sacharidy (Hainer et al. 2011).

Při zahajování **redukční diety** je potřeba se nejprve podívat na dosavadní stravovací návyky pacienta, který si vede deníček se záznamy druhu a množství snědené potravy. Dietní sestra s ním tyto zápisy zhodnotí a pacientovi je sestaven plán na míru. Základem je vždy snížení procenta tuku, omezení nasycených trans-mastných kyselin, zvýšení nenasycených mastných kyselin, omezení jednoduchých cukrů a naopak zvýšení podílu komplexních cukrů, zeleniny a částečně také ovoce (Vlček a Fialová 2010).

Energetický příjem ovlivňuje zastoupení živin a popřípadě i alkoholu v příjmu potravy. Kromě socioekonomických a kulturních faktorů je energetický příjem ovlivněn také geneticky, protože je známo, že preference potravin je hereditárně ovlivněna. Na zvýšeném energetickém příjmu se podílí hlavně zvýšená konzumace tuků, které mají malou sytící schopnost a je potřeba jich tak sníst více než bílkovin nebo cukrů a také je po požití tuků nejnižší hodnota postprandiální termogeneze. Naopak bílkoviny mají nejvyšší sytící schopnost a zároveň i nejvíce zvyšují postprandiální termogenezi. Velmi důležitý je ve stravě příjem vlákniny, hlavně ze zeleniny a ovoce. Vláknina díky své bobtnavosti navozuje dilataci horních částí GIT a tím pocit sytosti (Hainer et al. 2011).

Celkový **energetický výdej** se skládá z klidového energetického výdeje (55-70%, zajištění základních funkcí organismu a udržování tělesné teploty), postprandiální termogeneze (8-12%, trávení, vstřebávání a metabolismus živin po požití potravy, aktivace sympatiku po jídle) a z energetického výdeje při pohybové aktivitě (20-40%). Přestože v poslední době klesá spotřeba tuků, prevalence obezity se zvyšuje a to právě díky snižující se pohybové aktivitě. Lidé zanechávají sportovní aktivity, buď z nedostatku času, nebo se tak děje po úrazech, při onemocnění pohybového aparátu, v období těhotenství nebo menopauzy (Hainer et al. 2011).

Pohybovou aktivitu volíme podle schopností a stavu pacienta. Důležitá je dostatečná intenzita i trvání, což je minimálně 45 minut 3-4x týdně na úrovni 50-70 % maximální aerobní kapacity. Maximální aerobní kapacita se určuje pomocí maximálního pulzu, který se vypočítá jako 220 mínus věk. U každého pacienta se začíná opět zapisováním a následným rozbořením jeho pohybové aktivity za posledních několik dnů. Je prokázáno, že lidé svou pohybovou aktivitu nadhodnocují až o 50 % a naopak příjem potravy asi o třetinu snižují. Používá se i měření ušlé vzdálenosti pomocí přístroje zvaného pedometr (Vlček a Fialová 2010).

Z **psychologických metod** se u obezity používá nejčastěji tzv. kognitivně-behaviorální terapie. Jedná se o techniky, kterými se snažíme identifikovat a změnit nevhodné stravovací a pohybové návyky a myšlení a naučit pacienta vhodněji řešit problémy (například stres řešit pohybovou aktivitou, nikoliv jídlem). Důležité je i připravit pacienta na možné selhávání terapie a diskutovat s ním problémy s dodržováním režimu. Pacient potřebuje podporu okolí a vhodná je i skupinová terapie (Vlček a Fialová 2010).

2.1.3.2. Farmakoterapie

Cílem léčby obezity je zlepšit nebo předcházet komplikacím metabolických nemocí, nejde primárně pouze o snížení váhy. Nejprve se použijí nefarmakologické metody popsané dříve, teprve pokud jsou 3-6 měsíců bez úspěchu, přistoupí se k farmakoterapii. Farmakoterapie je indikována u pacientů s BMI nad 25, nebo nad 23 s přidruženými komorbiditami jako hypertenze, dyslipidemie, diabetes mellitus nebo syndrom spánkové apnoe (Joo a Lee 2014).

Když pomineme překážky, které souvisí s registrací léčiva, farmaceutický trh s antiobezitiky není tak finančně zajímavý, jak je možné předpokládat. Prodej léčiv není tak velký díky nízké spotřebě a krátké době užívání přípravku pacientem. V USA je zájem o léčbu obezity vysoký, ale skutečné pokrytí léčby malé (Manning et al. 2014). Celá řada léčiv byla stažena z trhu kvůli nežádoucím účinkům a také není k dispozici mnoho léčiv, která by se dala užívat dlouhodobě (Joo a Lee 2014).

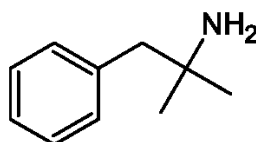
Antiobezitika lze rozdělit do několika skupin. Jedná se o látky tlumící chuť k jídlu, látky snižující vstřebávání z trávicího traktu, termogenní farmaka, kombinované přípravky a některá léčiva používaná v léčbě diabetu mellitu.

Látky tlumící chuť k jídlu (anorektika)

Skupina látek účinkujících primárně na neurotransmitery centrálního nervového systému vyvolává snížení příjmu potravy. Do této skupiny léčiv řadíme léčiva noradrenergní, serotoninergní, serotoninergní + adrenergní, léčiva účinkující na kanabinoidní receptory a některé peptidy snižující chuť k jídlu nebo vyvolávající pocit nasycení (Li a Cheung 2009).

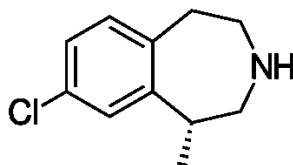
Noradrenergní léčiva inhibují reuptake noradrenalinu v synapsi a tím dochází ke zvýšení adrenergní stimulace. Patří sem fenmetrazin a fentermin. Agonisté serotoninového receptoru typu 2B jsou dříve používané látky fenfluramin a dexfenfluramin. Agonistou serotoninového receptoru typu 2C je lorcaserin (Joo a Lee 2014). Mezi léčiva serotoninergní a zároveň adrenergní patří sibutramin, který snižuje chuť k jídlu, zvyšuje pocit nasycení a zvyšuje termogenezi inhibicí serotoninergního a adrenergního reuptake (Li a Cheung 2009). Sibutramin již není obchodován z důvodu zvýšení mortality u některých skupin pacientů (Svačina 2015). Na kanabinoidní receptory typu 1 (CB₁) účinkuje léčivo rimonabant doporučené ke schválení Evropskou lékovou agenturou (EMA) v dubnu 2006, ale v zápětí opět nedoporučené z důvodu nežádoucích účinků na psychiku pacienta (Li a Cheung 2009).

Fentermin (Obr. 1) byl schválený v USA pro krátkodobé použití na snížení váhy již v roce 1959 (Bray a Ryan 2014). V ČR je na trhu dostupný na lékařský předpis pod názvem přípravku ADIPEX RETARD. Inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu a částečně také serotoninu a dopaminu. V současné době je jediným antiobezitkem ze skupiny léčiv snižujících chuť k jídlu. Podobný účinek má také antiepileptikum topiramát a antidepressivum bupropion, ale nikdy tyto látky nezískaly v monoterapii indikaci antiobezitika (Svačina 2015). Podle meta-analýzy pacienti léčení fenterminem v denní dávce 15-30 mg zhubli průměrně 3,6 kg za 6 měsíců v porovnání s placebem (Joo a Lee 2014). Sympatomimetické léčivo může způsobit centrální excitaci, manifestovanou většinou jako nespavost nebo nervozitu. Tento nežádoucí účinek se vyskytuje většinou pouze v počátku užívání. Běžně se také setkáme s pocitem suchosti v ústech. Fentermin by neměl být předepisován pacientům s kardiovaskulárním onemocněním v anamnéze, protože může zvýšit srdeční činnost a krevní tlak (Bray a Ryan 2014). Podávání fenterminu by mělo být krátkodobé, protože dlouhodobě může způsobovat toleranci, lékovou závislost a při vysazení potom abstinenční příznaky. Ve většině zemí EU byl stažen z trhu (Vlček a Fialová 2010).



Obr. 1. Strukturální vzorec fenterminu.

Zatímco fenfluramin a dexfenfluramin byly staženy z trhu pro své nežádoucí účinky na srdeční chlopně, **lorcaserin** (Obr. 2) se osvědčil (Bray a Ryan 2014). Jedná se o léčivo vázané na lékařský předpis. V Americe byl Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválen v roce 2012 a zdá se, že je dobře snášen bez vedlejších účinků. V ČR zatím není k dispozici. Aktivací serotoninových receptorů typu 2C v hypothalamu zvyšuje produkci proopiomelanokortinu, navozuje se pocit sytosti a nakonec dochází k postupnému snížení hmotnosti. Téměř polovina pacientů zhubne o více než 10 % během prvního roku sledování. Několikaleté studie ukázaly, že nehrozí žádné riziko vzniku komplikací. V případě příbuzného dexfenfluraminu šlo o neselektivní přípravek, který ovlivňoval jak receptory 5-HT_{2C}, tak 5-HT_{2B}, přičemž receptory 5-HT_{2B} se nacházejí kromě CNS také v endokardu chlopní a ve stěně plicnice. Lorcaserin je selektivní agonista serotoninových receptorů 5-HT_{2C}, které se nacházejí téměř výhradně v mozku (Svačina 2015). Většinou se užívá 2x denně 10 mg a jeho účinky na snížení váhy v porovnání s placebem se prokázaly v několika studiích (Joo a Lee 2014). Je dobře snášen a má jen málo nežádoucích účinků. Neměl by být používán společně s inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) a s inhibitory monoaminoxidasy kvůli nebezpečí vzniku serotoninového syndromu (Bray a Ryan 2014).



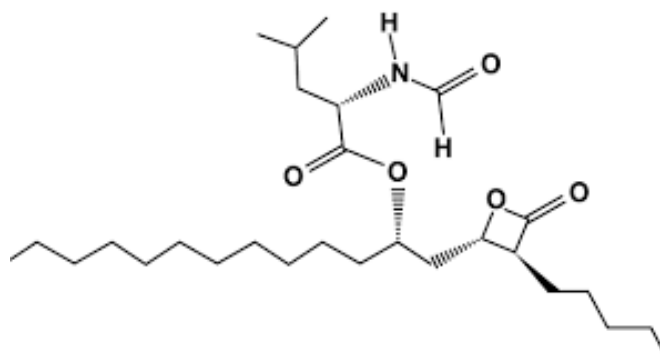
Obr. 2. Strukturní vzorec lorcaserinu.

Látky snižující vstřebávání v GIT

Ve vývoji jsou látky, které snižují vstřebávání energeticky bohatých látek ze střeva, například blokadí mikrosomálních bílkovin přenášejících TAG do lipoproteinů na kapilární straně střevní stěny. V současné době je však hlavním a skutečně používaným zástupcem inhibitor gastrointestinálních lipas (Svačina 2015).

Tetrahydrolipstatin, neboli **orlistat** (Obr. 3), je silný a selektivní inhibitor pankreatické lipasy, která ve střevě štěpí TAG. FDA je schválený pro dlouhodobé použití v léčbě obezity (Bray a Ryan 2014). Mechanismem účinku je aktivní vazba na serinový zbytek střevní lipasy, kdy dochází k blokadě její kapacity a snížení vstřebávání tuků asi o 30 % (Svačina 2015, Vlček a Fialová 2010). Na trhu v ČR je dostupné balení s 60 mg

v jedné tobolce (volně prodejně) nebo se 120 mg (na lékařský předpis) (Bray a Ryan 2014). Kontraindikací jsou těžké poruchy GIT s malabsorpcí. Mezi nežádoucí účinky patří průjemy a bolesti břicha, které většinou odeznívají po několika týdnech (Svačina 2015). Snížením vstřebávání tuků může dojít i ke snížení vstřebávání vitaminů rozpustných v tucích, tedy vitaminu A, D, E a K, čemuž lze předejít užíváním těchto vitaminů před spaním (Joo a Lee 2014). Kapsle se podávají 3x denně s hlavním jídlem po dobu minimálně 2 až 3 měsíců. Pokud pacient reaguje dobře, pokračuje se v dlouhodobé léčbě několik měsíců až let. Ve studiích byla prokázána nejen schopnost orlistatu snižovat tělesnou hmotnost, ale i snížení poměru hodnot LDL/HDL cholesterolu, zlepšení kompenzace diabetu a poklesu insulinémie, snížení dávek antidiabetik včetně insulinu a zmírnění hypertenze. Vysoká bezpečnost orlistatu je dána tím, že se nevstřebává. Bylo prokázáno, že poloviční dávka orlistatu (60 mg) ve volně prodejných přípravcích působí 85 % účinku plné dávky (Svačina 2015).

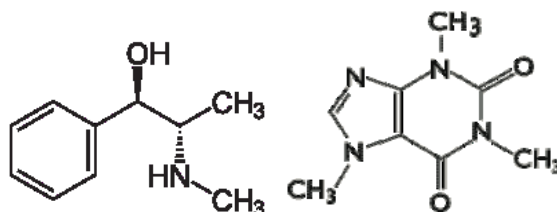


Obr. 3. Strukturní vzorec orlistatu.

Termogenní farmaka

Do této skupiny patří efedrin a kofein (Obr. 4.). Ve velké studii kontrolované placebem se prokázalo, že užívání kombinace těchto látek má větší efekt na snížení hmotnosti než užívání každé látky samostatně. Zatím však FDA tato termogenní léčiva pro užívání za účelem snížení hmotnosti neschválila. Jsou obsažené v některých potravních doplňcích podporujících hubnutí (Li a Cheung 2009). V ČR občas někteří (zejména starší) lékaři předepisují tzv. **Elsinorské prášky**, což jsou individuálně vyráběné léčivé přípravky, které obsahují 20 mg efedrinu a 50 až 200 mg kofeinu. Zvyšují energetický výdej a potlačují chuť k jídlu centrálním noradrenergickým účinkem. Užívají se půl hodiny před snídaní a před obědem, po dobu maximálně 3 měsíců.

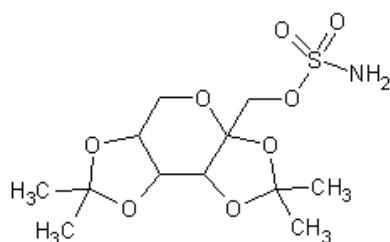
Kontraindikovány jsou při srdečních nebo psychických onemocněních (Vlček a Fialová 2010).



Obr. 4. Strukturní vzorec efedrinu (vlevo) a kofeinu (vpravo).

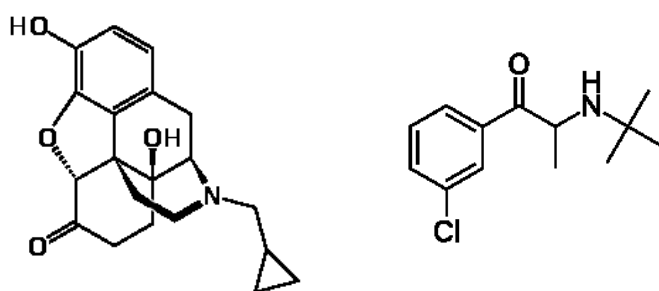
Kombinované přípravky

Kombinací dvou látek se synergistickým účinkem díky kterému můžeme snížit množství každé účinné látky a tak i nežádoucí účinky, je kombinace **fentermin/topiramát**. Použití fenterminu a topiramátu (Obr. 5.) s prodlouženým účinkem je v USA možné od roku 2012. Léčivo je vyráběno tak, že nejvyšší dávka fenterminu je ráno a naopak topiramát má pík večer, díky modifikovanému uvolňování (Manning et al. 2014). Fentermin je sympatomimetická látka vhodná samostatně pro krátkodobé použití jako anorektikum a topiramát je antiepileptikum. Mechanismus účinku topiramátu na redukci váhy se nepodařilo zatím zcela jasně vysvětlit, ale může souviset s účinkem této látky na GABA receptory. Díky kombinaci s topiramátem je potřebná dávka fenterminu pouze 3,75 mg v počáteční dávce namísto 15 mg při samostatném užívání, čímž se snižují některé nežádoucí účinky (Joo a Lee 2014). Ve dvouleté studii pacienti užívající doporučenou dávku 7,5 mg/46 mg dosáhli na konci studie snížení váhy o 9,3 %. Redukce váhy byla doprovázena také zlepšením mnoha rizikových faktorů souvisejících s obezitou, například krevního tlaku, glykémie, hladin HDL cholesterolu a TAG (Bray a Ryan 2014). Nežádoucí účinky jsou u fenterminu například suchost v ústech, zácpa, nespavost a palpitace a u topiramátu závratě, parestézie, poruchy pozornosti a metabolická acidóza. V Evropské unii EMEA vyžaduje doložení výsledků studií zaměřených na rizika, hlavně kardiovaskulární, při dlouhodobém užívání před tím, než bude možné léčivo schválit (Manning et al. 2014).



Obr. 5. Strukturní vzorec topiramátu.

V roce 2015 byla v EU schválena fixní kombinace **naltrexon/bupropion** pod názvem MYSIMBA 8 mg/90 mg s prolongovaným účinkem. Léčba je určena pro pacienty s BMI nad 30, nebo nad 27 s přidruženými komorbiditami (Svačina 2015). Naltrexon (Obr. 6. vlevo) je antagonist opioidních receptorů, který má sám o sobě jen malý účinek na redukci váhy. Bupropion (Obr. 6. vpravo) snižuje příjem potravy působením na adrenergní a dopaminergní receptory v hypothalamu. Důvodem kombinování těchto dvou látek je, že naltrexon může blokovat inhibiční vlivy opioidních receptorů aktivovaných β -endorfiny, které jsou uvolňovány v hypothalamu a stimulují chuť k jídlu, a zároveň umožňuje aktivaci α -MSH, který snižuje příjem potravy (Bray a Ryan 2014). Dávkování přípravku začíná na 1x denně 1 tableta a zvyšuje se až na 2x denně 2 tablety. Přípravek je kontraindikován při jaterním a renálním selhání (Svačina 2015).



Obr. 6. Strukturní vzorec naltrexonu (vlevo) a bupropionu (vpravo).

Látky používané v léčbě diabetu

Do této skupiny řadíme inkretinová analoga a glifloziny.

Inkretiny jsou hormony vznikající ve střevě a ovlivňující β -buňky slinivky, ale i další tkáň (Svačina 2015). Mezi inkretiny patří glukagonu-podobný peptid 1 (GLP-1). Jeho účinek je komplexní, snižuje glykémii s minimálním rizikem hypoglykémie. Kromě

zvýšení tvorby a sekrece insulinu potlačuje sekreci glukagonu, a proto snižuje výdej glukosy hepatocyty. V CNS navíc vyvolává pocit sytosti a v GIT zpomaluje vyprazdňování žaludku. Samotný GLP-1 nelze terapeuticky použít, protože má v organismu poločas pouze v řádu minut, a proto se používají jeho analoga, která jsou odolná vůči štěpení hormonem dipeptidyl-peptidasou 4 (DPP-4) a mají delší poločas (Vlček a Fialová 2010). Inkretinová analoga se podávají injekčně při léčbě diabetu mellitu. **Liraglutid** je dlouhodobě působící agonista receptoru R1 pro GLP-1 a je pacienty velmi dobře snášen (Manning et al. 2014). Liraglutid, v ČR pod názvem VICTOZA, stačí podávat 1x denně, **exenatid**, v ČR pod názvem BYETTA, se podává 2x denně. Depotní forma exenatidu, BYDEURON, se podává jednou týdně. Tyto léky nemají riziko vyvolání hypoglykemie a pacienti po nich hubnou. Exenatid i liraglutid byly testovány u obézních pacientů nediabetiků a jsou velmi účinné, ale pojišťovny v ČR zatím tuto léčbu nehradí. V Evropské unii byl nedávno liraglutid schválen pod názvem SAXENDA i pro užití u nediabetiků s BMI nad 30 nebo nad 27 s přidruženou alespoň jednou komorbiditou. Po 3 měsících by se léčba měla vyhodnotit, a pokud váha neklesne alespoň o 5 %, dále se v ní nepokračuje (Svačina 2015).

Glifloziny jsou inhibitory Na^+ -glukosových kotransportérů, čímž blokují zpětnou absorpci glukosy v ledvinách. Patří mezi ně dapagliflozin, canagliflozin a empagliflozin. Kromě poklesu glykémie a hodnot glykovaného hemoglobinu, také snižují krevní tlak a hmotnost a mají komplexní metabolické účinky. Dochází k snížení hmotnosti, zvýšení insulinové senzitivity, zvýšení sekrece GLP-1 a glukagonu a také ke zvýšené utilizaci tuku a vyšší sekreci mastných kyselin. Tuk je spalován na úkor cukru. Při podávání gliflozinů dochází ke ztrátě asi 70 g glukosy denně i při glykémii pod hranicí diabetu a proto se zdá být nadějně využití i u nediabetiků. Nedávno byla publikována studie prokazující výrazné snížení celkové a kardiovaskulární mortality po podání empagliflozinu. Zatím se v indikaci obezity nepoužívají (Svačina 2015).

Nakonec jsou uvedeny některé nadějně přípravky, které se v současné době nacházejí v různých fázích klinického hodnocení či procházejí schvalováním. Jedná se například o tesofensin (inhibitor zpětného vychytávání noradrenalinu, serotoninu a dopaminu, příbuzný lorcaserinu), cetilistat (podobný orlistatu, ale má méně nežádoucích účinků na GIT), kombinace bupropion/zonisamid (bupropion s antiepileptikem), pramlintid/leptin (pankreatický peptid z β -buněk, analog amylinu,

a centrálně působící adipokin), agonistu melanokortinového receptoru typu 4, beloranib (snižuje oxidaci tuků), syntetickou formu peptidu YY (redukuje chuť k jídlu působením na Y2 receptory v *nucleus arcuate hypothalami*), látky k ovlivnění střevní mikroflóry nebo o biologickou léčbu protilátkami (Svačina 2015, Manning et al. 2015, Li a Cheung 2009).

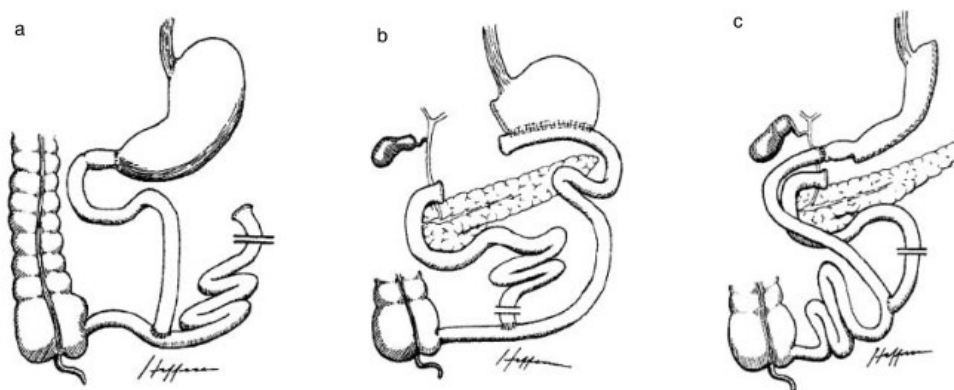
2.1.3.2. Chirurgická léčba obezity

Mezi nefarmakologické metody léčby obezity patří také chirurgická léčba. Jedná se o tzv. chirurgické bariatrické zákroky (z řeckého slova *baros* - těžký, objemný a *iateria* – léčení, tzn. chirurgická léčba těžkých, objemných pacientů). Tyto metody se zdají být v současné době nejúčinnějším a dlouhodobě nejefektivnějším způsobem léčby pacientů s nejtěžším stupněm obezity, nebo pacientů se 2. stupněm obezity a přidruženými komplikacemi (Hainer 2011, Vlček a Fialová 2010, Fobi 2004). Chirurgická léčba bývá dlouhodobě úspěšná u 80 % pacientů, což kontrastuje s naopak 80% neúspěšností konzervativních metod léčby u těžce obézních (Hainer 2011).

Bariatrické zákroky lze rozdělit na malabsorpční, restriční a kombinované.

Malabsorpční bariatrie

Malabsorpční zákroky způsobují snížení absorpce živin zkrácením funkční délky tenkého střeva. Jednou z úplně prvních operací bariatrické chirurgie byl jejuno-ileální bypass (Fobi 2004, obr. 7. a). Tyto operace se až na výjimky v současnosti neprovádějí, protože docházelo, v důsledku snížení vstřebávání, k těžkým rozvratům vnitřního prostředí (Vlček a Fialová 2010).

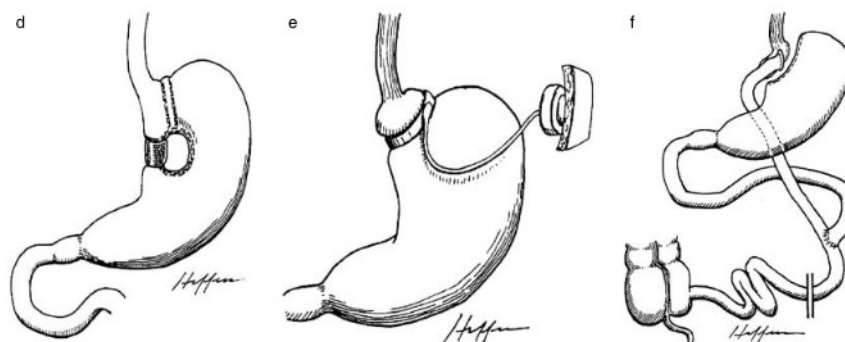


Obr. 7. Malabsorpční bariatrické operace. Jejuno-ileální bypass (a), bilio-pankreatická diverze (b) a biliopancreatická diverze se zachováním duodenální pasáže (c). Zdroj: Bult et al. 2008.

Dále sem řadíme biliopankreatickou diverzi (Obr. 7. b) a biliopankreatickou diverzi s duodenálním switchem (Obr. 7. c). U obou operací je provedeno odnětí části žaludku tak, že vznikne asi jen 100-150 ml žaludeční vak (Bult et al. 2008). Odstraněním asi 70 % žaludku se sníží tvorba žaludeční kyseliny a omezí se možnost jezení velkého množství jídla najednou. Zároveň se při operaci přeruší tenké střevo, jeden jeho konec se spojí se zmenšeným žaludkem a druhý se spojí asi 100 cm před koncem tenkého střeva s tzv. biliopankreatickou kličkou přivádějící žlučové kyseliny a pankreatické enzymy. Vznikne tak exkludovaná (alimentární) klička, kde nedochází k trávení potravy. Trávení tedy probíhá v konečných asi 100 cm tenkého střeva. U metody s duodenálním switchem se část žaludku ponechá napojená na duodenum, čímž se na rozdíl od klasické biliopankreatické diverze zachová duodenální pasáž (Hainer 2011). Tyto 2 druhy zákroků je možné provádět také laparoskopicky (Fobi 2004).

Restrikční bariatrie

Principem restrikční bariatrie je redukce kapacity žaludku vedoucí dříve k pocitu přesycení a tím k poklesu příjmu potravy. Tyto zákroky jsou jednodušší a mají méně komplikací než malabsorpční operace (Bult et al. 2008). Mezi metody restrikční bariatrie patří vertikální gastroplastika (Obr. 8. d), adjustabilní bandáž žaludku (Obr.XY. e), tubulizace žaludku a plikace žaludku.



Obr. 8. Restrikční a kombinované bariatrické operace. Vertikální gastroplastika (d), adjustabilní Švédská bandáž žaludku (e) a gastrický bypass Roux-en-Y (f). Zdroj: Bult et al. 2008.

Vertikální plastické operace žaludku tvořily v 90. letech minulého století asi 90 % všech bariatrických operací žaludku v USA. V současné době se gastroplastiky provádí maximálně u 10 % pacientů s indikací k bariatrii žaludku a většinou se jedná o laparoskopický zákrok (Fobi 2004). Za použití speciálního spojovacího zařízení je fundus žaludku (nejširší horní úsek) sešit s menším zakřivením a distální část vytvořeného vaku je zúžena pomocí kruhu (Bult et al. 2008). Ke snížení váhy dojde díky zmenšení kapacity žaludku. Gastroplastika by mohla být efektivní a trvalá, ale vyžaduje compliance pacienta a změnu životního stylu. V případě, že bude přijímat vysokokalorické tekutiny, nedostaví se očekávaný výsledek. Tyto operace jsou jednoduché na provedení, méně invazivní, nepřesměrovávají trávicí trakt jinak než je fyziologické, nedochází při nich k malabsorpci a jsou snadno vratné. Mezi nežádoucí účinky patří nejčastěji zvracení, dále obstrukce a jiné méně časté nežádoucí účinky (Fobi 2004).

Švédská adjustabilní bandáž žaludku (poprvé realizována v roce 1986 ve Švédsku) je k žaludeční stěně maximálně šetrná. Jde o speciální balonek z měkkého materiálu, spojovací hadičku a podkožně uloženou komůrku. Vstřikováním nebo odsáváním kapaliny do balonku dochází k regulaci naplně balonku a tím i možného průchodu sousta do žaludku. Pro dosažení adekvátních výsledků léčby je doporučeno se vyvarovat některým potravinám, které by se mohly v žaludku zaklínit a způsobit ucpání spojovacího kanálku projevující se nejčastěji opakovaným zvracením a následnou ztrátou tekutin. Pacient se pak musí dostavit na endoskopii k odstranění zaklíněného sousta. Po adjustabilní bandáži je důležité, aby pacient každé sousto pomalu a důkladně rozžvýkal

a také aby dodržoval dietní a režimová opatření vedoucí k co nejlepším výsledkům (Hainer 2011).

Tubulizace a plikace žaludku patří k nejnovějším metodám. Existují metody mírně se lišící v provedení, ale asi 80 % tubulizací žaludku se provádí laparoskopicky tak, že se odřízne větší zakřivení žaludku a zůstane tak jen úzký pruh (20 - 25 % původní velikosti). Kapacita žaludku se zmenší na 60 – 100 ml, což pacientovi umožní příjem pouze malého množství jídla a dříve mu navodí pocit sytosti. Poslední dobou se uvažuje nad tím, že za úspěchem této metody je snížení hladiny ghrelinu v plasmě. Ghrelin, peptidový hormon považovaný v současné době za regulátor hladu, je produkován hlavně buňkami nacházejícími se ve fundu žaludku, který se při této operaci odstraní (Karmali et al. 2013). Při zákroku zvaném plikace žaludku dojde také ke zmenšení žaludku v oblasti velkého zakřivení, nicméně tentokrát se žádná tkáň neodstraňuje, ale velká část žaludku je srolována dovnitř a sešita. Výhodou použití této metody je minimální invazivita (nic se neodstraňuje, neřeže), reverzibilita a poměrně nízké náklady. Stejně jako u tubulizace se při plikaci žaludku snižuje hladina ghrelinu (Brethauer et al. 2015).

Kombinovaná bariatrie

V roce 2008 patřil v USA mezi nejčastější metody bariatrické chirurgie gastrický bypass Roux-en-Y (Obr. 8. f). Jedná se o kombinaci restriktivní a malabsorpční metody. Dojde k vytvoření žaludečního vaku, který se oddělí od zbytku žaludku. Plynulost trávení je poté obnovena Roux-Y ohybem, který je napojen na jejunum. Během jídla se žaludeční vak rychle naplní a vytvoří pocit sytosti, jídlo pokračuje do jejunu přes Roux-Y ohyb, díky čemuž je zajištěné snížené vstřebávání (Bult et al. 2008).

V současné době se pracuje na vývoji metod, které by byly ještě šetrnější než laparoskopie, tzv. metody N.O.T.E.S. (natural orifice transluminal endoscopic surgery). V České republice funguje od roku 2009 sekce N.O.T.E.S. při České chirurgické společnosti JEP. Nástroje se zavádějí přirozenými otvory lidského těla do lumina orgánů (žaludek, střevo) a operace, např. zmenšení žaludku, se provádí zevnitř.

Po všech bariatrických operacích je kladen velký důraz na pravidelné a dlouhodobé pooperační sledování pacientů. Pacient musí být také vybaven písemnou informací o provedeném výkonu a přesném typu implantátu při gastrické bandáži, která

obsahuje i popis možných vedlejších projevů. Je potřeba kontrolovat i hladiny vitaminů a minerálů.

Závěrem lze shrnout, že k chirurgickým metodám se přistupuje až v případě vyšších stupňů obezity a po neúspěšném pokusu o léčbu konzervativní. Cílem bariatrie není kosmetický zákrok, ale léčba život ohrožující obezity a k ní přidružených nemocí, prodloužení délky života obézního pacienta a také pokus o jeho návrat do společenských aktivit. Nejlepších výsledků je dosaženo, pokud pacient takovou léčbu podstoupí ve specializovaných centrech, je dlouhodobě sledován a sám aktivně dodržuje dietní a režimová opatření (Hainer 2008).

2.1.4. Komplikace obezity

Obezita je spojena s častějším výskytem řady závažných onemocnění. U některých nemocí představuje zmnožení tukové tkáně stěžejní patogenetický moment. Tuková tkáň je jednak zdrojem hormonů a prozánětlivých cytokinů a také představuje pro tělo mechanickou zátěž (Hainer 2011). Mnoho velkých studií potvrdilo zvýšení mortality při zvýšení BMI nad určitou hranici. Nezáleží však pouze na celkovém množství tuku, ale také na jeho rozložení v těle. Například nadbytek viscerálního tuku u obezity centrálního typu je více spojován s kardiovaskulárními nemocemi, než pokud se tuk nachází podkožně v oblasti boků a hýždí (Segula 2014).

2.1.4.1. Metabolické komplikace

Obezita je metabolické onemocnění a může tak ovlivňovat celou řadu metabolických procesů. Například může vést k poruchám v metabolismu cukrů, lipidů nebo k poruchám v metabolismu kyseliny močové (Hainer 2011).

U diabetu mellitu 2. typu je již prokázané silné propojení mezi obezitou a výskytem tohoto onemocnění u obou pohlaví a všech etnických skupin (Malnick a Knobler 2006). Nejprve dojde ke vzniku insulinové rezistence a poté k rozvoji diabetu. Spojení obezity a diabetu 2. typu se potvrdilo v několika velkých studiích (Segula 2014). Tuková tkáň je v porovnání se svalovou k působení insulinu odolná. Obezita i insulinová rezistence jsou považovány za zásadní přispěvatele ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění, protože obezita je jednou z příčin vzniku insulinové rezistence (Cossrow a Falkner 2004).

U obézních jedinců se setkáváme s výskytem dyslipidemie, charakterizované jako snížení HDL a zvýšení triacylglycerolů, pravděpodobně hlavně díky insulinové resistenci (Segula 2014). Hypercholesterolémie a hypertriacylglycerolemie se výrazně zlepšují po chirurgické léčbě (Bult et al. 2008).

2.1.4.2 Kardiovaskulární komplikace

Dostupná data ukazují na silné propojení mezi obezitou a vysokým krevním tlakem. Přibýváním na váze se zvyšuje riziko vzniku hypertenze (Segula 2014). Ztráta váhy u obézních pacientů je spojena s poklesem krevního tlaku. Dále je u obézních vyšší riziko vzniku ischemické choroby srdeční, srdečního selhání a fibrilací síní. Riziko srdečního selhání je 2x vyšší u obézních než u pacientů s normálním BMI (Malnick a Knobler 2006). Dalšími kardiovaskulárními komplikacemi mohou být hypertrofie a dilatace levé komory, cévní mozková příhoda, varixy a tromboembolická nemoc (Hainer 2011).

2.1.4.3. Endokrinní poruchy

V důsledku zvýšené aromatizace androgenů v estrogeny v tukové tkáni dochází ke vzniku hyperestrogenismu. U žen může vznikat hyperandrogenismus, u mužů s těžkou obezitou hypogonadismus. Sekrece růstového hormonu se snižuje a kortizolu zase zvyšuje (Hainer 2011).

2.1.4.4. Respirační komplikace

Několik studií spojuje obezitu se syndromem obstrukční spánkové apnoe. Dochází k tomu pravděpodobně díky tomu, že zmnožená tuková tkáň podél dýchacích cest zasahuje do lumina a také díky zvýšení kolapsibility dýchacích cest (Segula 2014). U pacientů s nadváhou nebo obezitou je zvýšená prevalence astmatu (Malnick a Knobler 2006). Může docházet k hypoventilaci a restrikcí (tzv. Pickwickův syndrom) (Hainer 2011).

2.1.4.5. Gastrointestinální komplikace

Gastroesofageální reflux je běžná porucha vyskytující se u obézních. Obezita je spojena s cholelithiásou a jaterní steatózou (Malnick a Knobler 2006). Dále se může častěji vyskytovat hiátová hernie, cholecystitida a pankreatitida (Hainer 2011).

2.1.4.6. Ortopedické komplikace

Díky neúměrné zátěži na kloubní systém se dříve objevují některá degenerativní onemocnění. Jedná se především o artrózu kyčelního nebo kolenního kloubu (Hainer 2011). Zdá se, že osteoartróza (OA) doprovází obezitu. OA nosných kloubů je u starších lidí běžná a její prevalence je přes 50 % u pacientů starších 65 let obou pohlaví. Objevuje se stále více důkazů, že dysregulace adipokinů z tukové tkáně (adiponektin, visfatin, resistin) by mohla vysvětlovat spojení mezi OA a obezitou, což naznačuje, že OA může být systémové onemocnění obezity (Segula 2014).

2.1.4.7. Gynekologické komplikace

U obézních žen se častěji setkáme s poruchami cyklu, amenoreou, poklesem dělohy a problémy s plodností. Pokud je žena těhotná, má více komplikací v těhotenství a při porodu (Hainer 2011). Negativní dopad vidíme při vzniku fetálních malformací, například jsou častější defekty neurální trubice. Také jsou děti obézních budoucích matek více ohroženy úmrtím v děloze, traumatem hlavičky, dystokií ramen, zlomením klíční kosti, tísní plodu a zvýšeným rizikem smrti novorozence do 1 roku (Kopelman et al. 2010).

2.1.4.8. Onkologické komplikace

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny pod WHO odhaduje, že nadváha se podílí na vzniku čtvrtiny až třetiny všech rakovin prsu, tlustého střeva, endometria, ledvin a jícnu (Malnick a Knobler 2006). Některé nádory GIT se častěji vyskytují u obézních jedinců. Častější je kolorektální karcinom (hlavně u mužů), karcinom žlučníku, rakovina žlučových cest, adenokarcinom jícnu, pankreatu a jater. Faktorem ovlivňujícím karcinogenezi může být také zvýšená syntéza estrogenů, která hraje úlohu v patogenezi karcinomu endometria a prsu. Vyšší je i výskyt karcinomu ledvin a prostaty (Hainer 2011). Obezita má také nepříznivý vliv na diagnózu a na odpověď na terapii. Běžné dávky chemoterapie mohou být pro obézní jedince škodlivé (Malnick a Knobler 2006).

2.1.4.9. Kožní komplikace

Setkáváme se s výskytem ekzémů a mykóz, dochází k odírání kůže a k většímu pocení. V důsledku roztahování kůže se poruší elastinová vlákna v hlubších vrstvách a vznikají strie. Ke kožním komplikacím můžeme také zařadit celulitidu, hypertrichózu, hirsutismus, nebo vznik benigních malých nádorů kůže (Hainer 2011).

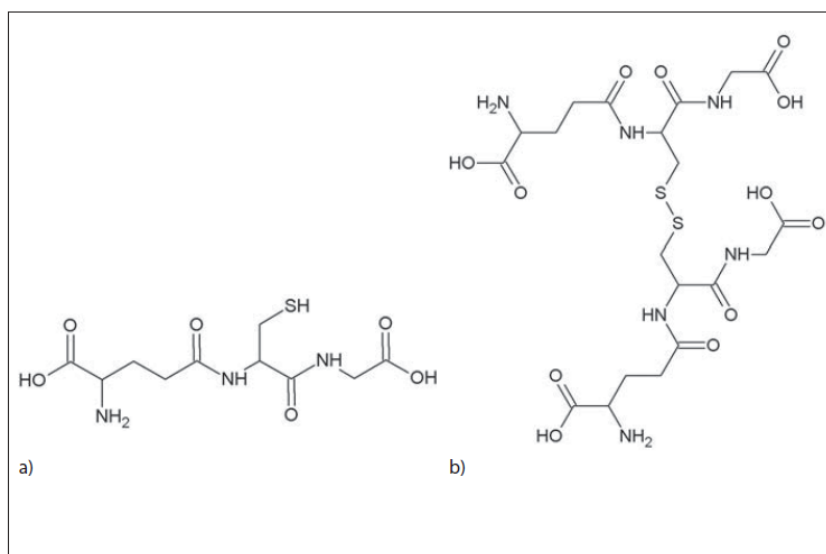
2.1.4.10. Psychosociální komplikace

V minulosti byla obezita symbolem bohatství a toho, že se člověk má dobře. V dnešní době toto stále platí v některých částech Afriky, nicméně ve vyspělých zemích je naopak obezita brána jako negativní stigma. Muž s obezitou se méně pravděpodobně ožení, žena vdá, mají nižší příjmy a vyšší náklady na domácnost (Malnick a Knobler 2006). U obézních žen bylo například zjištěno, že je méně pravděpodobné, že dostudují školu a mají o 20 % nižší šanci, že se vdají. Ve studii, která sledovala pacienty před bariatrickým zákrokem, se ukázalo, že byla vyšší prevalence somatizace, fobií, hypochondrie a obsesivně-kompulzivních poruch. Po bariatrickém zákroku se výskyt těchto psychopatologií snížil (Segula 2014). Obézní jsou v dnešní společnosti častěji diskriminováni, mají menší sebevědomí, trpí poruchami motivace, depresí a úzkostí (Hainer 2011).

2.2. Enzymový systém s glutathionem

Glutathion (GSH) je jedním z nejdůležitějších hydrofilních intracelulárních nebílkovinných antioxidantů. Jedná se o tripeptid složený z kyseliny L-glutamové, L-cysteinu a L-glycinu (Nýdlová et al. 2014). Tato nízkomolekulární thiolová sloučenina se vyskytuje ve vyšších koncentracích ve tkáních, které jsou náchylné k oxidačnímu stresu, například v červených krvinkách, oční čočce, v plicní tkáni a v hepatocytech (Banerjee 2008, Nýdlová et al. 2014). Glutathion je syntetizován v cytosolu téměř všech buněk, ale v lidském těle nejvíce v játrech. Jeho syntéza je součástí cyklu šesti enzymově katalyzovaných reakcí tzv. γ -glutamylového cyklu (Nýdlová et al. 2014). Základ cyklu tvoří 2 následné ATP-dependentní reakce. V první reakci, katalyzované enzymem γ -glutamylcysteinsynthetasou, vzniká z molekuly glutamátu a molekuly cysteinu γ -glutamylcystein. V následující reakci vzniká z γ -glutamylcysteinu a glycinu za katalýzy enzymu glutathionsynthetasy glutathion (Skálová a Boušová 2011).

Vyskytuje se ve dvou volných formách – redukovaný jako thiol (GSH) nebo oxidovaný jako disulfid (GSSG) (obr. 9, Nýdlová et al. 2014). Poměr volných forem glutathionu je velmi důležitým indikátorem oxidačního stresu v organismu. Za fyziologických podmínek je v buňkách přítomna až z 99% jeho redukováná forma. Při některých patologických procesech (záněty, maligní nádory, Parkinsonova choroba, infarkt myokardu) toto číslo klesá a může být přítomno až 50% oxidované formy.



Obr. 9. Chemická struktura glutathionu. GSH – redukováná forma (a), GSSG – oxidovaná forma (b) (Nýdlová et al. 2014).

Hlavními funkcemi glutathionu v organismu jsou ochrana buněk před poškozením volnými radikály a reaktivními sloučeninami kyslíku, regenerace vitamínu A a C, udržení thiolových skupin bílkovin v redukované podobě a zachování jejich fyziologické funkce a v neposlední řadě například také konjugace s xenobiotiky a jejich následné vyloučení z organismu ve formě sloučenin kyseliny merkapturové.

Na metabolismu glutathionu se podílí řada enzymů. Glutathionreduktasa a již zmíněné glutathionsynthetasa a γ -glutamylcysteinsynthetasa hladinu GSH zvyšují. Glutathionperoxidasy, glutathion-S-transferasy a γ -glutamyltranspeptidasa naopak hladinu GSH snižují (Nýdlová et al. 2014).

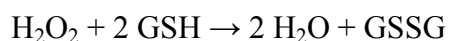
GSH za pomoci glutathionperoxidas v organismu odstraňuje z buněk H_2O_2 a chrání je tak před vznikem oxidačního poškození. Dochází k přeměně GSH na oxidovanou formu GSSG, který se zpět redukuje na GSH pomocí enzymu glutathionreduktasa (Banerjee 2008).



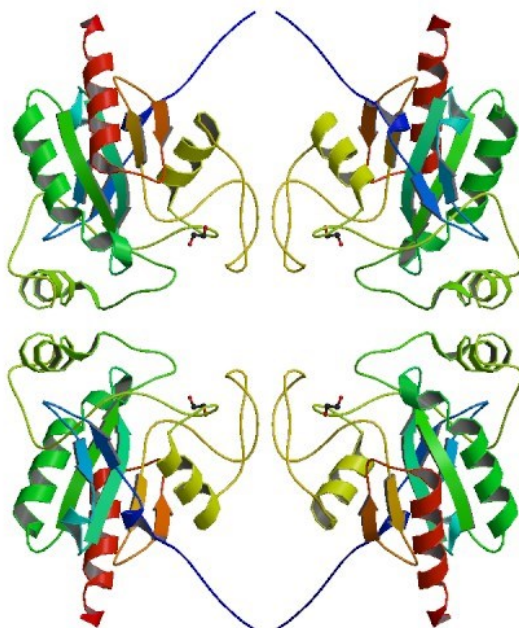
Mezi nejvýznamnější reakce II. fáze biotransformace v lidském organismu patří konjugace s glutathionem. Tato reakce může být buď neenzymová, protože nevyžaduje počáteční aktivaci, nebo urychlená pomocí enzymů glutathion-S-transferas (Skálová a Boušová 2011).

2.2.1. Glutathionperoxidasy

Glutathionperoxidasy (GPx, EC 1.11.1.9.) patří, stejně jako GR, do rodiny oxidoreduktas. Jedná se o enzym, u kterého známe 8 isoenzymů (GPx1-8). Tyto isoformy se liší tkáňovou specifitou, lokalizací exprese, stupněm polymerace, funkcí a také strukturou. Savčí GPx 1-4 mají ve své struktuře v katalytickém jádru selenocystein, GPx 5, 7 a 8 cystein, a GPX 6 obsahuje u lidí selenocystein, u myši a potkanů cystein (Brigelius-Flohe a Maiorino 2013). GPx katalyzují reakci mezi GSH a H_2O_2 , což je v organismu velmi důležitá reakce, která jej chrání před oxidačním poškozením (Nýdlová et al. 2014, Brigelius-Flohe a Maiorino 2013). Regeneraci oxidovaného glutathionu poté zajišťuje enzym glutathionreduktasa (Racek 2003).



GPX se nachází především v cytoplasmě, dále v mitochondriích a také v jádře.

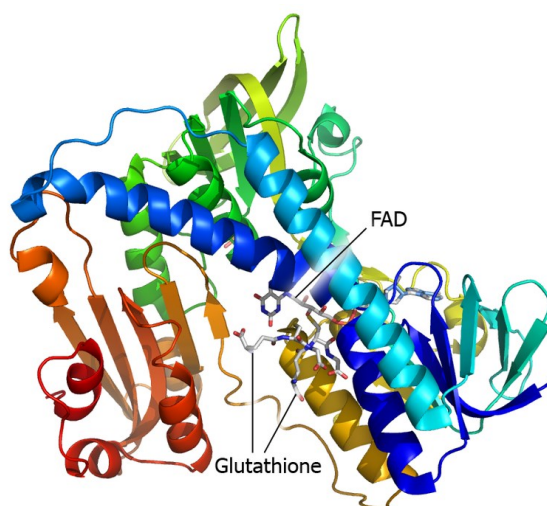


Obr. 10. Lidská glutathionperoxidasa 5. Zdroj: RCSB Protein Databank (záznam 2I3Y, <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2I3Y>).

2.2.2. Glutathionreduktasa

Glutathionreduktasa (GR, EC 1.6.4.2) je enzym patřící do rodiny oxidoreduktas. Jedná se o homodimerický protein, složený ze 2 stejných podjednotek navzájem spojených disulfidickou vazbou. Ve své struktuře obsahuje flavinadenin dinukleotid (FAD) (Nýdlová et al 2014). GR redukuje GSSG na GSH za pomoci kofaktoru NADPH, které získává hlavně z pentózového cyklu (Banerjee 2008). Tento enzym je tedy nezbytný pro redoxní cyklus glutathionu, který udržuje vysoký poměr GSH/GSSG.

GR je lokalizována především v cytosolu a také v matrix mitochondrií a chloroplastech (Nýdlová et al 2014).



Obr. 11. Struktura lidské glutathionreduktasy. Zdroj: RCSB Protein Databank (záznam 1GRE, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1GRE>).

2.2.3. Glutathion-S-transferasy

Glutathion-S-transferasy (GST, EC 2.5.1.18) patří do skupiny enzymů zvaných transferasy. Známe čtyři strukturně odlišné rodiny – cytosolové GST (představují největší rodinu transferas), mitochondriální GST třídy kappa, MAPEG enzymy a fosfomycin rezistentní proteiny. Vždy jsou tvořené 2 podjednotkami, které jsou buď homodimerické, nebo heterodimerické. Jejich funkcí je hlavně katalýza konjugace GSH s xenobiotiky. Uplatní se při nukleofilní reakci glutathionu s nepolárními sloučeninami obsahujícími ve své struktuře atom síry nebo elektrofilní uhlík či dusík (Nýdlová et al 2014).

GST jsou převážně cytosolické enzymy, ale byly objeveny i v mitochondriích, peroxisomech a hladkém endoplazmatickém retikulu. U člověka se nachází nejvíce v játrech a dále také v ledvinách, mozku, placentě nebo v kosterním svalstvu (Skálová a Boušová 2011).



Obr. 12. Struktura lidské glutathion-S-transferasy. Zdroj: RCSB Protein Databank (záznam 1K3Y, <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1k3y>).

3. Cíle práce

Touto prací navazuji na svou diplomovou práci „Vliv glutamátem navozené obezity na antioxidační enzymy u myší“ (2014), v níž jsem u MSG obézních a kontrolních myší studovala aktivitu enzymů ze skupiny peroxidas, superoxiddismutasy a katalasy a u enzymů superoxiddismutasy a katalasy jsem zjišťovala také proteinovou expresi. Cílem rigorózní práce bylo pokračovat ve studiu vlivu MSG obezity u stejných pokusných zvířat na aktivitu a proteinovou expresi antioxidačních enzymů využívajících glutathion. Konkrétně jsem se zabývala enzymy glutathionreduktasou, glutathionperoxidasou a glutathion-S-transferasou. K dosažení cílů bylo nutno:

1. Stanovit specifické aktivity glutathionreduktasy, glutathionperoxidasy a glutathion-S-transferasy u pokusných myší rozdělených do skupin MSG, NaCl a neovlivněných a dále rozdělených podle pohlaví a věku (8 a 20 týdnů).
2. Porovnat zjištěné enzymové aktivity s ohledem na patologický stav, věk a pohlaví pokusných myší.
3. Pomocí SDS-PAGE a imunoblottingu stanovit proteinovou expresi GR a GPx vztaženou na množství β -aktinu u všech skupin myší.
4. Porovnat zjištěné relativní exprese s ohledem na patologický stav, věk a pohlaví pokusných myší.

4. Materiál a metodika

4.1. Chemikálie a přístroje

Chemikálie

HCl 35%, H₂O₂ 30%, KH₂PO₄, methanol, NaCl, hydrogenfosforečnan disodný dihydrát a dihydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát byly objednány z firmy Penta, zatímco H₂SO₄ 97% byla produktem firmy Lachema a isobutanol jsme získali od firmy Merck. Ze Sigma-Aldrich jsme objednali 2-merkapt ethanol, akrylamid (AA), bis-akrylamid (bis-AA), bromfenolovou modř (BFB), glutamát monosodný (MSG), glycin, hovězí sérový albumin, persíran amonný (APS), set pro stanovení koncentrace bílkoviny metodou BCA včetně proteinového standardu, TEMED a Tris. Chemiluminiscenční substrát Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, koží polyklonální protilátka (Ab) proti králičímu Ig konjugovaná s křenovou peroxidasou a koží polyklonální Ab proti myššímu Ig konjugovaná s křenovou peroxidasou pocházely z GE Healthcare, zatímco králičí polyklonální Ab proti GPx2, králičí monoklonální Ab proti GR a myší monoklonální Ab proti β-aktinu byly objednány z firmy Abcam. Laurylsíran sodný (SDS) pocházel z BDH Chemicals. Molekulový standard Precision Plus Protein All Blue a odtučněné sušené mléko byly objednány z firmy BioRad. Redestilovaná voda byla získána na katedře biochemických věd Faf UK.

Pomůcky

96-jamkové mikrotitrační destičky Greiner (na stanovení enzymových aktivit), 96-jamkové mikrotitrační destičky GAMMA (na stanovení bílkoviny), automatické pipety Eppendorf Research + špičky, multikanálové pipety Eppendorf Research + špičky, blotovací papír, buničina, centrifugační kyvety, mikrozkuhavky Eppendorf, kónické zkuhavky Falcon, filtrační papír, laboratorní sklo (Erlenmayerovy baňky, kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, skleněné misky, skleněná tyčinka), lihový popisovač, magnety, navažovací lžičky, nitrilové rukavice, nitrocelulósová membrána, nůžky, potravinářská folie, potřeby pro nalévání gelů (hřebeny, klínky, krycí skla, skla se spacersy, stojánky), potřeby pro elektroforézu (elektrody, nádoba na led, stojan na skla, vanička, víčko, zdroj napájení), stojánky na mikrozkuhavky, stopky.

Přístroje

Analytické váhy Sartorius CP 225D a předvážky Sartorius, ultracentrifuga Beckman, ultracentrifuga Heraeus Biofuge Stratos, pístový homogenizátor Potter S, ultrazvukový homogenizátor Sonoplus Bandelin HD 2070, magnetická míchačka IKA RO 10, pH metr inoLab pH Level 2, multimodální čtečka TECAN INFINITE M200, stolní centrifuga Eppendorf 5415 D, termomixer Eppendorf, elektroforesa Mini-PROTEAN 3, blotovací zařízení Trans Blot Turbo (BioRad), blotovací skener C-Digit (Li-Cor), třepačka IKA MS2, ultrazvuková lázeň Tesla UC 005 AJ 1, roler Mythic Blood Mixer.

Software použitý k vyhodnocování výsledků

GraphPad Prism 6, ImageStudio a MS Excel

4.2. Příprava 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4)

Ve všech dále popsaných metodách jsem používala k ředění vzorků 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,4.

Navážku 35,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ jsem rozpustila v redestilované vodě a v odměrné baňce doplnila vodou do 1 l. Navážku 3,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ jsem rozpustila v redestilované vodě a doplnila v odměrné baňce vodou do 250 ml. Takto připravené roztoky jsem slévala dohromady za současného míchání a kontroly pH na pH metru, aby výsledné pH připraveného pufru bylo 7,4.

4.3. Navození obezity glutamátem sodným u NMRI myši a stanovení základních biochemických parametrů

K vypracování své rigorózní práce jsem používala 3 skupiny myši. První skupině byl s.c. aplikován MSG (glutamát sodný), druhou skupinu tvořila osmolální kontrola, která dostávala s.c. NaCl a třetí skupina myši byla neovlivněná.

MSG skupina myši dostávala od 2. dne po narození roztok MSG, celkem 90 mg za 7 dní. Skupina osmolální kontroly dostávala od 2. dne po narození roztok NaCl, celkem 70 mg za 7 dní. Roztoky se podávaly s.c. do kožní řasy na zádech. Druhý až šestý den dostávaly MSG myši roztok MSG 1 (10 mg/ 50 μl , 1,07 M, 2,14 osm/l), sedmý

a osmý den roztok MGS 2 (20 mg/ 50 μ l, 2,17 M, 4,28 osm/l). NaCl myši dostávaly po celou dobu roztok o stejné koncentraci NaCl (10 mg/ 50 μ l, 2,14 osm/l).

Myši byly zabity dekapitací v celkové anestezii ve věku buď 8, nebo 20 týdnů. Byla jim odebrána krev a vyjmuta játra. Játra byla ihned uložena do hlubokomrazícího boxu a byla skladována při -80 °C. Krev byla odebírána do zkumavek obsahujících heparin. Okamžitě po odebrání byly centrifugací (3000 ot./min, 10 min, 10°C) odděleny plasma a erythrocyty. Základní biochemické parametry byly stanoveny ve směsných vzorcích plasmy v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky (Fakultní nemocnice Hradec Králové). Plasmatické hladiny insulinu a leptinu stanovila doc. Boušová pomocí ELISA kitů podle instrukcí výrobce (BioVendor).

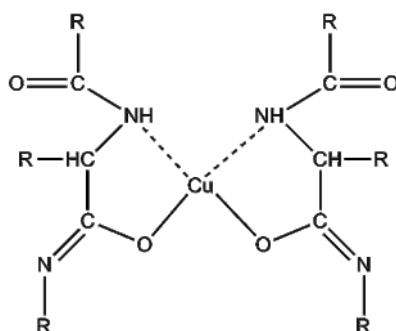
4.4. Příprava subcelulárních frakcí

Játra jsem rozstříhala a po pěti gramech je přendala do homogenzátoru. Přidala jsem 15 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru, pH 7,4, a posunem pístu 5 \times nahoru a dolů jsem vytvořila homogenní směs. Tuto směs jsem přelila do centrifugační kyvety, přemístila do centrifugy Heraeus a nechala 20 minut odstředovat rychlostí 5.000 G při 4°C. Poté jsem supernatant slila do čistých kyvet a nechala odstředovat podruhé, tentokrát 60 minut rychlostí 20.000 G při 4°C. Po centrifugaci jsem supernatant slila do kyvet pro ultracentrifugu Beckman. Uzavřené a vyvážené kyvety jsem vložila do rotoru a nechala 65 minut odstředovat rychlostí 105.000 G při 4°C. Supernatant po třetím točení jsem rozpipetovala po 1,1 ml do mikrozkušavek a uložila do hlubokomrazícího boxu, kde je stálá teplota -80°C. Vzniklou peletu jsem resuspendovala v 5 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru, pH 7,4. Suspenzi jsem dala do kyvet pro ultracentrifugu Beckman a znovu ji odstředila. Supernatant jsem vylila a k peletě jsem přidala 5 ml pufru s 20 % glycerolu. Malým pístem jsem připravené mikrosomy zhomogenizovala, přelila jsem je do kádinky a poté znovu zhomogenizovala v ultrazvukové lázni. Za stálého míchání jsem mikrosomy rozpipetovala po 330 μ l do mikrozkušavek a dala jsem je také do hlubokomrazícího boxu.

4.5. BCA metoda pro stanovení koncentrace bílkoviny

Pro stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích jsem použila spektrofotometrickou metodu se sodnou solí kyseliny bicinchoninové (BCA, bicinchoninic acid). Jedná se o biuretovou reakci, při níž nejprve bílkovina reaguje

v alkalickém prostředí s Cu^{2+} . Měďnaté ionty se redukují na Cu^{1+} , které v druhém kroku reakce redukuje BCA za vzniku modrofialového komplexu (Obr. 13). Toto stanovení je závislé především na obsahu aminokyselinových zbytků cysteinu, tryptofanu a tyrosinu v bílkovině. Intenzita zbarvení se měří fotometricky při 562 nm a je přímo úměrná množství bílkoviny ve vzorku.



Obr. 13. Komplex bílkoviny s mědí.

Při vlastním stanovení jsem používala roztoky A, B a pracovní roztok C.

- Roztok A: NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH
- Roztok B: 4% $\text{CuSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- Roztok C (pracovní roztok): 50 dílů roztoku A + 1 díl roztoku B

Postupovala jsem tak, že jsem si nejprve ze zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 1 mg/ml připravila vzorky o koncentraci 0, 200, 400, 600, 800 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ pro vytvoření kalibrační přímky (tabulka 1).

Tab. 1. Ředění roztoků pro vytvoření kalibrační přímky.

Koncentrace bílkoviny ($\mu\text{g/ml}$)	BSA 1 mg/ml (μl)	Redestilovaná voda (μl)
0	0	100
200	20	80
400	40	60
600	60	40
800	80	20
1000	100	0

Vzorky cytosolu jsem pro toto stanovení naředila 30x redestilovanou vodou.

Do mikrotitrační destičky jsem napipetovala 10 μ l vzorků cytosolu, každý ve 4 paralelkách, roztoky pro vytvoření kalibrační přímky a slepé vzorky, které obsahovaly 10 μ l redestilované vody.

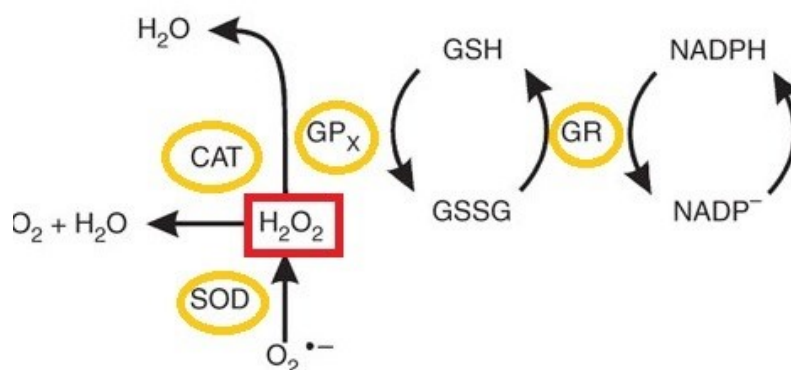
Pro přípravu pracovního roztoku C jsem smíchala 20 ml roztoku A a 0,4 ml roztoku B. Reakci jsem zahájila přidáním 200 μ l pracovního roztoku C multikanálovou pipetou do jednotlivých jamek připravené mikrotitrační destičky. V termomixeru jsem poté destičku nechala za současného třepání inkubovat 30 min při 37 °C.

Po 30 min jsem měřila absorbanci na spektrofotometru TECAN při 562 nm.

V programu Microsoft Excel jsem z naměřených hodnot vytvořila kalibrační přímku a vypočítala koncentraci proteinů mg/ml v jednotlivých vzorcích. Od absorbance vzorků jsem odečetla průměrnou absorbanci slepých vzorků.

4.6. Stanovení aktivity glutathionperoxidasy

Enzym glutathionperoxidasa (GPx) je součástí skupiny enzymů, která katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku. Stanovení aktivity GPx (obr. 14) je založeno na reakci, kdy dochází k oxidaci redukovaného glutathionu a vzniku jeho oxidované formy (GSSG). Oxidovaný glutathion je v průběhu reakce zpět redukován pomocí enzymu GR a tím je zajištěna konstantní hladina GSH. Reakce je doprovázena oxidací NADPH, čímž dochází k poklesu jeho absorbance, kterou jsem měřila při 340 nm na spektrofotometru Tecan (Flohé a Günzler 1984, Handy et al. 2009).



Obr. 14. Princip stanovení aktivity GPx.

Připravila jsem si zásobní roztoky:

- 0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7,0: navážku 1,742 g K_2HPO_4 jsem rozpustila v 100 ml redestilované vody a v jiné odměrné baňce jsem rozpustila navážku 680,5 mg KH_2PO_4 v 50 ml redestilované vody. Oba roztoky jsem za současného měření pH na pH-metru slévala dohromady, přibližně v poměru 3:1.
- 20 mM EDTA: navážku 7,44 mg EDTA jsem rozpustila v 1 ml 0,1 M K-fosfátovém pufru
- GR: připravila jsem si roztok o koncentraci 10 jednotek na 1 ml pufru tak, že jsem 33 μ l GR pipetovala do 1467 μ l 0,1 M K-fosfátového pufru
- 50 mM GSH: navážku 3,07 mg jsem rozpustila v 1 ml pufru
- 4 mM NADPH: navážku 3,16 mg jsem rozpustila v 1 ml redestilované vody
- 70% *t*-butylhydroperoxid: 34,3 μ l roztoku *t*-butylhydroperoxidu jsem v čas potřeby napipetovala do 10 ml pufru

Vzorky biologického materiálu jsem vyndala z hlubokomrazicího boxu, rozmrazila a 50x naředila 0,1 M Na-fosfátovým puftrem (pH 7,4).

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky jsem napipetovala nejprve 50 μ l cytosolické frakce a dále jsem multikanálovou pipetou přidala 130 μ l předem připraveného mastermixu.

Příprava mastermixu:

- 10,8 ml pufru
- 1,2 ml EDTA
- 1,2 ml GR
- 2,4 ml GSH

Destičku jsem nechala při 37°C 10 minut preinkubovat.

Dále jsem multikanálovou pipetou přidala 10 μ l NADPH, spustila metodu na spektrofotometru Tecan a po dobu 5 min jsem sledovala spotřebu NADPH (nezávislou na hydroperoxidu).

Po pěti minutách jsem multikanálovou pipetou přidala 10 μ l t-butylhydroperoxidu a tím nastartovala reakci. Na spektrofotometru Tecan jsem znovu spustila nastavenou metodu a po dobu 5 minut jsem při 340 nm sledovala pokles absorbance NADPH.

Aktivitu (U/ml) jsem následně vypočítala podle vzorce:

$$A = \frac{(A_{vz/min} - A_{sl}) \times 2 \times V_i}{\mathcal{E} \times l \times V_s}$$

kde $A_{vz/min}$ je rozdíl absorbance vzorku za minutu (z oblasti lineárního poklesu), A_{sl} je absorbance slepého vzorku, 2 vychází ze stechiometrie reakce (2 μ mol GSH produkovány 1 μ molem NADPH), V_i je objem reakční směsi ($V_i = 0,2$ ml), \mathcal{E} je molární extinkční koeficient ($\mathcal{E} = 6,22$ mM/cm), l je délka měřené vrstvy ($l = 0,75$ cm) a V_s je objem biologické frakce ($V_s = 0,001$).

Specifickou aktivitu (mol/min/mg) jsem vypočítala vztahem aktivity na množství bílkoviny ve vzorku a vynásobením 1000:

$$A_{sp} = A/m_{prot} \times 1000$$

kde m_{prot} je množství bílkoviny (mg/ml).

4.7. Stanovení aktivity glutathionreduktasy

Glutathionreduktasa (GR) je enzym účastnící se spolu s thioredoxinreduktasou (TrxR) ochrany organismů před oxidačním stresem. Ke stanovení GR aktivity jsem použila metodu, která je založena na přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný (GSH) za současné oxidace NADPH (substrátu). Na spektrofotometru Tecan jsem sledovala spotřebu substrátu jako lineární vzrůst absorbance při 340 nm po dobu šesti minut (Bonilla et al., 2008, Carlberg and Mannervick 1985).

Postup:

Připravila jsem si pufr a další zásobní roztoky podle následujícího rozpisu.

- 0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7,0: v poměru přibližně 5:2 jsem smíchala roztoky K_2HPO_4 (17,42 mg/ml) a KH_2PO_4 (13,61 mg/ml), současně jsem měřila pH

- EDTA 5 mM: na 1 ml redestilované vody jsem navázila 1,86 mg EDTA, navážku jsem rozpustila za intenzivního míchání
- NADPH 2,5 mM: navážku 4,16 mg jsem rozpustila ve 2 ml redestilované vody
- GSSG 4 mM: na 1 ml redestilované vody jsem navázila 2,45 mg GSSG

Biologické vzorky jsem vyndala z hlubokomrazicího boxu, rozmrazila a 20x naředila 0,1 M Na-fosfátovým pufrům, pH 7,4.

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky jsem napipetovala 50 μ l vzorku. Smíchala jsem 6 ml 0,1 M K-fosfátového pufru (pH 7,0), 4,8 ml EDTA, 6 ml GSSG a 1,2 ml NADPH a připravila si tak mastermix. Multikanálovou pipetou jsem do každé jamky napipetovala 150 μ l mastermixu a ihned měřila absorbanci po dobu 6 minut při 340 nm. Každý vzorek jsem připravila 4x a ke každému vzorku jsem zároveň připravila i slepý vzorek, ve kterém bylo místo cytosolu 50 μ l 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4).

Při vyhodnocování výsledků jsem nejprve spočítala rozdíl absorbance za minutu. K výpočtu lze použít pouze oblast lineárního vzrůstu absorbance. V mém případě byl vzrůst lineární po celou dobu, díky zvolení vhodného zředění vzorků. Dále jsem pokračovala podle vzorce:

$$A = \frac{(A_{vz/min} - A_{sl}) \times V_i}{\epsilon \times l \times V_s}$$

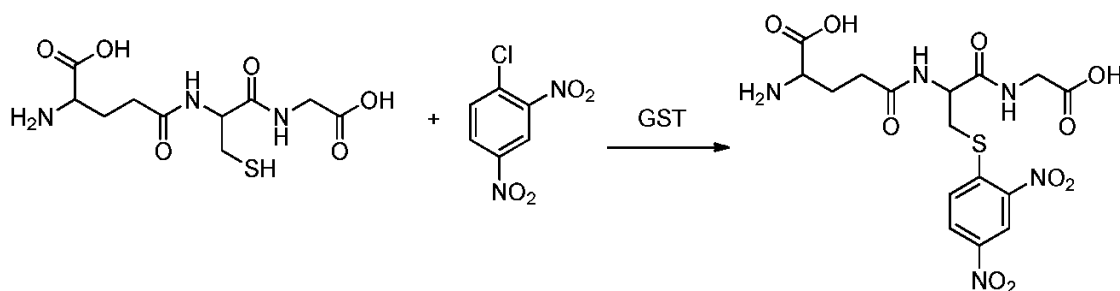
kde $A_{vz/min}$ je rozdíl absorbance za minutu, A_{sl} je absorbance slepého vzorku, V_i je objem reakční směsi ($V_i = 0,2$ ml), ϵ je molární extinkční koeficient ($\epsilon = 6,22$ mM/cm), l je délka měřené vrstvy ($l = 0,75$ cm) a V_s je objem biologické frakce po zohlednění ředění ($V_s = 0,0025$ ml).

Hodnotu aktivity jsem podělila množstvím bílkoviny (mg/ml), vynásobila tisícem a získala tak specifickou aktivitu v jednotkách nmol/min/mg.

$$A_{sp} = A/m_{prot} \times 1000$$

4.8. Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy

Enzym glutathion-S-transferasa (GST) je enzymem antioxidačním a zároveň i biotransformačním. Principem stanovení je reakce, kdy GST katalyzuje vznik konjugátu S-2,4-dinitrofenylglutathionu (obr. 15) při použití univerzálního substrátu 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) a redukovaného glutathionu (GSH). Nárůst absorbance vznikajícího konjugátu jsem měřila kinetickou metodou v maximu 340 nm po dobu šesti minut (Habig et al. 1974).



Obr. 15. Princip stanovení aktivity GST s CDNB.

Postup:

Připravila jsem si zásobní roztoky:

- 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 6,5: navážku 1,79 g Na_2HPO_4 jsem rozpustila v redestilované vodě a doplnila do 50 ml a navážku 1,56 g NaH_2PO_4 jsem rozpustila rovněž v redestilované vodě a doplnila do 100 ml v odměrné baňce. Oba roztoky jsem za současné kontroly pH smíchala v poměru přibližně 1:3.
- Roztok 5,35 mM GSH: navážku 9,87 mg GSH jsem rozpustila v 6 ml 0,1 M Na-fosfátové pufru (pH 6,5)
- Roztok 53,5 mM CDNB: navážku 6,5 mg CDNB jsem rozpustila v 0,6 ml ethanolu

Vzorky cytosolu jsem vyndala z hlubokomrazícího boxu, rozmrazila a 50x naředila Na-fosfátovým puforem, pH 7,4.

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky jsem pipetovala 20 μl vzorku (každý vzorek 7x) a do posledního řádku 20 μl pufru (slepý vzorek).

Smíchala jsem 5,6 ml GSH, 0,56 ml CDNB a 21,84 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 6,5) a vytvořila tak mastermix. Multikanálovou pipetou jsem ke vzorkům přidala 280 μ l mastermixu, lehce protřepala a destičku jsem vložila do spektrofotometru Tecan. Měřila jsem absorbanci vzorků při 340 nm celkem 6 minut v minutových intervalech. Po celých 6 minut byl přírůstek lineární.

Pro výpočet aktivity GST jsem si nejprve zjistila rozdíl absorbance za minutu podle vzorce:

$$A_{vz/min} = \frac{(A_{vz6min} - A_{vz1min})}{5}$$

kde A_{vz6min} je absorbance, kterou jsem na spektrofotometru Tecan naměřila po šesti minutách a A_{vz1min} je absorbance po jedné minutě.

Aktivitu GST (μ mol/min/ml) jsem vypočítala podle rovnice:

$$A = \frac{(A_{vz/min} - A_{sl} \times V_i)}{(\mathcal{E} \times l \times V_s)}$$

kde A_{sl} je absorbance slepého vzorku, \mathcal{E} je extinkční koeficient ($\mathcal{E} = 9,6$ mM/cm), l je délka měřené vrstvy ($l = 0,75$ cm) a V_s je objem biologické frakce po zohlednění ředění ($V_s = 0,0004$ ml).

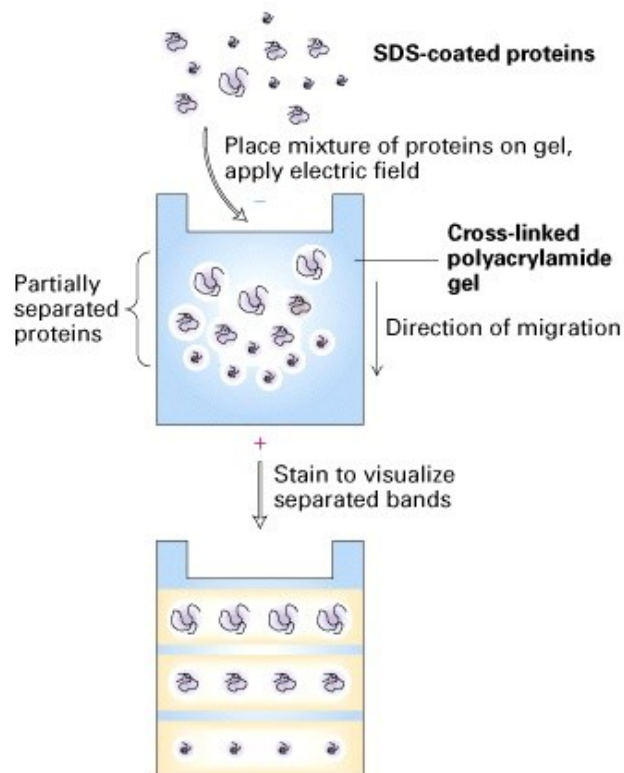
Specifickou aktivitu (nmol/min/mg) jsem vypočítala vztažením aktivity na množství proteinu ve vzorku a vynásobením tisíckrát:

$$A_{sp} = A/m_{prot} \times 1000$$

kde m_{prot} je množství bílkoviny (mg/ml).

4.9. Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Elektroforéza je metoda, při níž dochází k oddělení látek na základě rozdílné migrace v elektrickém poli. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) je založená na principu migrace proteinů v polyakrylamidovém gelu (Obr. 16). Rychlost migrace, kterou elektrické pole navodí, je kromě velikosti molekuly závislá také na náboji, prostorovém uspořádání bílkoviny i na velikosti pórů v gelu.



Obr. 16. Princip PAGE. Zdroj:

<http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/Bio750/Electrophoresis.html>.

Připravila jsem si zásobní roztoky:

- 4 M HCl: 88 ml koncentrované HCl jsem pomalu přilávala do asi 150 ml redestilované vody a poté jsem v odměrné baňce doplnila vodou do 250 ml
- Zásobní roztok akrylamidu (AA) + bis-akrylamidu (bis-AA): navážku 30 g akrylamidu a navážku 0,8 g bis-akrylamidu jsem rozpustila v asi 20 ml destilované vody a poté v odměrné baňce doplnila vodou do 100 ml
- 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8: navážku 18,5 g Trisu jsem rozpustila v 75 ml redestilované vody, postupným přidáváním menšího množství 4 M HCl a za současné kontroly na pH metru, jsem upravila pH na 8,8 a poté jsem roztok v odměrné baňce doplnila vodou na 100 ml
- 0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8: postupovala jsem stejně jako u 1,5 M Tris-HCl pufru, pouze navážka byla 6 g Trisu a pH na které jsem roztok upravovala, bylo 6,8
- 10% laurylsíran sodný (SDS): navážku 10 g SDS jsem rozpustila v 80 ml redestilované vody a v odměrné baňce doplnila vodou do 100 ml

- 0,5% bromfenolová modř (BFB): navážku 50 mg BFB jsem rozpustila v 10 ml redestilované vody
- Koncentrovaný elektrodový pufr, pH 8,3: navážku 75 g glycinu, 15 g Trisu a 5 g SDS jsem rozpustila v přibližně 0,9 l redestilované vody, postupným přidáváním malého množství 4 M HCl a za současných kontrol pH jsem upravila na pH 8,3, v odměrné baňce jsem doplnila vodou do 1 l
- Zásobní vzorkový pufr: smíchala jsem 1,3 ml redestilované vody, 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pufru, pH 6,8, 2,0 ml glycerolu, 3,0 ml 10% SDS a 0,6 ml 0,5% BFB
- Isobutanol nasycený vodou: smíchala jsem isobutanol s redestilovanou vodou a v horní části jsem tak získala isobutanol nasycený vodou

Ze zásobních roztoků jsem následně připravila pracovní roztoky:

- 10% persíran amonný (APS): těsně před použitím jsem rozpustila 20 mg persíranu amonného ve 200 μ l redestilované vody
- 10% separační (spodní) gel: na přípravu 2 gelů tloušťky 0,75 mm jsem smíchala 4 ml redestilované vody, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pufru, pH 8,8, 0,1 ml 10% SDS a 3,4 ml roztoku AA + bis-AA, těsně před použitím jsem zahájila polymeraci přidáním 116 μ l roztoku persíranu amonného a 8 μ l TEMEDu
- 4% zaostřovací (horní) gel: na přípravu 2 gelů tloušťky 0,75 mm jsem smíchala 3,126 ml redestilované vody, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pufru, pH 6,8, 0,05 ml 10% SDS a 0,5 ml roztoku AA + bis-AA, těsně před použitím jsem zahájila polymeraci přidáním 30 μ l roztoku APS a 2,5 μ l TEMEDu
- Elektrodový pufr: těsně před použitím jsem smíchala 70 ml zásobního elektrodového pufru a 280 ml redestilované vody
- Vzorkový pufr: ke 190 μ l zásobního vzorkového pufru jsem v digestoři přidala 10 μ l merkaptoethanolu

Pro nalití gelu jsem si připravila nalévací stojánek, skla, skla se spacersy, spony a hřebeny. Po celou dobu jsem pracovala v rukavicích. Skla jsem důkladně omyla saponátem, opláchla vodou, redestilovanou vodou a nakonec lihomethanolem a nechala jsem je ve svislé poloze oschnout. Po oschnutí jsem na sebe přiložila spacerové a krycí sklo a vložila je do zeleného rámečku, který jsem umístila do nalévacího stojánu. Mezi

připravená a zajištěná skla jsem pipetou nalila roztok na 10% separační gel a ihned jsem roztok po celé délce převrstvila 200 μ l isobutanolu nasyceného vodou. Gel jsem nechala při pokojové teplotě polymerovat 45 minut. Poté jsem isobutanol slila a povrch gelu jsem opatrně opláchla redestilovanou vodou a následně jsem prostor nad gelem vysušila filtračním papírem tak, aby se papír nedotkl gelu. Namíchala jsem si roztok na 4% zaostřovací gel a pipetou jsem ho nalila na spodní gel až po vrchní okraj krycího skla. Mezi skla jsem zasunula hřebec (pod úhlem 45°, aby se v gelu neudělaly bublinky) a nechala jsem gel při pokojové teplotě polymerovat 1 hodinu. Po hodině jsem skla s gelem opatrně vyndala z rámečku a obalila potravinářskou folií, aby gel nevyschl. Gely jsem pak nechala zabalené folií ještě polymerovat přes noc v lednici.

Další den ráno jsem vzorky naředila 0,1 M fosfátovým pufrům (pH 7,4) na koncentraci proteinu 8 μ g/ μ l. Po naředění jsem je smíchala v poměru přibližně (podle množství proteinu) 1 : 1 se vzorkovým pufrům, abych měla po jejich nanesení v jamce 40 μ g proteinu (Tabulka 2) a dala je do předehřátého termomixeru na 3 min povařit při 99 °C.

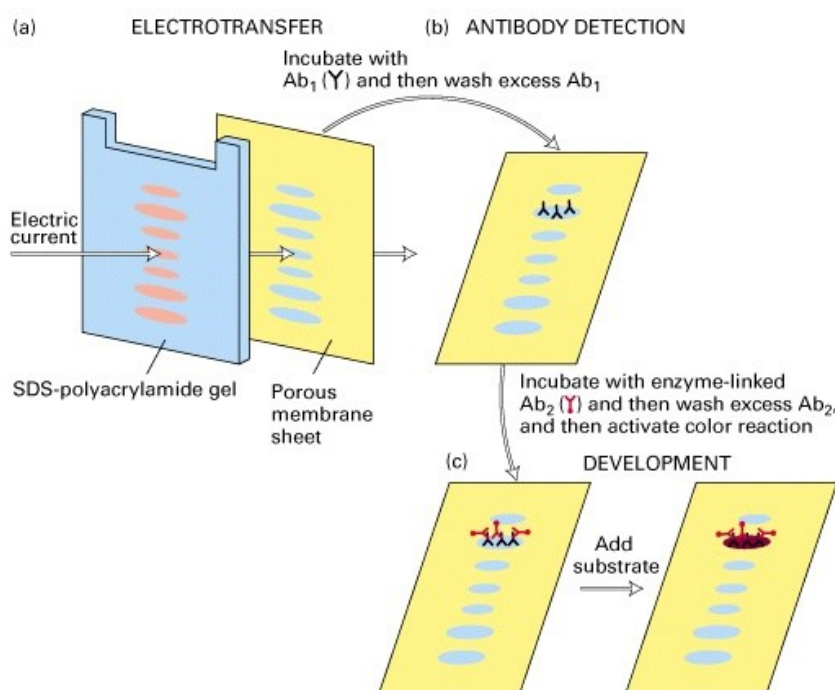
Tab. 2. Ředění vzorků pro elektroforézu.

Vzorek	Koncentrace proteinu (μ g/ml)	Množství vzorku (μ l)	Množství pufru (μ l)
MSG ♀ 8	15552,86	514	486
MSG ♂ 8	16100,36	497	503
MSG ♀ 20	13730,36	583	417
MSG ♂ 20	15985,71	500	500
NaCl ♀ 8	14726,79	543	457
NaCl ♂ 8	15982,50	501	499
NaCl ♀ 20	15648,21	511	489
NaCl ♂ 20	14926,07	536	464
Kontrola ♀ 8	14299,29	559	441
Kontrola ♂ 8	18108,21	442	558
Kontrola ♀ 20	14413,93	555	445
Kontrola ♂ 20	13141,07	609	391

Z gelu jsem opatrně vyndala hřeben a jamky propláchlá redestilovanou vodou a připravila jsem si zařízení na elektroforézu. Zelené těsnění na vnitřní části stojánku jsem očistila a lehce potřela vazelínou. Skla s gelem jsem přitlačila z každé strany na těsnění, vnitřní část jsem zasunula do vnější části stojánku tak, aby skla se spacers byla na vnější straně a zajistila jsem je sponami. Stojánek se skly jsem vložila do vaničky. Do horního elektrodového prostoru jsem nalila asi 130 ml elektrodového pufru tak, aby byl gel celý ponořený a zkontrolovala jsem, že nepodtéká. Také do spodního elektrodového prostoru jsem nalila elektrodový pufr tak, aby byla hladina nad spodním okrajem gelu. Pomocí nanášecího bloku jsem pipetou nanasla do každé jamky 10 μ l vzorku (6 vzorků na 1 gel) a do jedné jamky jsem nanasla 5 μ l molekulového standardu. Nanášecí blok jsem vyndala a vaničku ponořila do ledové lázně. Na vaničku jsem nasadila víčko s elektrodami a zařízení jsem připojila ke zdroji. Napětí jsem nastavila na 100 V a spustila jsem elektroforézu. Když čelo doběhlo na spodní okraj gelu, vypnula jsem zdroj, sundala víčko, stojánek přemístila z vaničky a skla s gelem jsem vyndala.

4.10. Immunoblotting

Imunoblotting, nebo též western blotting, je metoda, při níž se přenáší bílkoviny elektrickým proudem z gelu na membránu. Zde jsou následně detekovány pomocí specifických protilátek (Obr. 17).



Obr. 17. Princip imunoblottingu. Zdroj: Molecular Cell Biology, Harvey Lodish et al.

Nejprve jsem si připravila zásobní roztok blotovacího pufru. Navážku 28,8 g glycinu a 6,06 g TRIS (25 mM) jsem rozpustila v přibližně 0,5 l redestilované vody. Přidala jsem 0,4 l methanolu a doplnila v odměrné baňce do 2 l. Takto připravený roztok jsem pro potřeby uchování přelila do menších lahví a uchovávala v lednici.

Po skončení elektroforézy jsem do vaničky s blotovacím pufrem ponořila skla s gelem. Pomocí klínek jsem skla rozevřela, gel odřízla od spacerů a odstranila jsem zaostřovací gel. Separační gel jsem si v pravém horním rohu označila odříznutím malé části gelu, abych poznala, kam jsem nanášela první vzorek. Nakonec jsem takto připravený gel oddělila od spodního skla a nechala ho několik minut v blotovacím pufru. Předem jsem do vaničky s pufrem dala namočit asi na 20 min také nastříhanou nitroceluloseovou membránu (2 kusy na 2 gely) a blotovací papíry (4 kusy na 2 gely).

Sestavila jsem si blotovací sendvič (od spodu):

- bílá houbička
- 1 kus blotovacího papíru
- gel
- nitroceluloseová membrána
- 1 kus blotovacího papíru
- bílá houbička

Sendvič jsem skleněnou tyčinkou opatrně uhladila, aby mezi gelem a membránou nebyly bubliny a vložila jsem ho do kazety blotovacího zařízení. Používala jsem zařízení BioRad Trans Blot Turbo. Do stejné blotovací kazety jsem vložila i druhý sendvič, na kterém bylo zbývajících 6 vzorků. Kazetu jsem uzavřela víčkem a zasunula do blotovacího zařízení. Nastavila jsem potřebné parametry a nechala 15 min blotovat. Bílkoviny se za tento čas přenesou pomocí elektrického proudu z gelu na membránu.

Připravila jsem si zásobní roztoky TRIS, TBST a protilátek.

- TRIS pufr (0,1 M, pH 8): 12,1 g TRIS jsem rozpustila v asi 0,8 l redestilované vody. Na pH-metru jsem postupným přidáváním malého množství 4 M HCl upravila pH roztoku na 8,0. Roztok jsem přelila do odměrné baňky a redestilovanou vodou doplnila na 1 l.

- TBST: 8,77 g NaCl jsem rozpustila v asi 0,3 l redestilované vody. K roztoku jsem přidala 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru, pH 8,0. V odměrné baňce jsem doplnila redestilovanou vodou na 1 l.
- Primární protilátky (Ab): příprava dle instrukcí výrobce
 - myší monoklonální Ab proti β aktinu – 1:3000 v TBST s 1% mlékem
 - králičí polyklonální Ab proti GPx2 - 1:1000 v TBST s 1 % mlékem
 - králičí monoklonální Ab proti GR – 1:2000 v TBST s 1% mlékem
- Sekundární protilátky: příprava dle instrukcí výrobce
 - kozí polyklonální Ab proti králičímu Ig konjugovaná s křenovou peroxidasou – 1:3000 v TBST
 - kozí polyklonální Ab proti myšimu Ig konjugovaná s křenovou peroxidasou – 1:3000 v TBST

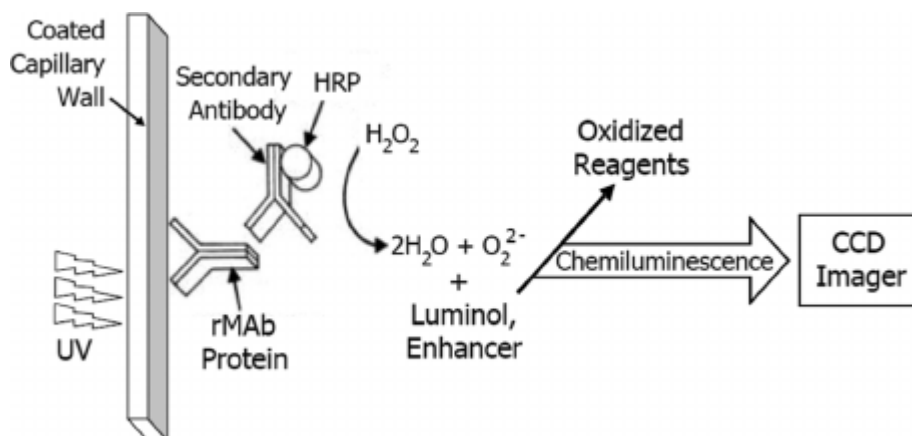
Po 15 min blotování jsem kazetu vyndala a sendvič rozebrala. Na membránách jsem si propisovací tužkou vyznačila nejvýraznější proužky markeru a poté jsem membrány opláchla v misce s redestilovanou vodou. Abych zablokovala nespecifická vazebná místa na membráně, naředila jsem navážku 4 g sušeného mléka v 50 ml TBST pufru a tento roztok jsem nalila do misek k membránám. Bílkoviny z mléka se navážou na místa, kde nejsou navázány bílkoviny ze vzorků. Takto se zablokují ostatní místa na membráně a protilátky se následně nemohou navázat jinam než na své specifické místo na antigenech.

Po jedné hodině jsem zablokované membrány vyndala, nechala je okapat a stočené do ruličky jsem je dala do kónických zkumavek Falcon. Ve zkumavkách jak probíhala inkubace s protilátkami a promývání dle následujícího rozpisu. Pro zajištění optimálního přístupu protilátek jsem kónické zkumavky umístila na roler a nechala je rotovat.

- přes noc navazování primární protilátky (chladicí místnost)
- 4 × 15 min promývání v TBST
- 1 hodinu navazování sekundární protilátky
- 4 × 15 min promývání v TBST

4.11. Chemiluminiscenční detekce proteinů

Po elektroforéze a imunoblottingu jsem pro detekci proteinů použila chemiluminiscenční metodu. Chemickou reakcí vzniká emise světla, kterou detekujeme (Obr. 18).



Obr. 18. Princip chemiluminiscenční detekce proteinů.

Zdroj: https://www.researchgate.net/figure/225183915_fig1_Figure-1-Schematic-representation-of-luminol-chemiluminescence-reaction-used-in-the-CIEF.

Těsně před použitím jsem si dle návodu výrobce připravila chemiluminiscenční substrát. Smíchala jsem 650 μ l roztoku A (luminol) a 650 μ l roztoku B (peroxid).

Membránu s navázanými sekundárními protilátkami jsem po posledním promývání vyndala z kónické zkumavky Falcon a pipetou jsem na ni nakapala připravený chemiluminiscenční substrát. Membránu jsem nechala inkubovat se substrátem 5 minut ve tmě, poté jsem ji položila do blotovacího skeneru stranou s navázanými proteiny směrem dolů a nechala snímat (obvykle 6 min). Naskenované bloty jsem vyhodnotila v programu Image Studio.

5. Výsledky

5.1. Biochemické charakteristiky jednotlivých skupin myši

Všem myším byla po usmrcení odebrána krev do heparinizovaných zkumavek a po centrifugaci byly v plasmě stanoveny základní biochemické parametry – koncentrace glukosy, celkového cholesterolu, HDL cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglycerolů, dále hladina insulinu a leptinu. Hladiny insulinu a leptinu jsem stanovila pomocí ELISA kitů podle návodu výrobce. Ostatní biochemické parametry byly stanoveny na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové pomocí rutinních biochemických metod. Hodnoty jednotlivých biochemických markerů, stáří, hmotnost a počet jedinců ve skupině je uveden v tabulce 3.

Z výsledků je dobře patrné, že u MSG myši obou pohlaví dochází k narušení leptinové signalizace již po 8 týdnech od navození obezity, zatímco u insulinu jsou statisticky významné změny přítomné až ve 20 týdnech věku. U MSG samců (20 týdnů) byly nalezeny zvýšené hladiny glukosy, celkového cholesterolu, HDL i LDL. U MSG samic stejného věku byly zvýšené hladiny celkového cholesterolu, HDL a triacylglycerolů, zatímco hladina glukosy a LDL byla srovnatelná s kontrolními skupinami. Rovněž hladiny leptinu byly ve skupině MSG20 samic významně nižší než u MSG20 samců, což by mohlo být způsobeno protektivním účinkem estrogenů.

Tab. 3. Biochemické parametry pokusných myší.

pohlaví	skupina	stáří (týden)	Glc (mM)	TC (mM)	HDL (mM)	LDL (mM)	TAG (mM)	insulin (ng/ml)	leptin (ng/ml)	hmotnost (g)	počet jedinců
♂	MSG	8	12,32	2,94	2,05	0,29	1,50	3,29 ± 0,19 ^{ab}	48,13 ± 4,47 ^b	35,61	38
		20	17,93	3,50	2,44	0,39	1,71	31,76 ± 3,89 ^d	101,20 ± 23,31 ^c	55,29	14
	NaCl	8	10,71	2,59	1,85	0,14	1,65	0,72 ± 0,20 ^{ab}	5,81 ± 0,02 ^a	33,04	23
		20	10,03	2,37	1,93	0,09	1,42	5,23 ± 0,71 ^{ac}	6,04 ± 0,08 ^a	41,67	14
	bez	8	11,28	2,36	1,88	0,16	1,13	2,52 ± 0,24 ^{ab}	5,78 ± 0,04 ^a	32,36	10
		20	9,68	2,48	2,01	0,11	1,55	1,97 ± 0,30 ^{ab}	5,87 ± 0,06 ^a	41,31	15
♀	MSG	8	12,66	3,46	2,40	0,49	1,45	4,74 ± 0,62 ^{ab}	80,87 ± 4,49 ^c	32,37	27
		20	9,90	2,94	2,32	0,22	2,09	9,37 ± 1,49 ^c	103,80 ± 10,13 ^c	51,93	15
	NaCl	8	9,87	2,07	1,46	0,27	1,33	1,52 ± 0,29 ^{ab}	5,79 ± 0,04 ^a	26,98	20
		20	8,75	2,14	1,49	0,27	1,42	0,59 ± 0,16 ^b	5,97 ± 0,14 ^a	34,30	11
	bez	8	7,79	1,84	1,26	0,26	0,85	ND	5,80 ± 0,02 ^a	25,10	5
		20	9,32	2,37	1,84	0,30	1,06	1,55 ± 0,14 ^{ab}	5,94 ± 0,11 ^a	32,50	15

^{a,b,c,d} skupiny s různým písmenem se od sebe statisticky významně liší ($p < 0,05$)

Glc (glukosa), TC (celkový cholesterol), HDL (HDL cholesterol), LDL (LDL cholesterol), TAG (triacylglyceroly), ND (nestanoveno kvůli nedostatku vzorku)

5.2. Aktivita a exprese glutathionperoxidasy

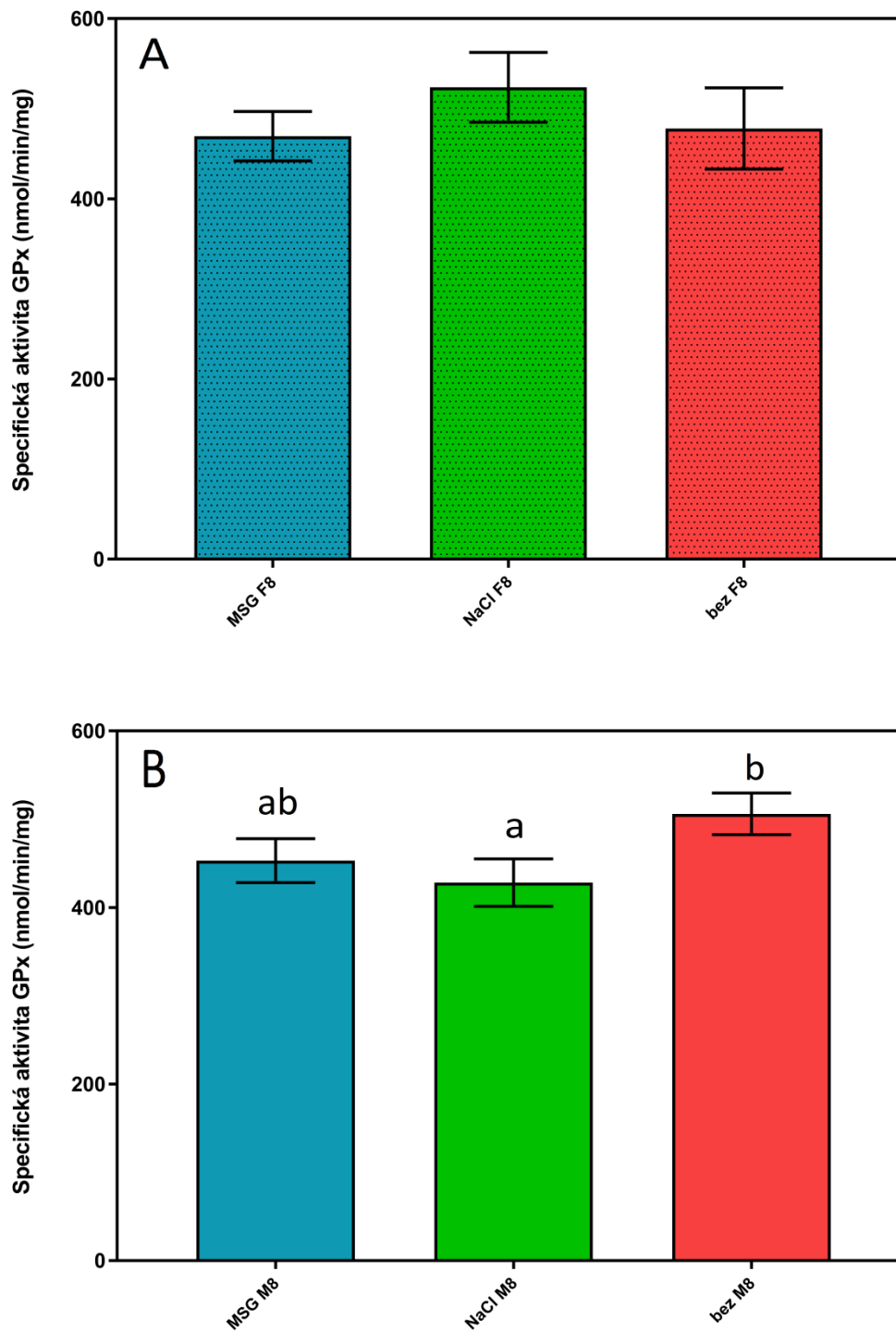
Stanovení specifické aktivity GPx

Ke stanovení specifické aktivity enzymu GPx jsem používala spektrofotometrickou metodu založenou na reakci *t*-butylhydroperoxidu s redukováným glutathionem, při které vzniká GSSG. Oxidovaný glutathion je průběžně zpět redukován zpět na GSH působením enzymu GR. Při této reakci dochází k oxidaci NADPH a tím i k poklesu absorbance, kterou jsem měřila. Z naměřené absorbance jsem vypočítala specifickou aktivitu GPx, kterou jsem zpracovala do grafů. K porovnání výsledků jsem využila statistickou metodu (nepárový t-test).

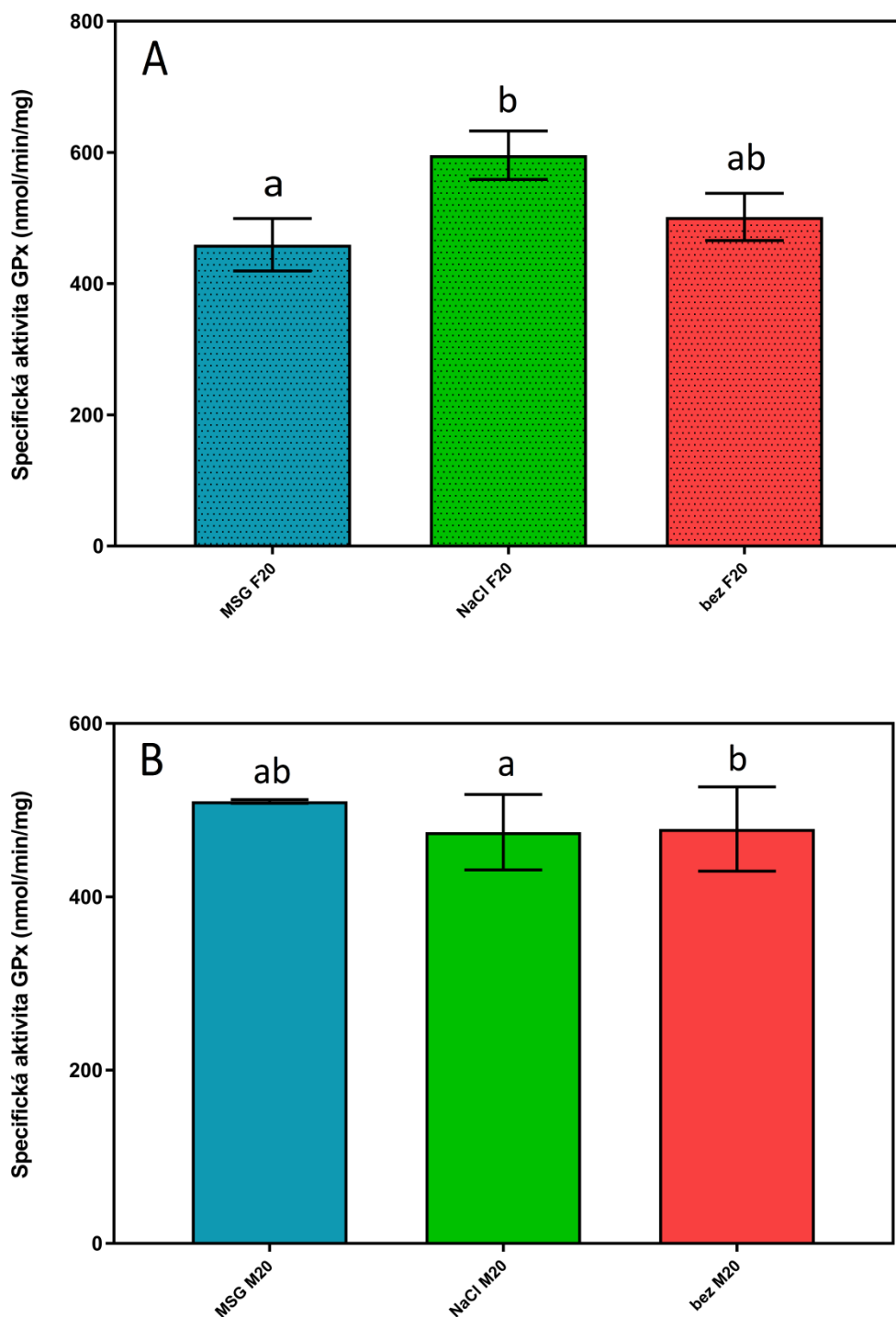
Porovnávala jsem mezi sebou specifické aktivity GPx nejprve ve skupinách podle **patologického stavu** u samic stejného věku a u samců stejného věku. Zjistila jsem, že ve skupině osmitýdenních samic se specifická aktivita dle patologie významně nelišila (Obr. 19, panel A), zatímco u osmitýdenních samců jsem zaznamenala jeden signifikantní rozdíl. Skupina NaCl M8 měla v porovnání se skupinou neovlivněných osmitýdenních samců významně nižší specifickou aktivitu GPx (Obr. 19, panel B). Ve skupinách dvacetitýdenních myší jsem zaznamenala signifikantní rozdíly pouze u samic. U samic se lišila skupina MSG F20 x NaCl F20 a také NaCl F20 x bez F20 (Obr. 20., panel A).

Dále jsem aktivitu GPx porovnávala **podle věku**. U samic se významně nelišila žádná z porovnávaných skupin (Obr. 21., panel A), u samců jsem zjistila signifikantní rozdíl mezi skupinou obézních myší, kdy s věkem se aktivita GPx zvyšovala (Obr. 21., panel B).

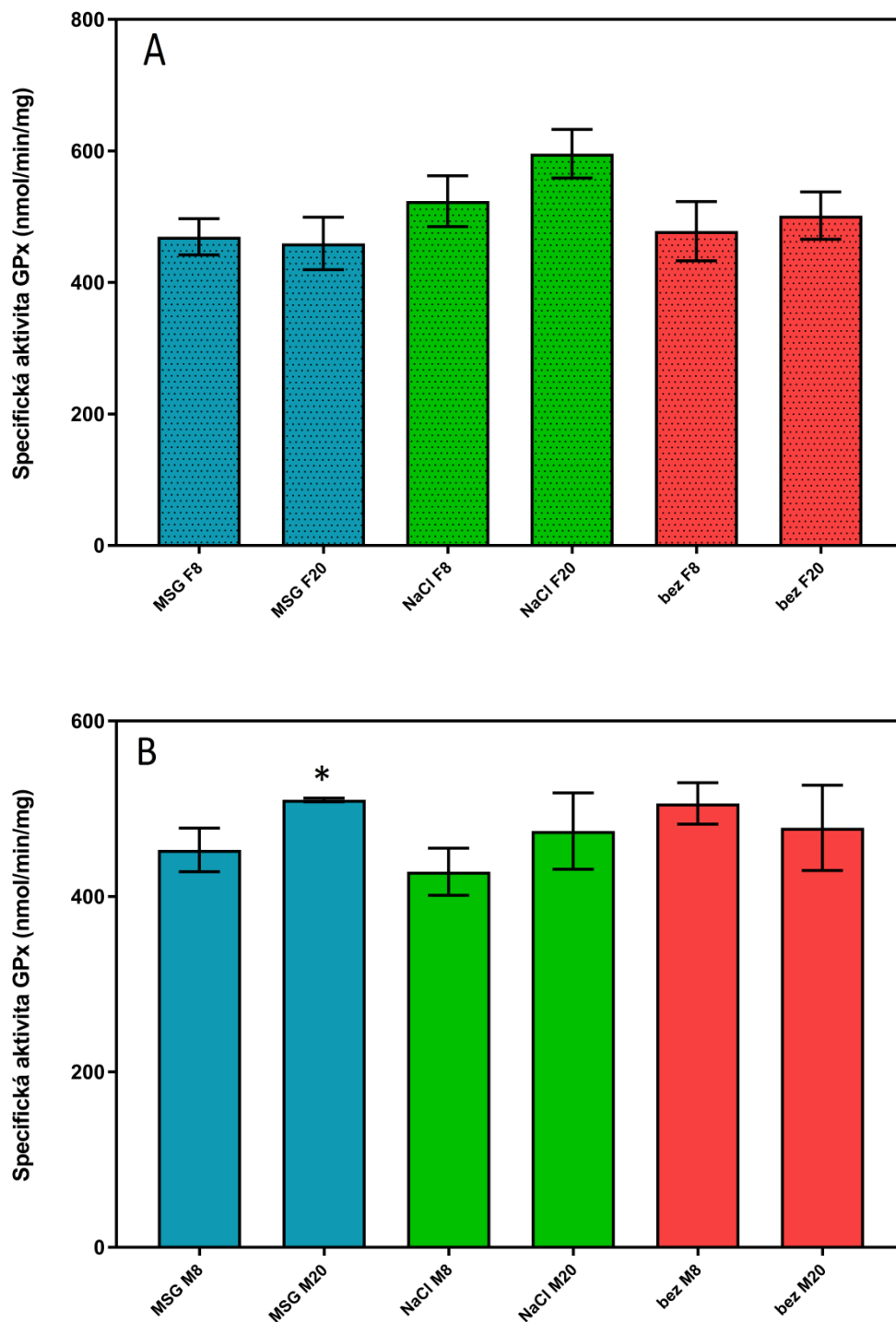
Posledním sledovaným kritériem bylo **pohlaví**. Ve skupině osmitýdenních myší se statisticky významně lišila skupina NaCl M8, kdy mladí samci měli významně nižší aktivitu GPx než samice stejného věku a patologického stavu (Obr. 22., panel A). Tento signifikantní rozdíl zůstal i u starších myší, kdy jsem zaznamenala opět nižší aktivitu GPx u skupiny NaCl M20 oproti skupině NaCl F20 (Obr. 22., panel B).



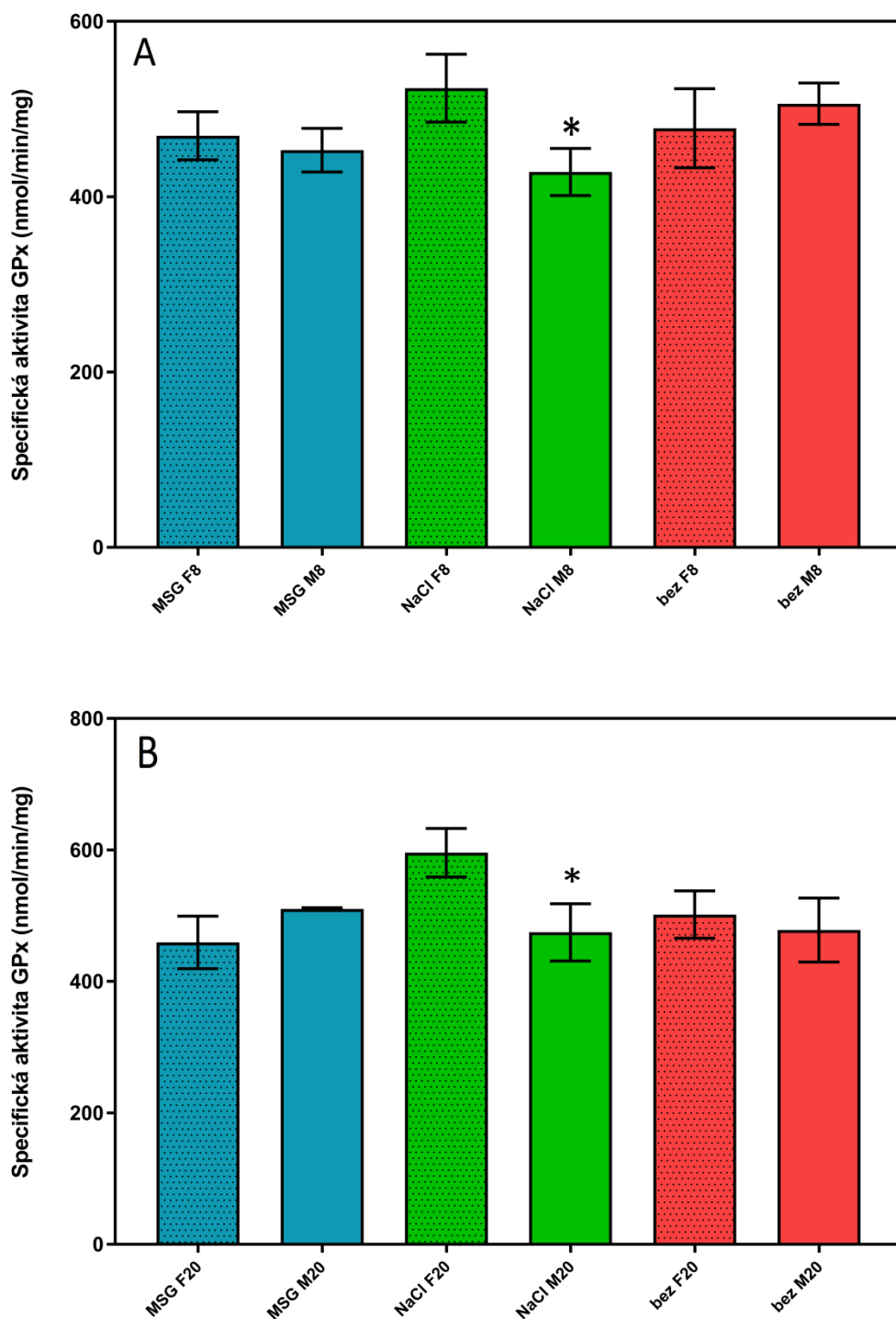
Obr. 19. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathionperoxidasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 8 týdnů. Novorozelým myši byl s.c. aplikován MSG (rozvoj obezity) nebo NaCl nebo nedostávaly nic (bez). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 3$. Skupiny s různými písmeny se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).



Obr. 20. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathionperoxidasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 20 týdnů. Novorozelým myším byl s.c. aplikován MSG (rozvoj obezity) nebo NaCl nebo nedostávaly nic (bez). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 3$. Skupiny s různými písmeny se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).



Obr. 21. Vliv věku na specifickou aktivitu glutathionperoxidasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 a 20 týdnů. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD, kde $n = 3$. Skupiny stejné barvy označené * se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).

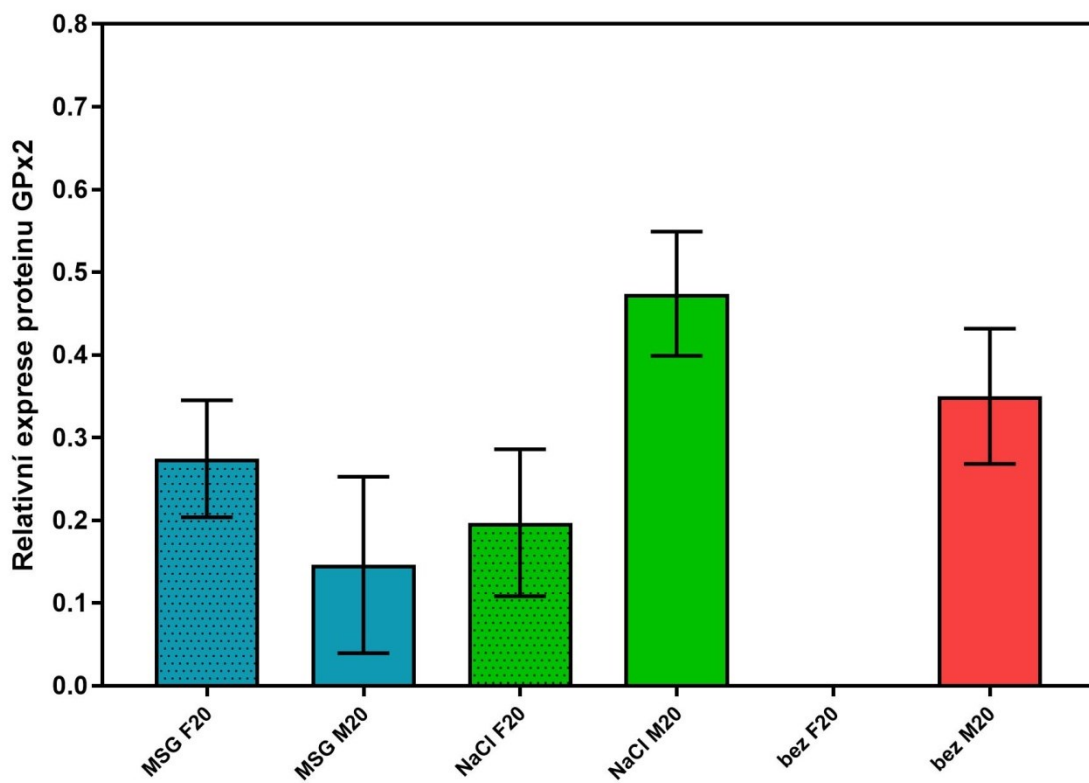
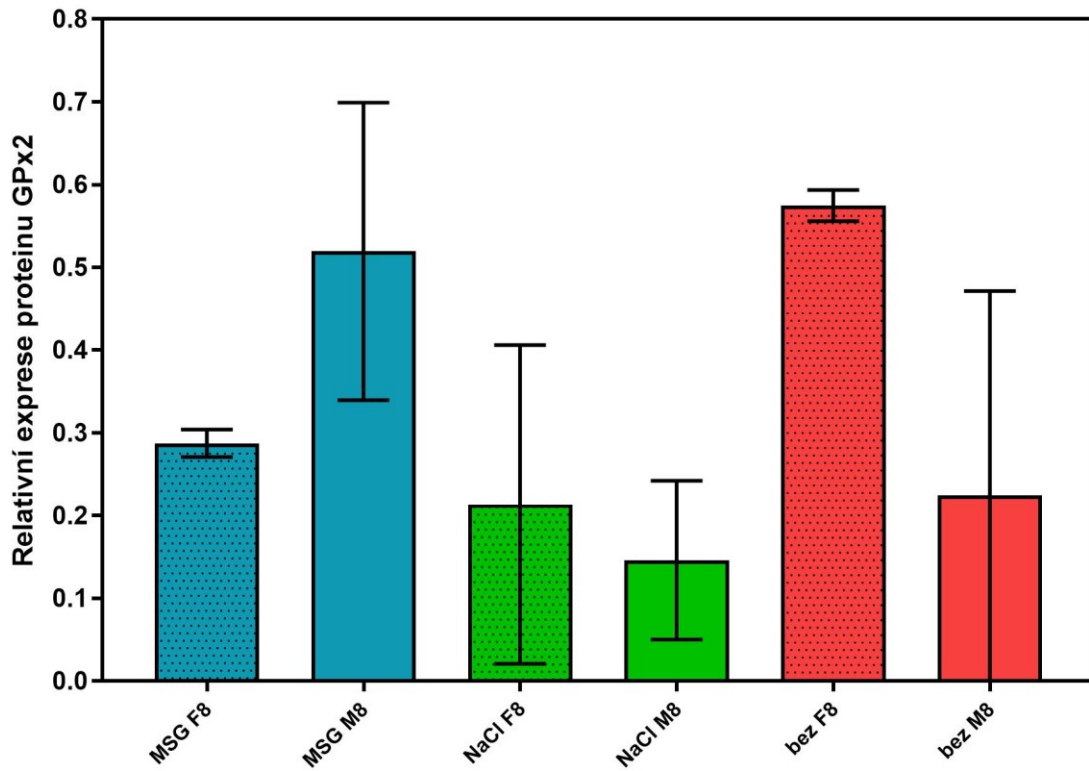


Obr. 22. Vliv pohlaví na specifickou aktivitu glutathionperoxidasy v jaterním cytosolu myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 týdnů (panel A) a 20 týdnů (panel B). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 3$. Skupiny stejné barvy označené * se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).

Stanovení proteinové exprese GPx

Proteinovou expresi GPx jsem zjišťovala metodou SDS-PAGE s následným imunoblottingem za použití primární protilátky proti GPx2. Zjištěné množství GPx2 jsem vztáhla na množství β -aktinu, který slouží jako kontrola nanášeného množství cytosolických bílkovin („*loading control*“).

Z výsledků je patrné, že v relativní expresi GPx2 jsou mezi **pohlavími** velké rozdíly. Ve skupinách mladých MSG myši mají o 45 % vyšší expresi GPx2 samci, naopak v kontrolních skupinách mají vyšší expresi tohoto enzymu samice. Osmítýdenní samice bez léčby mají expresi GPx2 2,5-krát zvýšenou než samci stejného věku a patologického stavu, ale díky velké variabilitě dosažených výsledků není tento rozdíl statisticky významný. Ve skupinách starých myši mají expresi GPx2 o více jak 50 % vyšší samice, ve skupině NaCl naopak výrazně vyšší samci. U dvacetitýdenních samic bez léčby se mi ani při jednom z pokusů proužek bohužel neobjevil, takže tuto skupinu nemohu porovnat. Zřejmě došlo k precipitaci proteinu ve vzorku. **S věkem** se exprese GPx2 ve skupinách MSG a NaCl myši měnila nejvíce u samců, kdy výrazně klesala (ve skupině MSG o 72 %). Stárnutí mělo opačný vliv ve skupině NaCl samců, kde exprese GPx2 3,2-krát vzrostla. U samic jsem výrazné rozdíly s věkem nezaznamenala. Porovnáním **patologického stavu** jsem zjistila nejvyšší expresi GPx2 u neovlivněných osmitýdenních samic, která byla oproti MSG skupině o 50% vyšší a tento rozdíl byl statisticky významný. Naopak u samců jsem zjistila o 57 % vyšší hodnoty ve skupině osmitýdenních MSG myši oproti myším bez léčby stejného věku a pohlaví.



Obr. 23. Relativní exprese GPx2 v játrech osmítýdenních (panel A) a dvacetitýdenních (panel B) myši obou pohlaví ze skupin MSG, NaCl a neovlivněných.

5.3. Aktivita a exprese glutathionreduktasy

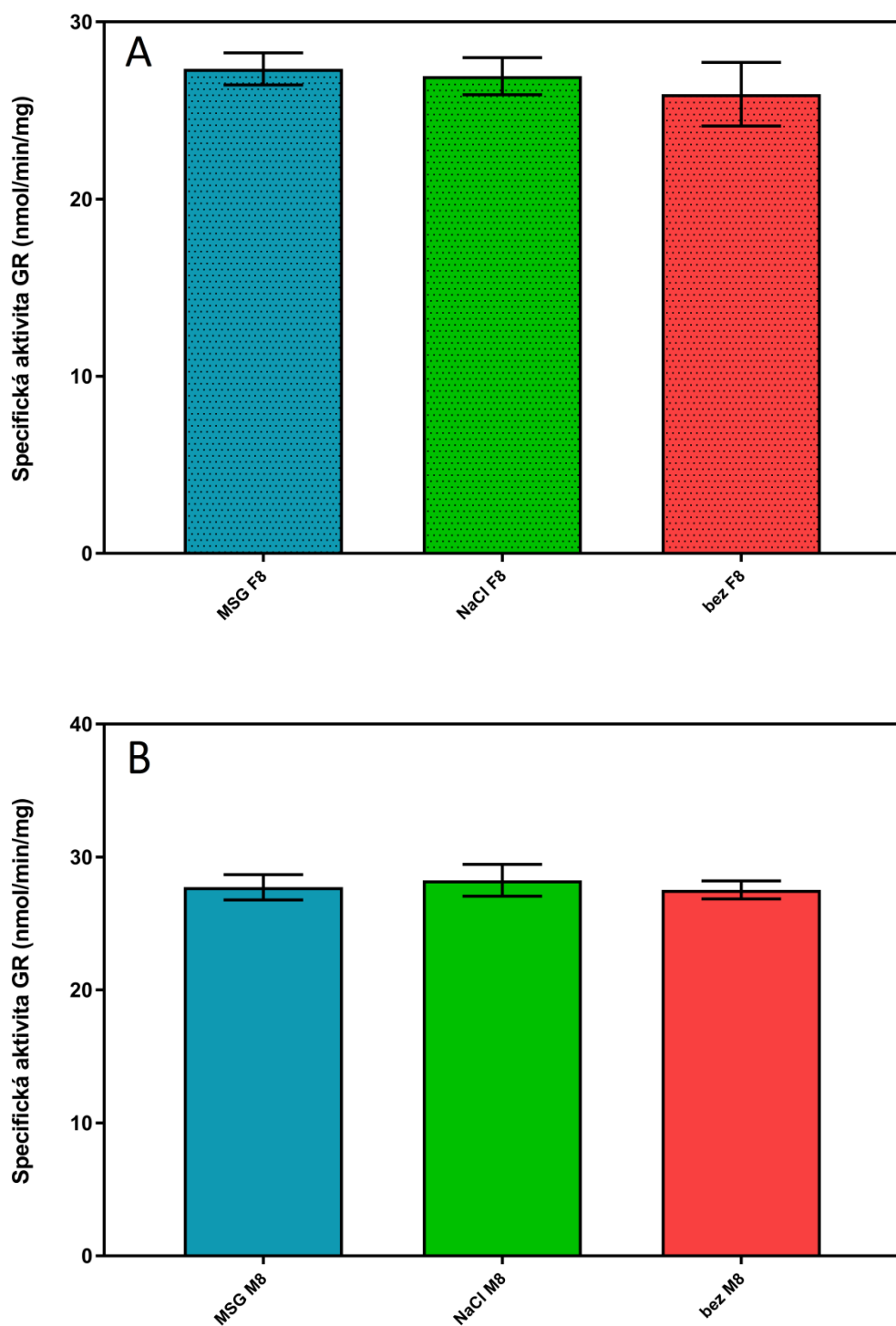
Stanovení specifické aktivity GR

Ke stanovení aktivity GR jsem používala spektrofotometrickou metodu založenou na reakci, kdy se mění GSSG na GSH za současné oxidace substrátu NADPH. Spotřeba substrátu se projevila jako lineární růst absorbance. Z naměřených hodnot jsem s použitím hodnot koncentrace bílkovin spočítala specifickou aktivitu.

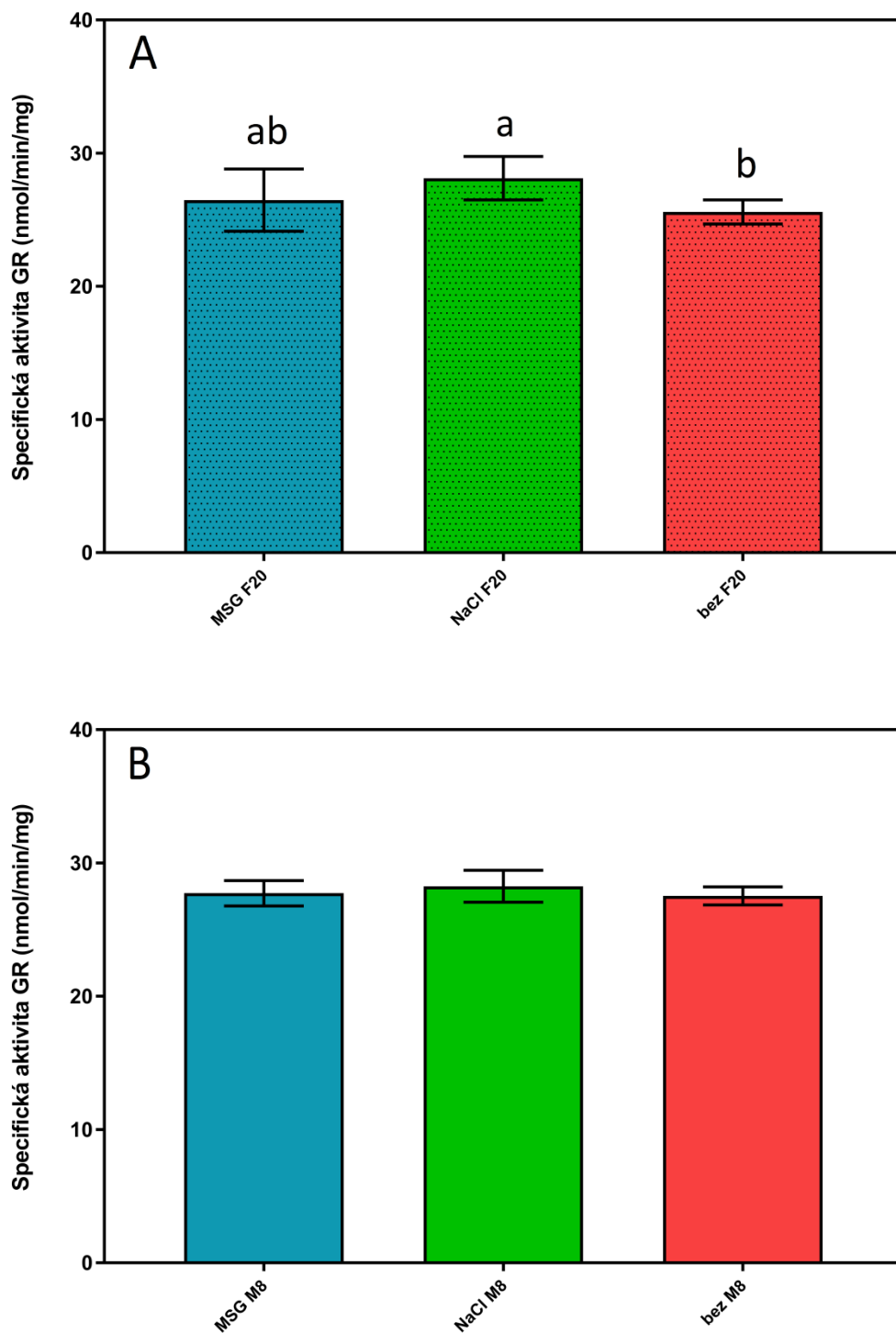
Měření jsem opakovala čtyřikrát a pokaždé jsem každý vzorek pipetovala ve čtyřech paralelkách. Mnoho statisticky významných rozdílů jsem v aktivitě GR nezjistila. Nejprve jsem hodnoty porovnávala ve skupinách myší rozdělených podle **patologického stavu**. Ve skupině mladých samic (Obr. 24., panel A) a také ve skupině mladých samců (Obr. 24., panel B) se specifická aktivita enzymu GR signifikantně nelišila. U dvacetitýdenních myší jsem zjistila rozdíl ve skupině neovlivněných samic oproti osmolální kontrole (NaCl F20 x bez F20, Obr. 25., panel A). Myší samice ze skupiny NaCl F20 měly vyšší hodnoty specifické aktivity GR než samice bez léčby. Mezi dvacetitýdenními samci jsem při porovnání podle patologického stavu žádné významné rozdíly nenašla (Obr. 25., panel B).

Dále jsem aktivitu GR porovnávala **dle věku**. Na Obr. 26. jsou znázorněny grafy vypočítaných specifických aktivit u samic (panel A) a samců (panel B). Zjistila jsem, že věk nemá na specifickou aktivitu GR žádné ze zkoumaných skupin myší vliv.

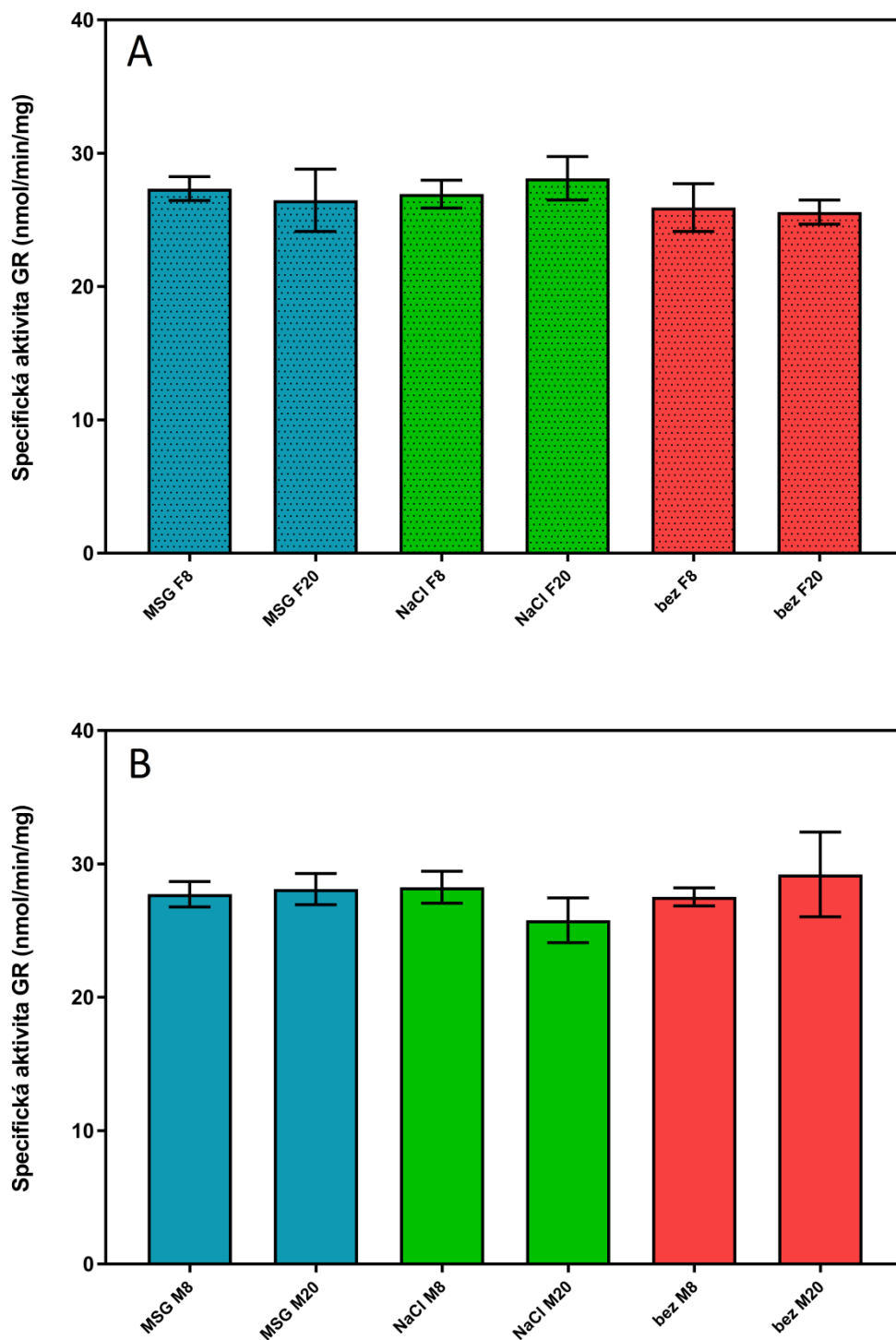
Při srovnání výsledků **podle pohlaví** pokusných myší jsem zjistila, že mezi osmitýdenními myšmi není v aktivitě GR významný rozdíl (Obr. 27., panel A). Ve skupinách dvacet týdnů starých myší, jsem našla statisticky významný rozdíl mezi skupinami bez léčby. Samice ze skupiny bez F20 měly nižší specifickou aktivitu GR než stejně staří neovlivnění samci (Obr. 27., panel B).



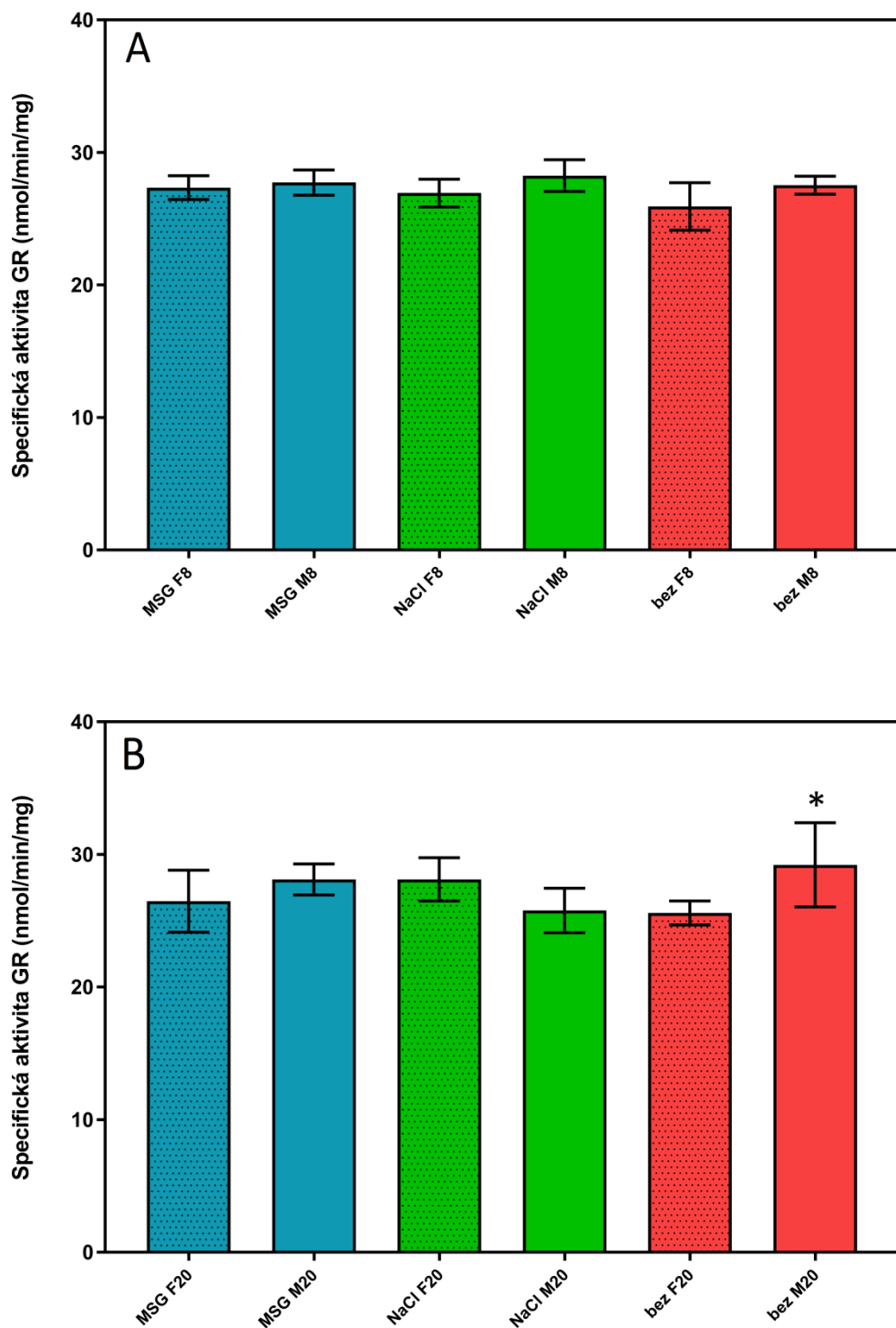
Obr. 24. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathionreduktasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 8 týdnů. Novorozeným myším byl s.c. aplikován MSG (rozvoj obezity) nebo NaCl nebo nedostávaly nic (bez). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 4$. Skupiny s různými písmeny se mezi sebou významně liší ($P < 0,05$).



Obr. 25. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathionreduktasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 20 týdnů. Novorozelým myším byl s.c. aplikován MSG (rozvoj obezity) nebo NaCl nebo nedostávaly nic (bez). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 4$. Skupiny s různými písmeny se mezi sebou významně liší ($P < 0,05$).



Obr. 26. Vliv věku na specifickou aktivitu glutathionreduktasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 a 20 týdnů. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 4$. Skupiny stejné barvy označené * se mezi sebou významně liší ($P < 0,05$).

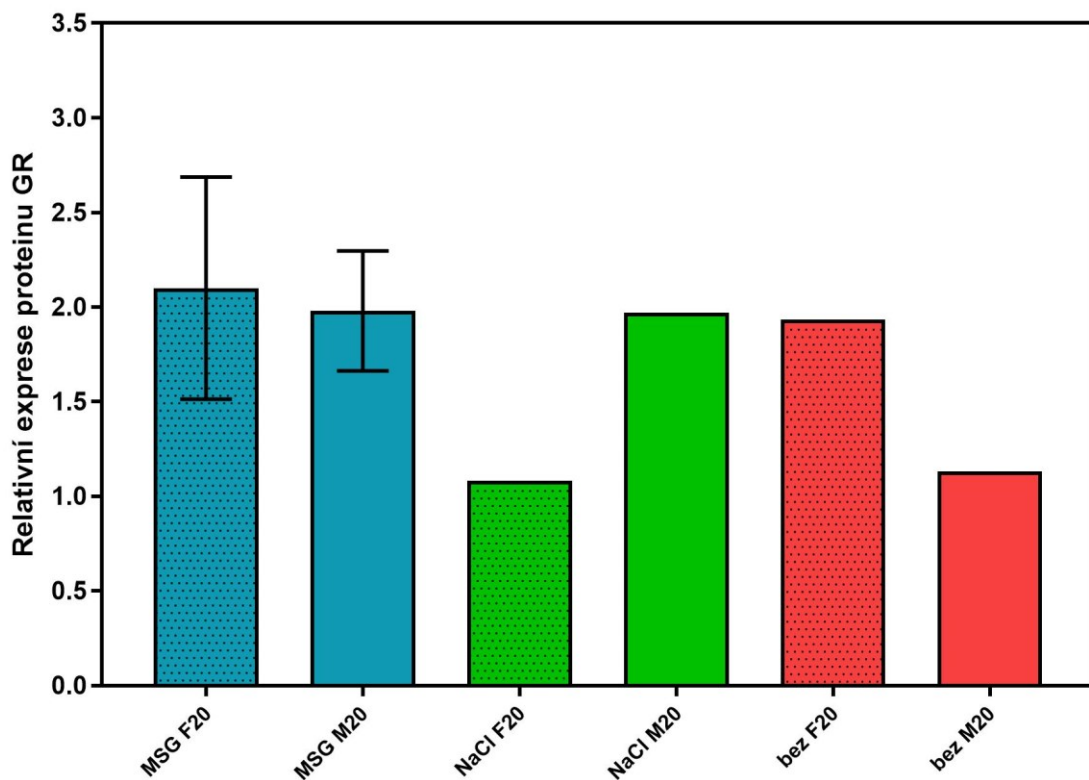
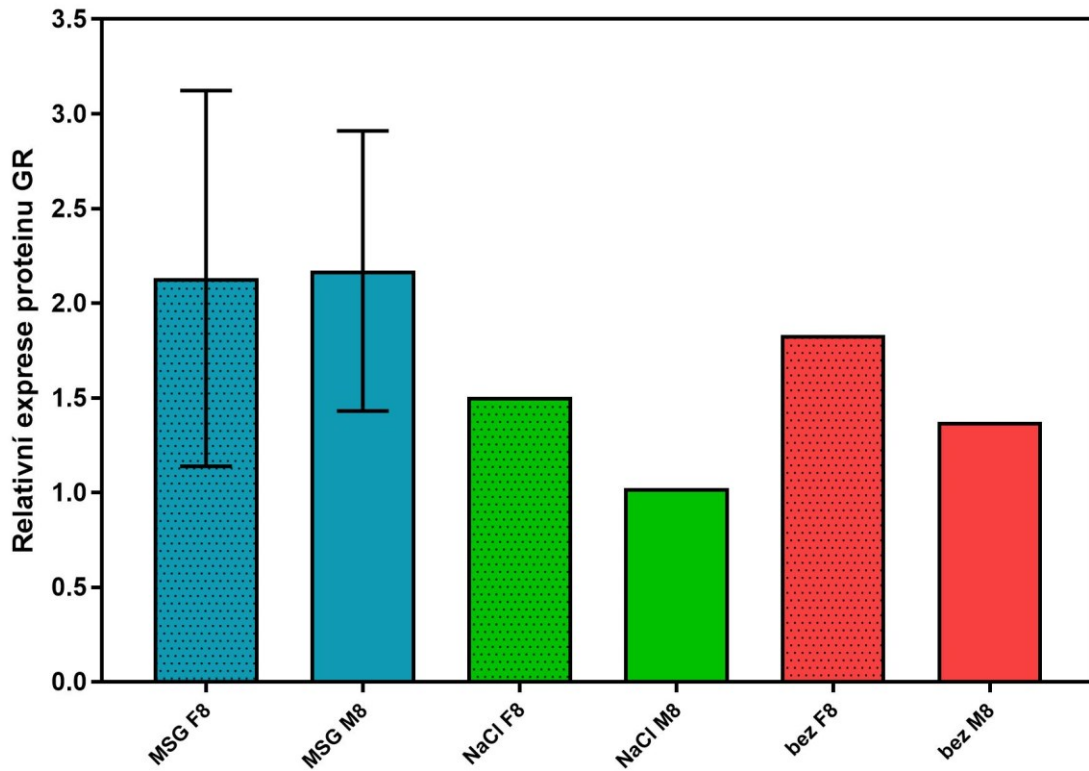


Obr. 27. Vliv pohlaví na specifickou aktivitu glutathionreduktasy v jaterním cytosolu myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 týdnů (panel A) a 20 týdnů (panel B). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 4$. Skupiny stejné barvy označené * se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).

Stanovení proteinové exprese GR

Expresi GR jsem zjišťovala pomocí SDS-PAGE s následným imunoblottingem za použití primární protilátky proti GR. Zjištěné množství GR jsem vztáhla na množství β -aktinu. Statisticky hodnotit jsem mohla pouze skupinu MSG myši (obě pohlaví a věk), protože u skupin NaCl a bez léčby se podařilo stanovit expresi GR jen jednou.

Zjistila jsem, že s **věkem** se relativní exprese GR většinou měnila jen mírně. Téměř vůbec se relativní exprese GR nezměnila u myši bez léčby obou pohlaví, naopak nejvíce (o 28 %) klesla ve skupině NaCl samic a ve skupině NaCl samců vzrostla o 93 %. Při porovnání skupin podle **pohlaví** jsem zjistila, že samci mají o trochu nižší expresi GR oproti samicím, kromě skupiny starých NaCl myši, kde mají naopak samci expresi GR o 82 % vyšší. Zajímavé je, že jsem našla výraznější odlišnosti při srovnání podle **patologického stavu** a to hlavně u mladších myši. Z obrázku 28. je patrné, že mladé MSG myši mají relativní expresi GR oproti oběma kontrolním skupinám vyšší o 14 – 53 %.



Obr. 28. Relativní exprese GR v játrech osmitýdenních (panel A) a dvacetitýdenních (panel B) myši obou pohlaví ze skupin MSG, NaCl a neovlivněných.

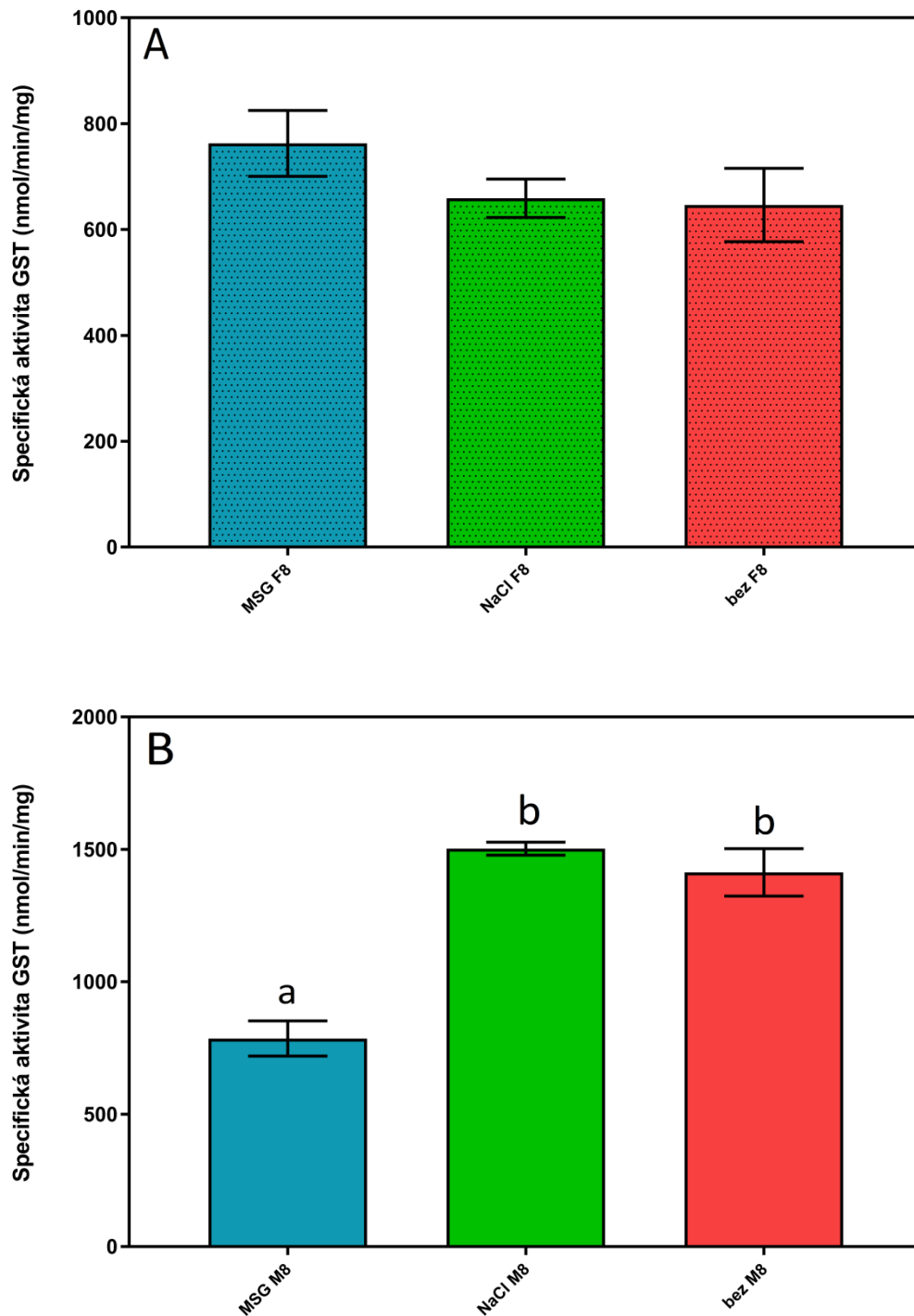
5.4. Specifická aktivita glutathion-S-transferasy

Specifickou aktivitu GST jsem stanovovala spektrofotometrickou metodou, při které GST katalyzuje vznik konjugátu S-2,4-dinitrofenylglutathionu z CDNB a GSH. Po dobu 6 minut jsem měřila nárůst absorbance vznikajícího konjugátu. Specifickou aktivitu jsem poté vypočítala vztahem aktivity na množství proteinu ve vzorku.

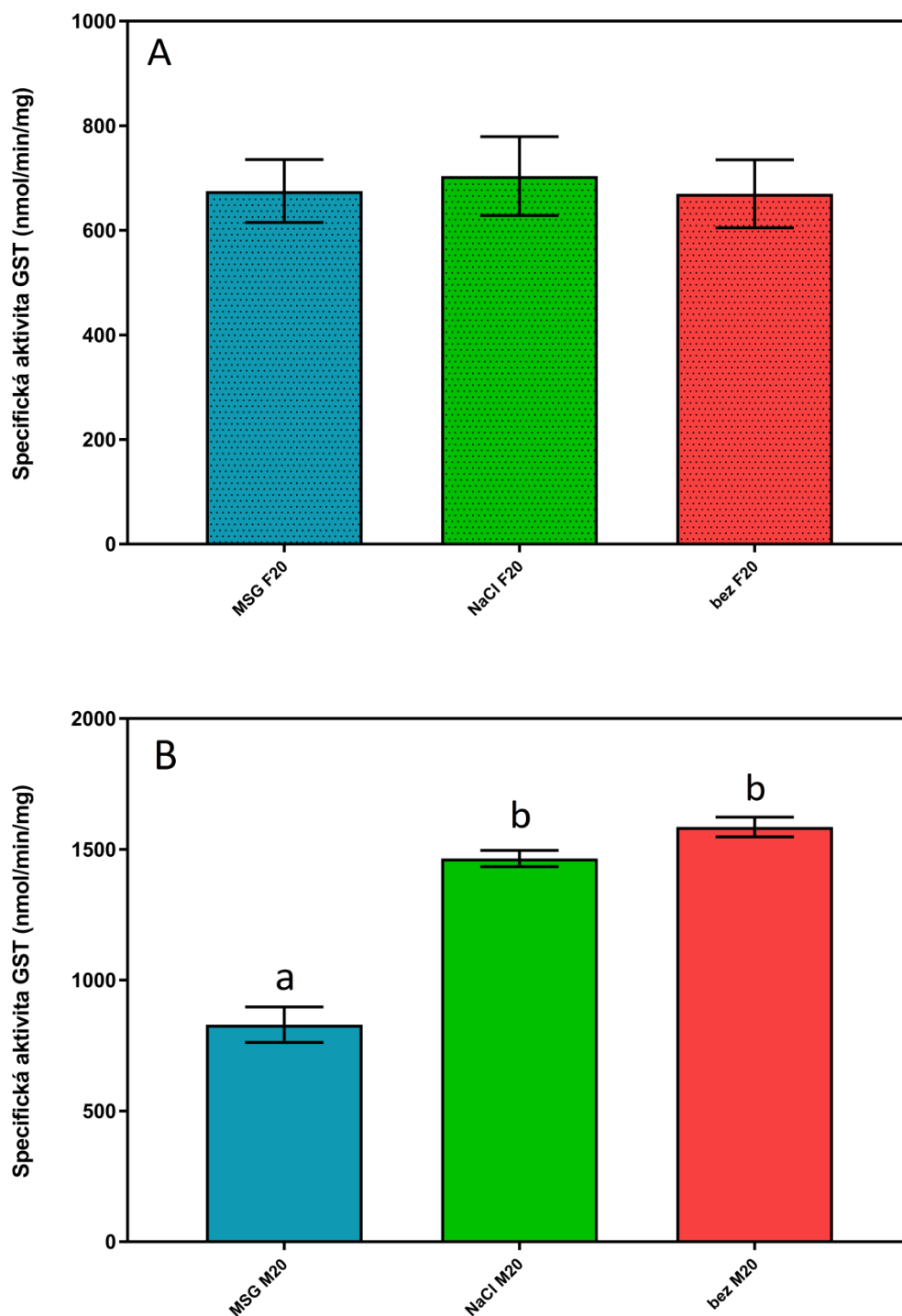
Vypočítané hodnoty specifické aktivity jsem porovnávala nejprve dle **patologického stavu**, kde ve skupinách mladých samic (Obr. 29., panel A) jsem signifikantní rozdíly nezjistila. Skupiny mladých samců (Obr. 29., panel B) se dle patologického stavu lišily (MSG M8 x NaCl M8 a také MSG M8 x bez M8). Navozený patologický stav u samců specifickou aktivitu o více než polovinu snižoval. Skupiny dvacetitýdenních samic byly bez rozdílu (Obr. 30., panel A), zatímco samci se opět lišili (Obr. 30., panel B). Samci ze skupiny MSG M20 měli stále asi o polovinu nižší hodnoty specifické aktivity GST než stejně staří samci, kteří dostávali roztok NaCl a také než stejně staří samci bez léčby.

Při porovnání **podle věku** jsem zjistila, že u samic (Obr. 31., panel A) nejsou ve specifické aktivitě GST výrazné rozdíly. Ve skupinách samců (Obr. 31., panel B) se signifikantně lišila skupina mladých samců bez léčby od starších samců bez léčby, kdy s věkem aktivita GST mírně vzrostla.

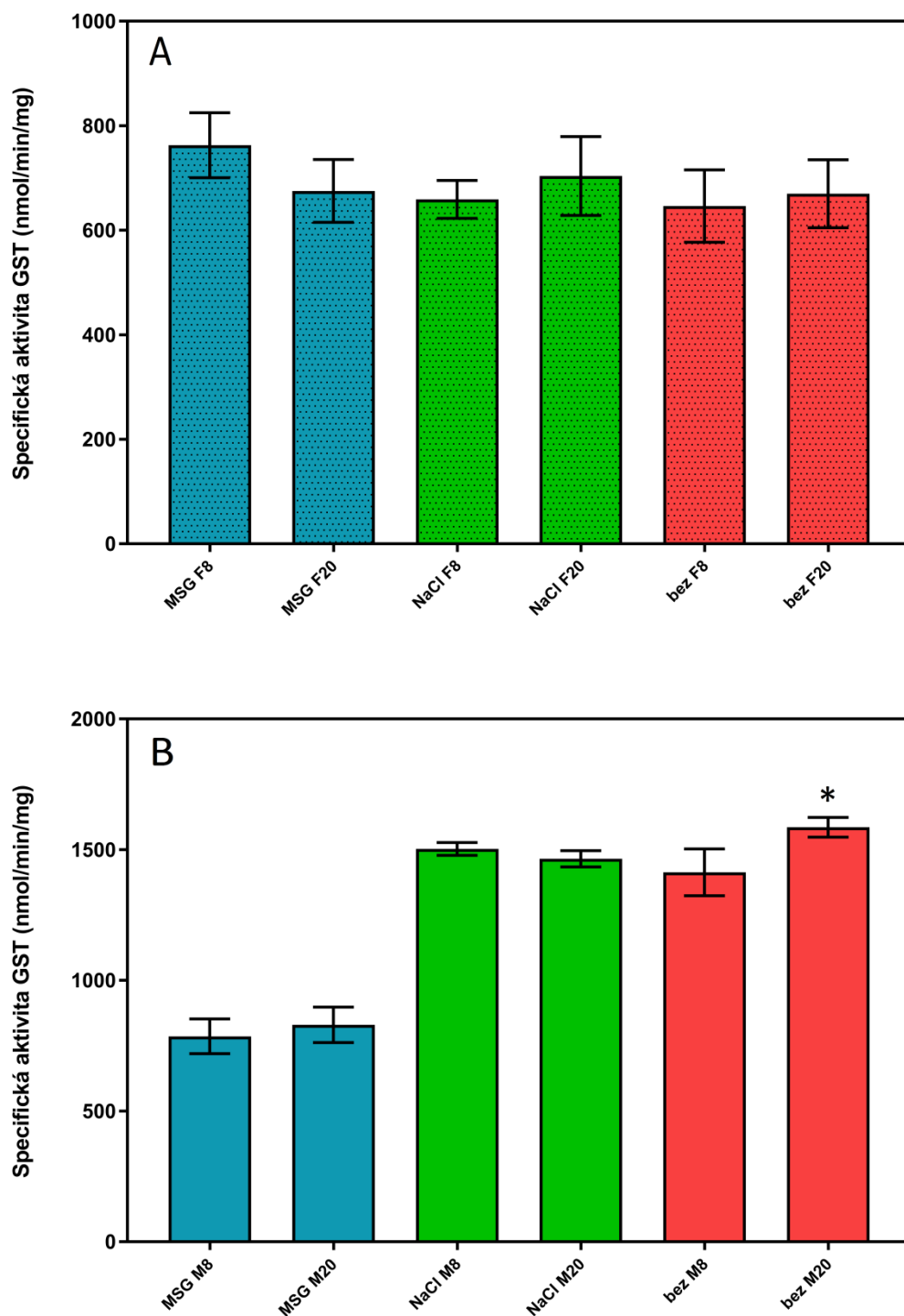
Nakonec jsem skupiny porovnávala ještě **podle pohlaví**. Na Obr. 32., panelu A, je dobře vidět, že osmitýdenní samci kontrolních skupin měli více než 2x vyšší aktivitu GST než stejně staré samice (NaCl F8 x NaCl M8, bez F 8, bez M8). Ve skupinách dvacetitýdenních myší (Obr. 32., panel B) se lišily všechny vzorky. Skupina ovlivněných myší MSG M20 měla mírně zvýšenou aktivitu oproti skupině MSG F20, skupiny NaCl F20 x NaCl M20 a také bez F20 a bez M20 se lišily asi o polovinu.



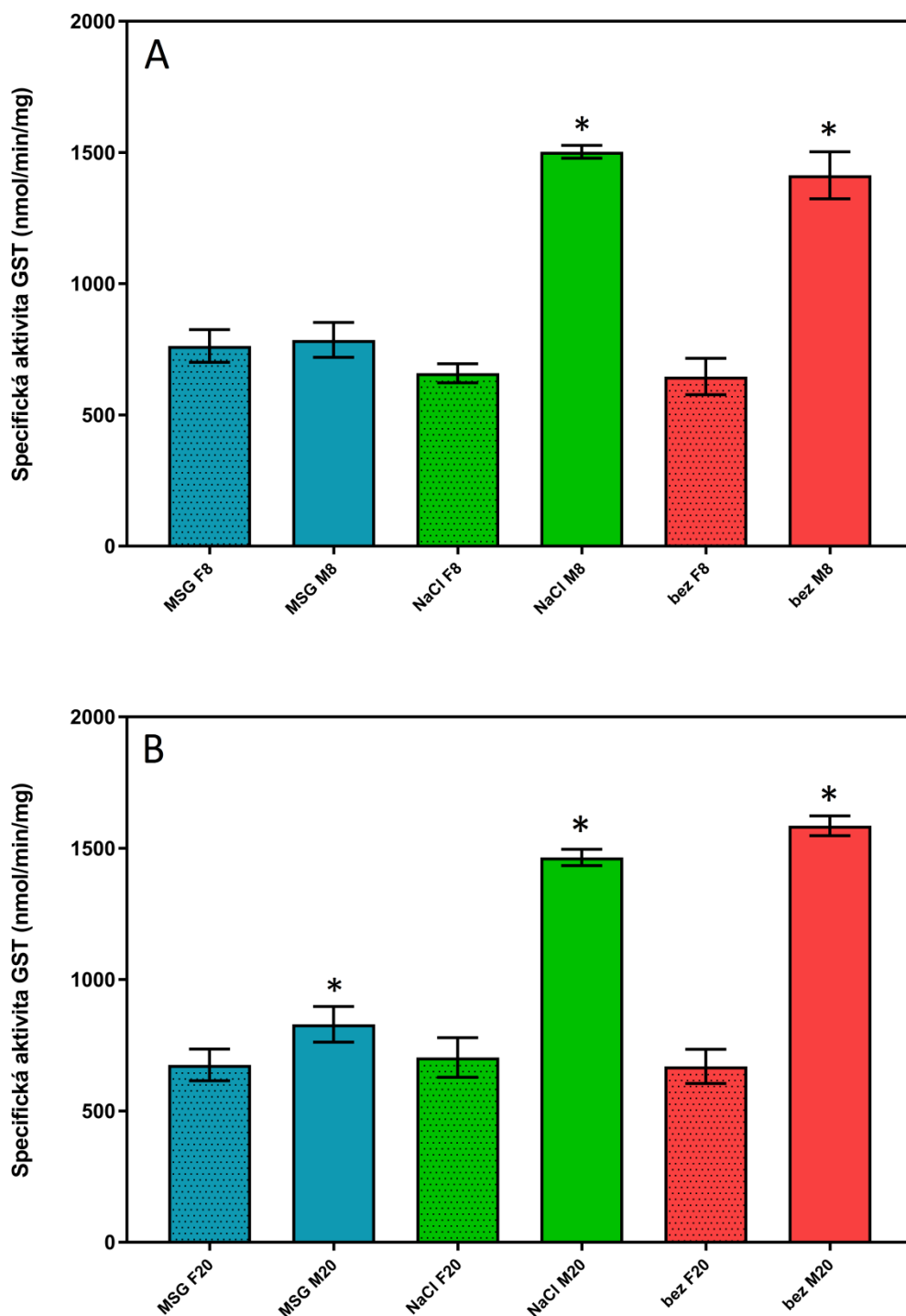
Obr. 29. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 8 týdnů. Novorozeným myším byl s.c. aplikován MSG (rozvoj obezity) nebo NaCl nebo nedostávaly nic (bez). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 5$. Skupiny s různými písmeny se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).



Obr. 30. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 20 týdnů. Novorozelým myším byl s.c. aplikován MSG (rozvoj obezity) nebo NaCl nebo nedostávaly nic (bez). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 5$. Skupiny s různými písmeny se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).



Obr. 31. Vliv věku na specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 a 20 týdnů. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, kde $n = 5$. Skupiny stejné barvy označené * se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).



Obr. 32. Vliv pohlaví na specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy v jaterním cytosolu myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 týdnů (panel A) a 20 týdnů (panel B). Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD, kde n = 5. Skupiny stejné barvy označené * se mezi sebou signifikantně liší ($P < 0,05$).

6. Diskuze

Cílem této práce bylo zjistit, jestli se mění aktivita a proteinová exprese vybraných enzymů (GPx, GR, GST) v závislosti na navozeném patologickém stavu (obezita), věku a pohlaví pokusných myší. Podle patologického stavu byly vytvořeny 3 základní skupiny myší - MSG myši s chemicky navozenou obezitou a 2 kontrolní skupiny - NaCl myši a neovlivněné myši. Jednotlivé skupiny myší jsem dále rozdělila do podskupin podle věku (8 týdnů a 20 týdnů) a pohlaví. Aktivity enzymů jsem měřila v cytosolické frakci z jater pokusných zvířat. Z naměřených výsledků jsem vypočítala u každého enzymu aktivitu a přepočítla ji vztažením na množství bílkoviny ve vzorku na specifickou aktivitu. Výsledky jsem statisticky zhodnotila a vynesla do grafů. Proteinovou expresi studovaných enzymů jsem stanovila pomocí imunoblottingu a vztáhla jsem ji na proteinovou expresi β -aktinu, což je konstitutivně exprimovaný protein, který se používá pro kontrolu nanášení vzorků.

Aktivita a exprese jaterních biotransformačních enzymů může být významně ovlivněna věkem, pohlavím, genetickými faktory, výživou a patofyziologickými podmínkami (Vyskočilová et al. 2013).

Obezita a stavy s ní spojené, jako insulinová resistance, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidemie, jaterní steatóza, označované jako metabolický syndrom, představují v současnosti hlavní výzvy pro vědu a klinický výzkum (Buettner et al. 2007). Pro studium se používají různé zvířecí modely. V této práci bylo použito myší s chemicky navozenou centrální obezitou. U novorozených myší, kterým je opakovaně s.c. podáván MSG, dojde k vytvoření lézí v jádře *nucleus arcuatus* v hypothalamu, čímž se naruší leptinová a insulinová signalizace. U takto připraveného zvířecího modelu se rozvíjí obezita a to i přesto, že zvířata přijímají méně potravy. K rozvoji obezity dochází zpomalením metabolismu a následným zvýšením podílu tukové tkáně. *Nucleus arcuatus* je u těchto myší menší, což naruší produkci somatoliberinu a díky tomu se zkrátí délka těla i ocasu a hypofýza, gonády a optické nervy atrofují (Olney 1969). Kromě obezity slouží tento model také k výzkumu diabetu mellitu 2. typu a nealkoholické jaterní steatohepatitidy (Sasaki et al. 2009, Matoušková et al. 2015).

U lidí se obezita měří nejčastěji pomocí indexu tělesné hmotnosti (BMI). Váha v normálním rozmezí odpovídá hodnotě BMI od 18 do 24,9 kg/m³, nadváha v rozmezí 25-29,9 kg/m³ a obezita je charakterizována hodnotami BMI nad 30 kg/m³. Stav, kdy jsou hodnoty BMI přes 40 kg/m³ nebo přes 35 kg/m³ s přidruženými komorbiditami je nazýván těžká (morbidní) obezita (Fobi 2004). Prevalence obezity celosvětově významně roste. U obézních jedinců dochází ke zvýšení množství reaktivních forem kyslíku (ROS). Zvýšení ROS může souviset také se sníženou celkovou antioxidační kapacitou buňky (Matoušková et al. 2015). Množství těchto reaktivních molekul se zvyšuje nejen u obézních jedinců, ale například také během stárnutí a je tedy zajímavé v rámci této práce mít myši rozdělené nejen podle patologického stavu, ale i podle věku a pohlaví (možné ovlivnění pohlavními hormony).

Jedním z primárních intracelulárních antioxidantů je GSH, který se však podílí také na metabolismu živin a regulaci buněčných dějů (např. genové expresi, syntéze DNA a proteinů, buněčné proliferaci a apoptose, signální transdukci, produkci cytokinů a imunitní odpovědi) (Wu et al. 2004). V reakcích katalyzovaných selen-dependentními GPx nebo selen-independentními GPx jsou peroxid vodíku či lipidové hydroperoxydy redukovány na vodu a odpovídající alkoholy, zatímco GSH je oxidován na GSSG. Regenerace GSH je zajištěna enzymem GR, která katalyzuje redukcí GSSG zpět na GSH za spotřeby NADPH. Správná funkce tohoto enzymu je tedy závislá na aktivitě pentosového cyklu (Hamburg et al. 1994). Deficit GSH vede ke zvýšení míry oxidačního stresu, který se významnou měrou podílí na stárnutí organismu a patogenezi celé řady onemocnění (např. neurodegenerativní onemocnění, srpkovitá anemie, cystická fibrosa, nádorová onemocnění, diabetes mellitus). Dědičný defekt GPx a defekt tvorby GR se projeví poškozením buněčných membrán s následnou hemolytickou anemií (Halliwell a Gutteridge 2015).

Specifické aktivity enzymů GPx a GR jsem z hlediska **patologického stavu** porovnávala u obézních myší a u dvou kontrol, osmolální a neovlivněné. U enzymu **glutathionperoxidasy** jsem žádné statisticky významné rozdíly ve **specifické aktivitě** oproti kontrolám nenašla. Zatímco Matoušková et al. (2015) zjistila u myších samců s MSG obezitou aktivitu GPx v jaterním cytosolu signifikantně nižší oproti kontrole (a naopak v tenkém střevě aktivitu GPx u obézních výrazně zvýšenou). Tento rozdíl může být způsobený odlišným stářím myší. Ve svých experimentech jsem používala myši staré 8 a 20 týdnů, zatímco v práci Matouškové et al. (2015) byly použity myši

staré 8 měsíců. Rovněž Mendes et al. (2018) nezaznamenala žádné změny ve specifické aktivitě antioxidantních enzymů u myších samců kmene C57BL/6 krmených 16 týdnů vysokotukovou dietou. V modelu nediabetických KKAY myší (7 týdnů staré) a diabetických KKAY myší (13 týdnů staré) byla aktivita GPx v játrech a v kosterních svalech stejná jako u kontrolních myší, zatímco v bílé tukové tkáni byla přibližně o čtvrtinu nižší (Furukawa et al. 2004). U pacientů s obezitou a diabetem mellitem 2. typu byla aktivita GPX v červených krvinkách i množství GSH signifikantně snižené oproti kontrole (Picu et al. 2017).

Imunoblottingem jsem zjišťovala **proteinovou expresi** použitím specifické polyklonální protilátky proti GPx2. U obézních samic jsem naměřila expresi nižší a u samců naopak vyšší. Matoušková et al. (2015) zjistila, že obézní myši samci měli nižší množství proteinu GPx2 ve střevním epitelu, zatímco v játrech se pomocí imunoblottingu nepodařilo GPx2 detekovat (genová exprese GPx2 však byla u obézních myší významně zvýšená). Genová i proteinová exprese GPx, GR, superoxiddismutasy a katalasy v játrech myších samců krmených 16 týdnů vysokotukovou dietou byla signifikantně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou, která dostávala standardní dietu (Mendes et al. 2018).

Studovala jsem rovněž vliv navozené obezity na **specifickou aktivitu glutathionreduktasy**. Tento patologický stav aktivitu GR neovlivnil, což je v souladu s výsledky publikovanými Matouškovou et al. (2015), která uvádí, že GR byla v tenkém střevě u obézních myší méně aktivní při porovnání s kontrolou, zatímco v játrech nebyla její aktivita obezitou ovlivněna. Naproti tomu **proteinová exprese GR** byla podle mých výsledků patologickým stavem ovlivněna. Obézní myši měly relativní expresi GR oproti oběma kontrolním skupinám o třetinu až dvě třetiny vyšší. Naproti tomu u myší krmených vysokotukovou dietou byla proteinová exprese GR snižená (Mendes et al. 2018). Patologický stav tedy možná způsobil zvýšení proteinové exprese GR, ale nepromítl se do zvýšení aktivity tohoto enzymu.

Mezi významné enzymy 2. fáze biotransformace, chránící buňky před oxidačním stresem a množstvím toxických chemikálií a metabolitů, patří glutathion-S-transferasy (Matoušková et al. 2015). V **aktivitě glutathion-S-transferasy** jsem zjistila v souvislosti s patologií (tj. navozenou obezitou) významný rozdíl především u samic, kdy specifická aktivita GST významně klesla u skupiny MSG. Toto se shoduje s prací

Matouškové et al. (2015), kde byla také zjištěna u obézních myších samců nižší aktivita GST v játrech. Také Boušová et al. (2017) shodně uvádí, že u obézních myších samců došlo ke snížení aktivity GST v srdci a to dokonce o 51,2 % oproti kontrole. Ve své práci jsem zaznamenala u osmi i dvacetitýdenních obézních samců snížení specifické aktivity GST také přibližně na polovinu. Boušová et al. (2017) také porovnává aktivitu GST v ledvinách u obézních myších samců. Obézní samci měli aktivitu GST v ledvinách vyšší o 31,1 % proti kontrolním myším. Opakované podávání MGS novorozeným myším indukuje nejen obezitu, ale také změny v aktivitě a/nebo expresi GST (Boušová et al. 2017). U obézních lidí byla aktivita GST v erythrocytech nezměněná, ale koncentrace intracululárního GSH byla snižená (Ozaydin et al. 2006). Existují studie ukazující na zvýšenou, sníženou nebo nezměněnou aktivitu GST u obézních jedinců v porovnání s neobézními, jak u lidí, tak u zvířat (Ozaydin et al. 2006).

Stárnutí je nevyhnutelný biologický proces charakterizovaný progresivní funkční degradací všech orgánových systémů se simultánním zvýšením oxidačního poškození jako výsledek akumulace ROS (Vyskočilová et al. 2013). Teorie volných radikálů v souvislosti se stárnutím udává, že ke stárnutí dochází díky akumulaci neopravitelného poškození volnými radikály útočícími na buněčné komponenty (Rikans a Hornbrook 1997, Rizvi a Maurya 2007). Stárnutí postihuje různé orgány, tkáně a typy buněk v jednom organismu různými způsoby. Nejedná se o uniformní proces, orgánově specifický, ale má interindividuální variabilitu (Schmucker 1998). Demografická struktura obyvatelstva se velmi rychle mění a populace stárne. V Evropě bylo v roce 2000 16 % lidí starších 65 let a v roce 2030 se předpokládá zvýšení tohoto podílu až na 24 % (Wauthier et al. 2007).

Významnější vliv věku na specifickou aktivitu studovaných enzymů jsem nezjistila v žádné skupině.

Specifická aktivita glutathionperoxidasy v průběhu **stárnutí** mírně vzrostla u obézních samců, zatímco u obou kontrolních skupin nebyly rozdíly statisticky významné. Vyskočilová et al. (2013) udává naopak 39% snížení aktivity GPx v průběhu stárnutí u 21 měsíčních potkanů. Aktivita jaterní GPx a hladina GSH v játrech byly stejné u kmene SAMP1//Fky myši, které jsou náchylné k předčasnému stárnutí, a u

myší kmene SAMR1/Fky, které jsou k předčasnému stárnutí rezistentní (He et al. 1994). Zhu et al. (2006) zjistili, že samců i samic kmene Sprague–Dawley dochází během stárnutí ke zvýšení aktivity GPx v několika oblastech mozku (mozeček, střední mozek, kůra, striatum), což zřejmě souvisí s adaptací na vyšší míru oxidačního stresu u starých potkanů, která byla v této studii demonstrována vyšší hladinou lipoperoxidů. Naproti tomu v červených krvinkách starých lidí byla aktivita GPx snížena o 43,2 % ve srovnání s kontrolní skupinou mladých jedinců (Matsubara a Machado 1991). Ve své práci jsem zjistila, že **proteinová exprese** GPx2 se věkem měnila převážně u samců, kde ve skupině obézních samců klesla asi na 25 %, zatímco u NaCl samců naopak dvojnásobně vzrostla. Menší množství proteinu GPx2 koresponduje se snížením aktivity (i když pouze méně výrazně) právě u obézních samců, nicméně u kontrolní skupiny NaCl je pouze nárůst proteinu, nikoliv specifické aktivity u starších samců.

U enzymu **glutathionreduktasa** jsem v průběhu stárnutí nezaznamenala významnější změny ve **specifické aktivitě**. Podle mého měření **proteinová exprese** GR v průběhu stárnutí většinou jen mírně klesala. Hamburg et al. (1994) udává, že u mladých myší jsou vyšší plazmatické koncentrace GSSG než u dospělých myší, což může značit nižší hladinu GR u mladších jedinců. Takové zvyšování exprese GR může souviset s ochranou buněk před oxidačním poškozením. Během stárnutí došlo u potkanů kmene Sprague–Dawley ke zvýšení aktivity GR zejména ve středním mozku, kde je velké množství dopaminu, který není sekvestrován v synaptických váčcích, je rychleji metabolizován a při tom vzniká značné množství peroxidu vodíku a hydroxylových radikálů. Při jejich odstraňování je spotřebováván GSH, který se ve zvýšené míře oxiduje na GSSG, což zřejmě stimuluje zvýšení aktivity GR (Zhu et al. 2006). Naproti tomu v červených krvinkách starých lidí byla aktivita GR snížena o 38,2 % ve srovnání s kontrolní skupinou mladých jedinců (Matsubara a Machado 1991).

Specifická aktivita glutathion-S-transferasy se s věkem statisticky významně změnila pouze u samců bez léčby, kdy u dvacetitýdenních myší byla mírně vyšší. Vyskočilová et al. (2013) zjišťovala specifickou aktivitu GST v játrech potkanů. U starých jedinců (21 měsíců) byla katalytická aktivita GST 5,6x vyšší než u mladých (6 týdnů). Různé studie na aktivitu GST v játrech potkanů také nemají jednoznačné výsledky. Aktivita GST v játrech SAMP//Fky myší byla zhruba o čtvrtinu nižší než u myší kmene SAMR/Fky (He et al. 1994). Aktivita GST v mozku starých samců i samic potkanů kmene Sprague–Dawley stoupala pravděpodobně jako adaptační odpověď na

zvýšenou míru oxidačního stresu (Zhu et al. 2006). V **expresi proteinu GSTa** Vyskočilová et al. (2013) uvádí, že neměla skupina starších oproti mladším statisticky významné změny, ale lišili se především jednotliví potkani mezi sebou.

Pohlaví je důležitý faktor, který přispívá k rozdílům ve farmakokinetice, zahrnující například vstřebávání léčiv, distribuci, absorpci, metabolismus a exkreci a také ovlivňuje farmakodynamiku, tedy účinky léčiv a jejich toxicitu (Dai et al. 2006). Existují studie (např. Giergiel et al. 2012) zaměřené na sledování antioxidačních systémů u lidí a u zvířat v perimenopauzálním období. Změny pozorované během tohoto období poskytují důkazy o účasti steroidních hormonů na regulaci aktivity antioxidačního systému. Navíc samotné estrogeny vykazují antioxidační aktivitu, která je nezávislá na receptoru.

Specifická aktivita glutathionperoxidasy byla u obézních myší a u myší bez léčby nezávislá na **pohlaví**. Ve skupině NaCl myší jsem zjistila jak u mladých, tak u starších myší mírně nižší aktivitu u samců. Výsledky jsou v souladu s pozorováním Zhu et al. (2006), kde byly věkem vyvolané změny v aktivitě GPx v mozku potkanů také nezávislé na pohlaví. **Exprese GPx** byla u samců i samic poměrně rozdílná, ale nejednoznačně. Ve skupině obézních myší měli u mladých vyšší expresi samci a u starých naopak samice, protože u samců nejvíce klesla. Ve skupině NaCl naopak měly mírně vyšší expresi mladé samice a větší rozdíl pak staří samci.

Ve **specifické aktivitě** enzymu **glutathionreduktasa** podle mého zjištění pohlaví nehraje roli. Jediná skupina, kde jsem zjistila statistický rozdíl, byla skupina dvacetidenních myší bez léčby. Samci měli mírně vyšší specifickou aktivitu GR. Hamburg et al. (1994) shodně uvádí, že hodnoty GR v plicích pokusných myší byly na pohlaví nezávislé. Hodnoty specifických aktivit GR samic i samců udává bez statisticky významného rozdílu. Rovněž v mozku potkanů nebyly věkem vyvolané změny v aktivitě GR závislé na pohlaví (Zhu et al. 2006). Ve své práci jsem zjistila, že ve většině skupin měli samci mírně nižší **proteinovou expresi** tohoto enzymu než samice. Hamburg et al. (1994) zjišťoval expresi GR v plicích myší s aplikovaným endotoxinem a v kontrolní skupině a zjistil, že zvýšení aktivity GR bylo spojeno s nerovnoměrným zvýšením koncentrací proteinu GR a jeho mRNA. Tyto výsledky mohou ukazovat na to,

že některé procesy vyskytující se v buňce chrání imunoreaktivní bílkovinu od vytvoření plně funkčního enzymu.

Nejvíce pohlaví ovlivnilo **specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy**, kde v kontrolních skupinách měli samci tento enzym asi 2x aktivnější než samice. Patologický stav tento rozdíl stíral a u obézních samců nebyl rozdíl ve specifické aktivitě téměř žádný a vůbec statisticky významný. Jedinou částí mozku, kde byly zaznamenány rozdíly v aktivitě GST závislé na pohlaví, byl mozeček. V této části mozku byla aktivita GST u starých samic potkana statisticky významně nižší, než u stejně starých potkaních samců (Zhu et al. 2006). Dai et al. (2013) uvádí u samic a samců myši s injekčně podanou toxickou dávkou paracetamolu, že samice mají nižší hodnoty mRNA jaterních GST a signifikantně nižší bazální hodnoty GSH v játrech. Bazální hodnoty mRNA některých druhů GST (A1/2, A3, M2, M1, O1) byly mezi pohlavími srovnatelné, ale genová exprese většiny z nich byla vyšší v játrech samců oproti samicím. Genová exprese GST P1, M3 a Z1 byla 10x vyšší u samců. GST hraje stěžejní roli v detoxifikaci léčiv. Androgeny regulují expresi GSTP, což může vysvětlovat pohlavní rozdíly na genové úrovni. Přestože hepatoprotektivní dráhy (bazální jaterní GSH a exprese mRNA hemoxygenasy-1) jsou u myších samic signifikantně snižené, jsou i přesto odolnější proti hepatotoxickému působení paracetamolu než samci (Dai et al. 2013).

Rozdíly v aktivitě antioxidantních enzymů u obézních jedinců mezi mými výsledky a údaji z literatury mohou být způsobeny odlišným modelem obezity a rozdíly mezi časným stádiem obezity a chronickou obezitou (Vincent a Taylor 2006). Rozpory mezi aktivitou, množstvím proteinu a mRNA jsou v biologických modelech pozorovány poměrně často. Korelace mezi těmito biomolekulami (protein, mRNA) může být slabá například díky odlišné regulaci, pomalejší degradaci proteinu, inaktivaci enzymu (Maier et al. 2009, Lněničková et al. 2018).

7. Závěr

Výsledky mé rigorózní práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Specifické aktivity glutathion-S-transferasy, glutathionperoxidasy a glutathionreduktasy jsem spektrofotometricky stanovila u všech skupin myší (MSG, NaCl, bez léčby) obou pohlaví a věku 8 a 20 týdnů.
2. Patologický stav měl významný vliv zejména na aktivitu GST, jejíž aktivita klesla po navození obezity u 8 i 20týdeních samců přibližně na polovinu. Specifická aktivita GST se u samic výrazně nezměnila. Také u enzymů GR a GPx jsem nezaznamenala výraznější změny v souvislosti s navozením obezity. Výraznější vliv věku na aktivitu studovaných enzymů jsem nezjistila v žádné skupině. Pohlaví ovlivnilo nejvíce aktivitu GST, kdy u obou kontrolních skupin měli samci přibližně dvojnásobně vyšší aktivitu tohoto enzymu než stejně staré samice. Ve skupině obézních myší nebyl tento rozdíl téměř patrný.
3. Pomocí imunoblottingu se specifickými protilátkami jsem stanovila relativní exprese proteinů GPx2 a GR u všech skupin myší (MSG, NaCl a bez léčby) obou pohlaví a věku 8 a 20 týdnů. Pro kontrolu nanášení proteinů jsem použila β -aktin, což je konstitutivně exprimovaný protein.
4. Patologický stav ovlivnil zejména expresi GR. Obézní myší měly relativní expresi GR oproti oběma kontrolním skupinám o třetinu až dvě třetiny vyšší. V průběhu stárnutí exprese GR většinou mírně klesala a ve většině skupin měli samci mírně nižší expresi tohoto enzymu než samice. Exprese GPx2 se věkem měnila převážně u samců, kde ve skupině obézních samců klesla asi na čtvrtinu, zatímco u NaCl samců naopak 2x vzrostla. Vliv pohlaví na expresi GPx2 byl také nejednoznačný. Ve skupinách mladých MSG jsem zaznamenala asi o 50% vyšší expresi u samců, naopak v kontrolních skupinách měly vyšší expresi mladé samice. Ve skupinách starých myší měly expresi GPx2 o více jak 50% vyšší samice, v kontrolní skupině NaCl naopak výrazně vyšší samci.

8. Seznam použité literatury

- Banerjee R, Becker D, Dickman M, Gladyshev V, Rangsdale S (2008) Redox biochemistry. 1st ed. Wiley, New Jersey. 317 stran. ISBN 978-0-471-78624-5.
- Bonilla M, Denicola A, Novoselov SV, Turanov AA, Protasio A, Izemendi D, Gladyshev VN, Salinas G (2008) Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J Biol Chem.* 283(26):17898-907.
- Boušová I, Košťáková Š, Matoušková P, Bártíková H, Szotáková B, Skálová L (2016) Monosodium glutamate-induced obesity changed the expression and activity of glutathione S-transferases in mouse heart and kidney. *Pharmazie* 72: 257-259.
- Bray GA, Ryan DH (2014) Update on obesity pharmacotherapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1311:1-13.
- Brethauer SA, Kim J, el Chaar M, Pappasavas P, Eisenberg D, Rogers A, Ballem N, Kligman M, Kothari S (2015) Standardized outcomes reporting in metabolic and bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis.* 11(3):489-506.
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M (2012) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1813: 3289-3303.
- Bult MJF, van Dalen T, Muller AF (2008) Surgical treatment of obesity. *European Journal of Endocrinology* 158: 135-145.
- Carlberg I a Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113:484-90.
- Cirić M, Najman S, Bojanić V, Cekić S, Nesić M, Puskas N (2009) Neonatal influence of monosodium glutamate on the somatometric parameters of rats. *Gen Physiol Biophys.* 28 Spec. No:155-61.
- Coelho M, Oliveira T, Fernandes R (2013) Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci.* 9(2):191-200.
- Cossrow N, Falkner B (2004) Race/Ethnic Issues in Obesity and Obesity-Related Comorbidities. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2590-2594.
- Dai G, He L, Chou N, Wan Y-JY (2006) Acetaminophen Metabolism Does Not Contribute to Gender Difference in Its Hepatotoxicity in Mouse. *Toxicol Sci.* 92(1), 33-41.
- Flohé a Günzler (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105:114-20.

- Fobi MAL (2004) Surgical treatment of obesity: a review. *J Natl Med Assoc.* 96(1): 61–75.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 114(12):1752-61.
- Giergiel M, Lopucki M, Stachowicz N, Kankofer M (2012) The influence of age and gender on antioxidant enzyme activities in humans and laboratory animals. *Aging Clin Exp Res.* 24(6):561-9.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249(22): 7130-9.
- Hainer V a kol. (2011) *Základy klinické obezitologie.* 2. vyd. Grada, Praha. 464 stran. ISBN 978-80-247-3252-7
- Halliwell B, Gutteridge J (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine.* 5th edition. Oxford University Press, Oxford, 896 pp.
- Hamburg DC, Tonoki H, Welty SE, Geske RS, Montgomery ChA, Hansen TN (1994) Endotoxin Induces Glutathione Reductase Activity in Lungs of Mice. *Pediatr Res.* 35(3):311-5 .
- Handy DE, Lubos E, Yang Y, Galbraith JD, Kelly N, Zhang YY, Leopold JA, Loscalzo J. (2009) Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J Biol Chem* 284(18):11913-21.
- He P, Yamaoka-Koseki S, Yasumoto K (1994) Age-related Changes in Glutathione Concentration, Glutathione Peroxidase, Glutathione S-Transferase, and Superoxide Dismutase Activities in Senescence Accelerated Mice. *Biosci Biotech Biochem.* 58(6):1037-1040.
- Joo JK, Lee KS (2014) Pharmacotherapy for Obesity. *J Menopausal Med.* 20(3):90-96.
- Kaila B, Raman M (2008) Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Can J Gastroenterol.* 22(1):61-8.
- Kanasaki K, Koya D (2011) Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol.* 2011:197636.
- Karmali S, Brar B, Shi X, Sharma AM, de Gara C, Birch DW (2015) Weight recidivism post-bariatric surgery: a systematic review. *Obes Surg.* 23(11):1922-33.
- Kopelman PG, Caterson ID, Dietz WH (2010) *Clinical Obesity in Adults and Children.* 3rd ed. Blackwell Publishing, Chichester, UK. 502 pp. ISBN: 978-1-405-18226-3.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

- Li M, Cheung BMY (2009) Pharmacotherapy for obesity. *Br J Clin Pharmacol.* 68(6): 804-810.
- Lněničková K, Skálová L, Stuchlíková Raisová L, Szotáková B, Matoušková P (2018) The induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: Time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels. *Acta Pharm.* 68(1):75-85.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology.* 4th ed. W. H. Freeman, New York, USA, 1150 pp. ISBN-10: 0-7167-3136-3
- Malnick SDH, Knobler H (2006) The medical complication of obesity. *Q J Med.* 99:565-579.
- Maier T, Guell M, Serrano L (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 583(24):3966–3973.
- Manning S, Pucci A, Finer N (2014) Pharmacotherapy for obesity: novel agents and paradigms. *Ther Adv Chronic Dis.* 5(3): 135–148.
- Masopust J (2006) *Metabolický syndrom 2. (aneb proč tloustneme).* Labor Aktuell 01/06:4-9.
- Matoušková P, Bártíková H, Boušová I, Levorová L, Szotáková B, Skálová L (2014) Drug-Metabolizing and Antioxidant Enzymes in Monosodium L-Glutamate Obese Mice. *Drug Metab Dispos* 43(2):258-265
- Matsubara LS a Machado PE (1991) Age-related changes of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes. *Braz J Med Biol Res.* 24(5):449-454.
- Mendes IKS, Matsuura C, Aguila MB, Daleprane JB, Martins MA, Mury WV, Brunini TMC (2018) Weight loss enhances hepatic antioxidant status in a NAFLD model induced by high-fat diet. *Appl Physiol Nutr Metab.* 43(1):23-29.
- Nýdlová E, Vrbová M, Roušar T (2014) Glutathion a jeho enzymový systém. *Diabetol. Metab. Endokrinol. Výživa.* 17(4):202-208.
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164(3880):719–721.
- Picu A, Petcu L, Ștefan S5 Mitu M, Lixandru D, Ionescu-Tîrgoviște C, Pîrcălăbioru GG, Ciulu-Costinescu F, Bubulica MV, Chifiriuc MC (2017) Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Romanian Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. *Molecules.* 22(5). pii: E714.
- Racek J (2003) *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění.* 1. vyd. Galén, Praha. 90 stran. ISBN 80-7262-231-5.

Sasaki Y, Suzuki W, Shimada T, Iizuka S, Nakamura S, Nagata M, Fujimoto M, Tsuneyama K, Hokao R, Miyamoto K, Aburada M (2009) Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. *Life Sci* 85(13-14):490–498.

Segula D (2014) Complications of obesity in adults: A short review of the literature. *Malawi Med J.* 26(1): 20-24.

Skálová L, Boušová I (2011) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik.* 1. vyd., Praha Karolinum. 160 stran. ISBN 978-80-246-1917-0

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85.

Svačina Š (2015) Léčba obezity. *Med Promoci.* 16(3):231-236.

Towbin H, Stachelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76 (9):4350-4354.

Vincent HK a Taylor AG (2006) Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes.* 30(3):400–418.

Vlček J, Fialová D, Kulič F, Macek K, Rokyta R, Rudolf K, Šonka K, Tilšer I, Topinková E, Tůma I, Zárubová J (2010) *Klinická farmacie I.* 1. Vyd. Grada, Praha. 368 stran. ISBN 978-80-247-3169-8.

Vyskočilová E, Szotáková B, Skálová L, Bártíková H, Hlaváčová J, Boušová I (2013) Age-Related Changes in Hepatic Activity and Expression of Detoxification Enzymes in Male Rats. *Biomed Res Int.* 2013:408573, doi: 10.1155/2013/408573

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134(3):489-92.

Ye L a Zhang Y (2001) Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 22(12):1987-1992.

Zhu Y, Carvey PM, Ling Z (2006) Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res.* 1090(1):35-44.

RCSB Protein databank: <https://www.rcsb.org/>

https://www.researchgate.net/figure/225183915_fig1_Figure-1-Schematic-representation-of-luminol-chemiluminescence-reaction-used-in-the-CIEF

<http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/Bio750/Electrophoresis.html>

9. Seznam použitých zkratek

5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
5-HT _{2B}	serotoninový receptor typu 2B
5-HT _{2c}	serotoninový receptor typu 2C
AA	akrylamid
Ab	protilátka
AP	alkalická fosfatasa
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCA	kyselina bicinchoninová
Bez F8	osmitýdenní samice myši bez léčby
Bez F20	dvacetitýdenní samice myši bez léčby
Bez M8	osmitýdenní samci myši bez léčby
Bez M20	dvacetitýdenní samci myši bez léčby
BFB	bromfenolová modř
Bis-AA	bis-akrylamid
BMI	body mass index neboli index tělesné hmotnosti (kg/m ²)
BSA	hovězí sérový albumin
CB ₁	kanabinoidní receptor typu 1
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CNS	centrální nervová soustava
DPP-4	dipeptidylpeptidasa typu 4
EMA	Evropská léková agentura

EU	Evropská unie
FAD	flavinadenindinukleotid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA)
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GIT	gastrointestinální trakt
GLP-1	glukagonu podobný peptid 1
GLUT	glukosový transportér
GPx	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion, redukovaná forma
GSSG	glutathion, oxidovaná forma
GST	glutathion-S-transferasa
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
MA	molybdenan amonný
MSG	glutamát sodný
MSG F8	osmitýdenní samice myši s glutamátem navozenou obezitou
MSG F20	dvacetitýdenní samice myši s glutamátem navozenou obezitou
MSG M8	osmitýdenní samci myši s glutamátem navozenou obezitou
MSG M20	dvacetitýdenní samci myši s glutamátem navozenou obezitou
NaCl F8	osmitýdenní samice myši ze skupiny osmolární kontroly

NaCl F20	dvacetitýdenní samice myši ze skupiny osmolální kontroly
NaCl M8	osmitýdenní samci myši ze skupiny osmolální kontroly
NaCl M20	dvacetitýdenní samci myši ze skupiny osmolální kontroly
NOTES	transluminální endoskopická chirurgie (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery)
OA	osteoartróza
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PPAR- γ	jaderný receptor ze skupiny receptorů aktivovaných peroxisomovými proliferátory
RAAS	renin-angiotensin-aldosteronový systém
Roux-en-Y	typ gastrického bypassu
SDS	laurylsíran sodný
SSRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TAG	triacylglyceroly
TBST	směs TRIS pufru a Tween 20
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TrxR	thioredoxinreduktasa
WHO	Světová zdravotnická organizace

10. Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1. Strukturní vzorec fenterminu.

Obr. 2. Strukturní vzorec lorcaserinu.

Obr. 3. Strukturní vzorec orlistatu.

Obr. 4. Strukturní vzorec efedrinu (vlevo) a kofeinu (vpravo).

Obr. 5. Strukturní vzorec topiramátu.

Obr. 6. Strukturní vzorec naltrexonu (vlevo) a bupropionu (vpravo).

Obr. 7. Malabsorpční bariatrické operace. Jejuno-ileální bypass (a), bilio-pankreatická diverze (b) a biliopanreatická diverze se zachováním duodenální pasáže (c).

Obr. 8. Restrikční a kombinované bariatrické operace. Vertikální gastroplastika (d), adjustabilní Švédská bandáž žaludku (e) a gastrický bypass Roux-en-Y (f).

Obr. 9. Chemická struktura glutathionu. GSH – redukováná forma (a), GSSG – oxidovaná forma (b).

Obr. 10. Lidská glutathionperoxidasa 5.

Obr. 11. Struktura lidské glutathionreduktasy.

Obr. 12. Struktura lidské glutathion-S-transferasy.

Obr. 13. Komplex bílkoviny s mědí.

Obr. 14. Princip stanovení aktivity GPx.

Obr. 15. Princip stanovení aktivity GST s CDNB.

Obr. 16. Princip PAGE.

Obr. 17. Princip imunoblottingu.

Obr. 18. Princip chemiluminiscenční detekce proteinů.

Obr. 19. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathionperoxidasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samečů (panel B) myši starých 8 týdnů.

Obr. 20. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathionperoxidasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 20 týdnů.

Obr. 21. Vliv věku na specifickou aktivitu glutathionperoxidasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 a 20 týdnů.

Obr. 22. Vliv pohlaví na specifickou aktivitu glutathionperoxidasy v jaterním cytosolu myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 týdnů (panel A) a 20 týdnů (panel B).

Obr. 23. Relativní exprese GPx2 v játrech osmitýdenních (panel A) a dvacetitýdenních (panel B) myši obou pohlaví ze skupin MSG, NaCl a neovlivněných.

Obr. 24. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathionreduktasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 8 týdnů.

Obr. 25. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathionreduktasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 20 týdnů.

Obr. 26. Vliv věku na specifickou aktivitu glutathionreduktasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 a 20 týdnů.

Obr. 27. Vliv pohlaví na specifickou aktivitu glutathionreduktasy v jaterním cytosolu myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 týdnů (panel A) a 20 týdnů (panel B).

Obr. 28. Relativní exprese GR v játrech osmitýdenních (panel A) a dvacetitýdenních (panel B) myši obou pohlaví ze skupin MSG, NaCl a neovlivněných.

Obr. 29. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 8 týdnů.

Obr. 30. Vliv patologického stavu na specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši starých 20 týdnů.

Obr. 31. Vliv věku na specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy v jaterním cytosolu samic (panel A) a samců (panel B) myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 a 20 týdnů.

Obr. 32. Vliv pohlaví na specifickou aktivitu glutathion-S-transferasy v jaterním cytosolu myši ze skupin MSG, NaCl a bez léčby starých 8 týdnů (panel A) a 20 týdnů (panel B).

Tab. 1. Ředění roztoků pro vytvoření kalibrační přímky.

Tab. 2. Ředění vzorků pro elektroforézu.

Tab. 3. Biochemické parametry pokusných myší.