

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**Vliv vybraných seskviterpenů na  
aktivitu karbonylreduktasy 1**  
*in vitro*

Rigorózní práce  
Vědní obor Patobiochemie a xenobiochemie

Mgr. Veronika Mazurková

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

Hradec Králové 2019

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.

Děkuji doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, trpělivost a čas, který mi věnovala při vzniku této rigorózní práce, a také za velmi příjemnou pracovní atmosféru a vzájemnou komunikaci.

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Veronika Mazurková

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

### **Název rigorózní práce: Vliv vybraných seskviterpenů na aktivitu karbonylreduktasy 1 *in vitro***

Seskviterpeny, hlavní složky rostlinných silic, jsou nedílnou součástí koření, tradičních jídel a nápojů. Jsou používány v lidové medicíně, farmaceutickém průmyslu i kosmetice. Některé seskviterpeny vykazují zajímavé biologické aktivity, ale mohou interagovat se současně podávanými léčivými prostřednictvím modulace aktivity a/nebo exprese enzymů metabolizujících xenobiotika. Enzym karbonylreduktasy 1 (CBR1) je jedním z enzymů, který se podílí na metabolismu mnoha endogenních a xenobiotických sloučenin. Jedním ze substrátů CBR1 je i chemoterapeutikum doxorubicin, který je tímto enzymem metabolizován na méně účinný metabolit doxorubicinol, který je však zodpovědný za kardiotoxicitu doxorubicinu. Cílem předkládané rigorózní práce bylo zjistit schopnost pěti vybraných seskviterpenů (tj. valencen,  $\beta$ -karyofilenoxid,  $\alpha$ -humulen, *cis*-nerolidol a *trans*-nerolidol) ovlivňovat aktivitu CBR1 *in vitro*. Vliv studovaných látek na aktivitu tohoto enzymu jsem sledovala jednak v cytosolické frakci získané z jater potkana a také na rekombinantně připravené lidské CBR1. Aktivitu CBR1 jsem v obou případech stanovovala metodou podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem. Nejvýznamnější inhibiční účinek jsem zaznamenala v případě *trans*-nerolidolu, který snížil aktivitu CBR1 v cytosolu o 14,3 % ve srovnání s kontrolou. V případě lidské rekombinantní CBR1 nedošlo k žádné signifikantní změně aktivity. Výsledky této studie lze tedy shrnout tak, že studované seskviterpeny valencen,  $\beta$ -karyofilenoxid,  $\alpha$ -humulen, *cis*-nerolidol a *trans*-nerolidol neprokázaly významnější inhibiční účinek vůči CBR1.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Veronika Mazurková

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

### **Title of rigorous thesis: Effect of selected sesquiterpenes on carbonyl reductase 1 activity *in vitro***

Sesquiterpenes, the main components of plant essential oils, are integral parts of spices, traditional food and beverages. They are used in folk medicines, pharmaceutical industry as well as in cosmetics. Several sesquiterpenes possess interesting biological activities but they could interact with concurrently administered drugs via the modulation of activity and/or expression of drug-metabolizing enzymes. Enzyme carbonyl reductase 1 (CBR1) is one of the enzymes participating in the metabolism of a number of endogenous and xenobiotic compounds. One of the CBR1 substrates is chemotherapeutic agent doxorubicin, which is metabolized by this enzyme to the less effective metabolite doxorubicinol, which is responsible for the doxorubicin cardiotoxicity. The aim of this rigorous thesis was to find out the ability of five selected sesquiterpenes (i.e. valencene,  $\beta$ -caryophyllene oxide,  $\alpha$ -humulene, *cis*-nerolidol and *trans*-nerolidol) to affect the activity of CBR1 *in vitro*. The effect of studied substances on the activity of this enzyme was monitored in cytosolic fraction obtained from rat liver and also on recombinant human CBR1. Activity of CBR1 was in both cases assessed by method of Maté et al. (2008) using menadion as a substrate. The highest inhibitory effect was found in case of *trans*-nerolidol, which decreased CBR1 activity in cytosol by 14,3 % compared to the control. In case of human recombinant CBR1, no significant change in activity was observed. Taken together, the results of this study indicate that the selected sesquiterpenes valencene,  $\beta$ -caryophyllene oxide,  $\alpha$ -humulene, *cis*-nerolidol and *trans*-nerolidol do not express considerable inhibitory effect towards CBR1.

# OBSAH

1.	ÚVOD .....	2
2.	SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ .....	3
2.1.	Karbonylreduktasa 1 .....	3
2.1.1.	Struktura.....	3
2.1.2.	Funkce.....	3
2.1.3.	Vliv přírodních látek na aktivitu a expresi CBR1.....	5
2.2.	Seskviterpeny .....	13
2.2.1.	Struktura a biosyntéza terpenů.....	13
2.2.2.	Struktura seskviterpenů.....	14
2.2.3.	Výskyt a význam seskviterpenů .....	16
2.2.4.	Biologická aktivita seskviterpenů.....	16
3.	CÍLE PRÁCE .....	23
4.	MATERIÁL A METODIKA .....	24
4.1.	Použitý materiál .....	24
4.2.	Použitá zařízení .....	24
4.3.	Metodika .....	25
4.3.1.	Prováděná stanovení .....	25
5.	VÝSLEDKY .....	31
5.1.	Vliv jednotlivých seskviterpenů na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana <i>in vitro</i> .....	31
5.1.1.	Vliv valencenu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana <i>in vitro</i> .....	32
5.1.2.	Vliv $\beta$ -karyofilenoxidu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana <i>in vitro</i> .....	33
5.1.3.	Vliv $\alpha$ -humulenu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana <i>in vitro</i> ...	33
5.1.4.	Vliv <i>trans</i> -nerolidolu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana <i>in vitro</i> .....	34
5.1.5.	Vliv <i>cis</i> -nerolidolu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana <i>in vitro</i>	36

5.2.	Vliv jednotlivých seskviterpenů na aktivitu rekombinantní lidské CBR1 <i>in vitro</i> .....	36
6.	DISKUZE.....	39
7.	SHRNUTÍ .....	42
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	43
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	45

# 1. ÚVOD

Ve své rigorózní práci jsem se zabývala schopností seskviterpenů valencenu,  $\beta$ -karyofilenoxidu,  $\alpha$ -humulenu, *cis*-nerolidolu a *trans*-nerolidolu ovlivňovat aktivitu enzymu karbonylreduktasy 1 (CBR1) *in vitro*.

Seskviterpeny, hlavní složky rostlinných silic, vykazují široké spektrum biologických aktivit. Díky jejich širokému výskytu a běžnému použití je zde riziko nežádoucích interakcí s léčivými, které mohou být založeny na potenciální schopnosti terpenů modulovat aktivitu důležitých enzymů metabolizujících léčiva a další xenobiotika, kam patří i CBR1. Jedním ze substrátů CBR1 je i chemoterapeutikum doxorubicin, používaný k léčbě celé řady nádorových onemocnění. CBR1 je hlavním enzymem, který metabolizuje doxorubicin na méně účinný metabolit doxorubicinol, který je však zodpovědný za kardiotoxicitu doxorubicinu. Lze tedy předpokládat, že inhibice CBR1 by mohla zvýšit chemoterapeutickou účinnost doxorubicinu a snížit jeho vedlejší účinky.

V experimentální části své práce jsem se nejdříve věnovala vlivu studovaných seskviterpenů na aktivitu CBR1 *in vitro* v cytosolické frakci získané z jater potkana a to inkubací cytosolu s jednotlivými seskviterpeny v koncentraci 1, 10 a 100  $\mu$ M a stanovením aktivity CBR1 metodou podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem. Stanovenou aktivitu CBR1 jsem pak vztáhla na koncentraci bílkoviny v jednotlivých vzorcích. Dále jsem sledovala vliv seskviterpenů na aktivitu rekombinantní lidské CBR1 inkubací tohoto enzymu s jednotlivými seskviterpeny v koncentraci 100  $\mu$ M po dobu 10 a 20 min a aktivitu CBR1 jsem stanovila opět pomocí metody podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem.

Praktickou část diplomové práce jsem vypracovala na katedře biochemických věd FaF UK, pod vedením Doc. Boušové, která se dlouhodobě zabývá vlivem nízkomolekulárních látek s antioxidačními vlastnostmi (např. flavonoidů a terpenů) na aktivitu a expresi celé řady enzymů metabolismu eobiotik a xenobiotik

## 2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

### 2.1. Karbonylreduktasa 1

#### 2.1.1. Struktura

Většina enzymů redukujících karbonylové skupiny je v současnosti rozdělena do dvou nadrodin. Jedná se o nadrodinu aldo-ketoreduktas a nadrodinu dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) (Oppermann a Maser 2000). Karbonylreduktasy (CBRs; sekundární alkohol:NADP<sup>(+)</sup> oxidoreduktasy; EC 1.1.1.184) řadíme do nadrodiny SDR. Jedná se o NADPH-dependentní enzymy (Forrest a Gonzalez 2000). V lidském genomu byly identifikovány tři SDR geny kódující karbonylreduktasy, a to CBR1 (SDR21C1), CBR3 (SDR21C2) a CBR4 (SDR45C1) (Malatkova a kol. 2010). Karbonylreduktasy jsou v přírodě všudypřítomné. Jejich přítomnost byla objevena v každém organismu, který byl analyzován. Byly detekovány v bakteriích, kvasinkách, hmyzu, rostlinách, rybách a u mnoha druhů savců (Forrest a Gonzalez 2000).

Karbonylreduktasa 1 (CBR1) je NADPH-dependentní, nízkomolekulární, převážně monomerní cytosolický enzym (Forrest a Gonzalez 2000). Skládá se z 277 aminokyselin s molekulovou hmotností přibližně 30 kDa. Gen pro CBR1 je lokalizován na chromosomu 21q22.12 (Matsunaga a kol. 2006). Postrádá CAAT a TATA box a obsahuje hojné GC oblasti na prvním exonu (Malatkova a kol. 2010). V proteinové struktuře CBR1 se objevují pro SDR nadrodinu typické sekvence Rossmanových záhybů, které jsou součástí vazebného místa pro kofaktor, a konzervativní katalytická tetráda Asn/Ser/Tyr/Lys (Filling a kol. 2002).

#### 2.1.2. Funkce

Významnou roli v metabolismu mnoha endogenních a xenobiotických sloučenin hraje biotransformace karbonylových sloučenin. Jedná se o redukci karbonylové skupiny aldehydů, ketonů a chinonů na odpovídající hydroxylové deriváty (Oppermann a Maser 2000). V případě endogenních substrátů je redukce karbonylové skupiny nejčastěji součástí reversibilního oxidoredukčního procesu, který zahrnuje aktivaci nebo inaktivaci důležitých signálních molekul, jako jsou steroidy, prostaglandiny, retinoidy a biogenní aminy. U xenobiotických substrátů je redukce karbonylové skupiny obecně

jednosměrnou reakcí, protože výsledný alkohol se snáze konjuguje a eliminuje (Malatkova a kol. 2010).

CBR1 katalyzuje redukci mnoha xenobiotik, včetně důležitých léčiv, jako jsou například cytostatika doxorubicin a daunorubicin, nesteroidní protizánětlivá léčiva loxoprofen a nabumeton, antidepresivum bupropion, antipsychotikum haloperidol, neuroleptikum timiperon a antiemetikum dolasetron. Redukce karbonylové skupiny může vést jak k významnému snížení farmakologické aktivity léčiva, jako je tomu u bupropionu a haloperidolu, tak k aktivaci proléčiva, například u nabumetonu, loxoprofenu a dolasetronu. U některých léčiv, jako jsou cytostatika doxorubicin a daunorubicin, způsobuje redukce karbonylové skupiny nežádoucí toxicitu (Boušová a kol. 2015).

Také některé potraviny a látky znečišťující životní prostředí jsou substráty CBR1 (Boušová a kol. 2015). Detoxikace redukční cestou je důležitá zejména u chinonů odvozených z polycyklických aromatických uhlovodíků, které v organismu působí často cytotoxicky, imunotoxicky nebo genotoxicky. Jako příklad můžeme uvést nikotinový derivát NNK (4-(metylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon), což je jedna z nebezpečných složek tabákového kouře. Protektivní působení CBR1 spočívá v redukci karbonylové skupiny NNK. Díky této reakci nedojde v průběhu oxidační biotransformace NNK k aktivaci tohoto prekarcinogenu (Maser a kol. 2000).

Endogenní substráty CBR1 byly hledány mnoho let. Výsledky mnoha studií ukazují, že se CBR1 podílí na metabolismu několika důležitých biomolekul. Jedná se o prostaglandiny, tetrahydrobiopterin, vitamín K a isatin.

V metabolismu prostaglandinů působí CBR1 jako prostaglandin-9-ketoreduktasa a 15-hydroxyprostaglandindehydrogenasa, což jsou dvě aktivity, které naznačují důležitost CBR1 v procesu kontroly množství prostaglandinů u jedince za různých fyziologických a patologických podmínek (Forrest a Gonzales 2000). CBR1 se také podílí na syntéze tetrahydrobiopterinu, kofaktoru hydroxylas aromatických aminokyselin a synthasy oxidu dusnatého. CBR1 se pravděpodobně podílí také na metabolismu isatinu, endogenního indolu (Boušová a kol. 2015).

Hlubší poznání procesu oxidačního stresu a redoxní rovnováhy odhalilo důležitou roli CBR1 v detoxikaci reaktivních karbonylů. Výsledkem působení oxidačního stresu v procesech jako je zánět, diabetes a například ateroskleróza jsou reaktivní aldehydy a ketony (Forrest a Gonzales 2000). Ty jsou schopny kovalentně modifikovat DNA nebo proteiny a dále podpořit průběh oxidačního stresu, vedoucí k degenerativním onemocněním a rakovině (Boušová a kol. 2015). Bylo například dokázáno, že CBR1 hraje klíčovou roli v procesu svalové diferenciaci a regeneraci. Při těchto procesech bylo její množství ve svalové tkáni zvýšené. V nádorových buňkách vedlo zvýšené množství a aktivita CBR1 ke snížení proliferace a růstu a stejně tak schopnost těchto buněk invadovat do okolních tkání a tvořit metastázy byla nižší (Osawa a kol. 2015). Dále bylo zjištěno, že jak u buněk s vneseným siRNA CBR1, tak u buněk léčených selektivními CBR1 inhibitory bylo zvýšené množství reaktivních forem kyslíku (ROS) a peroxidace lipidů (Lim a kol. 2013).

Z těchto všech údajů vyplývá nezastupitelná role CBR1 při udržování homeostázy a při ochraně organismu. Modulace exprese nebo aktivity CBR1 může významně ovlivnit náchylnost organismu k působení toxických karbonylových sloučenin (Boušová a kol. 2015).

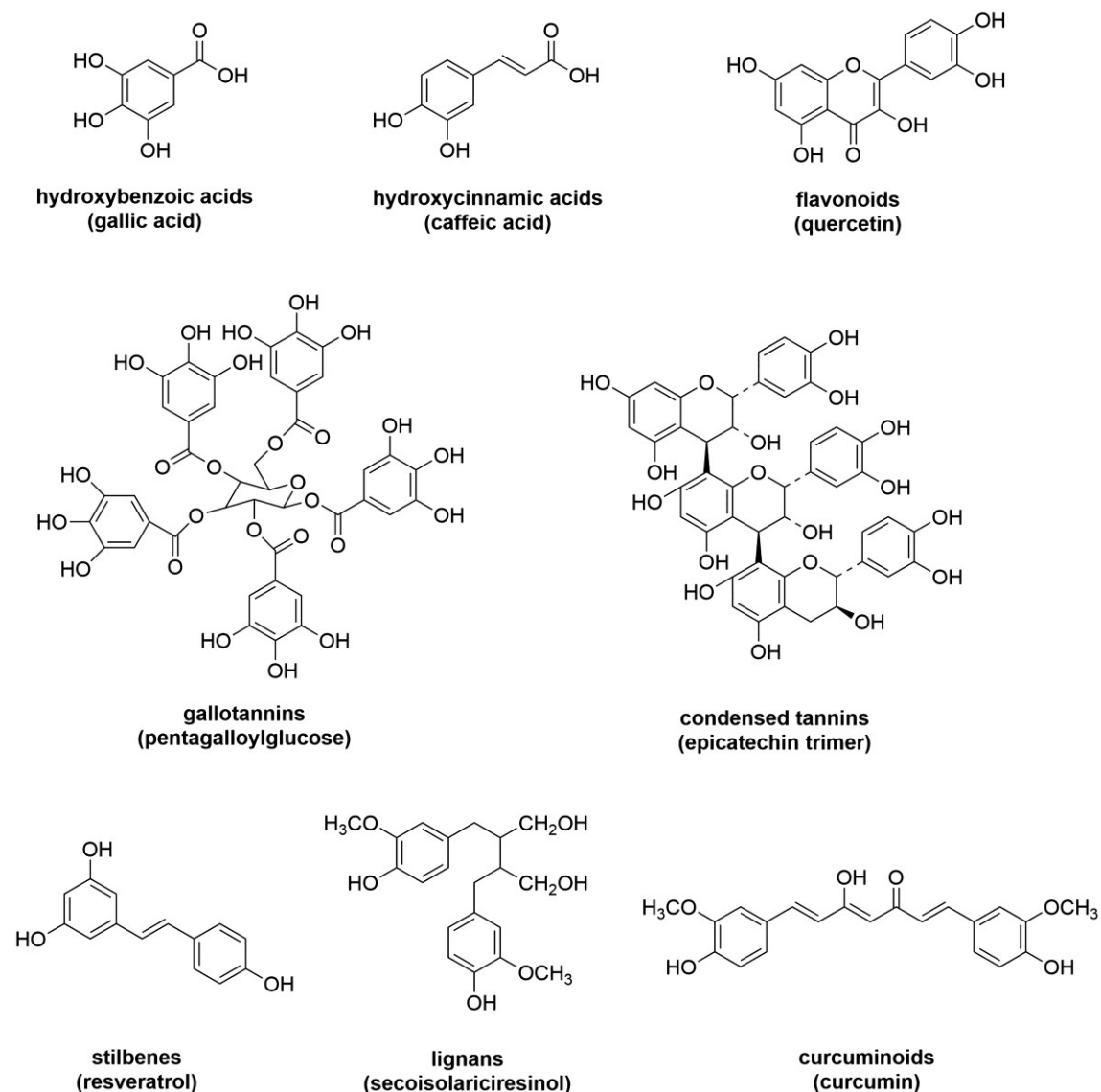
### **2.1.3. Vliv přírodních látek na aktivitu a expresi CBR1**

V následujícím textu budou diskutovány strukturální a funkční charakteristiky vybraných přírodních látek (polyfenoly, terpeny) a jejich vztah k aktivitě a expresi karbonylreduktasy 1.

#### **2.1.3.1. Modulace aktivity nebo exprese CBR1 pomocí polyfenolů**

Polyfenoly jsou sekundární rostlinné metabolity, které se obecně podílejí na ochraně buněk před ultrafialovým zářením a na ochraně před napadením patogeny (Manach a kol. 2004). Polyfenolické sloučeniny vykazují řadu biologických aktivit včetně účinků antioxidačních, protizánětlivých, antimikrobiálních a působení proti volným radikálům (Cicerale a kol. 2010). U vyšších rostlin bylo identifikováno několik tisíc molekul s polyfenolickou strukturou, která vychází z několika hydroxylových skupin navázaných na aromatickém jádře. Tyto sloučeniny mohou být klasifikovány do několika skupin, a to podle množství a funkce obsažených fenolických kruhů a podle

strukturních elementů, které poutají tyto kruhy k sobě. Dělíme je na fenolické kyseliny, flavonoidy, taniny, stilbeny, lignany a kurkuminoidy (Obr. 1) (Manach a kol. 2004). Všechny tyto sloučeniny jsou produktem šikimátové cesty (fenolické kyseliny a lignany) a kombinace šikimátové a acetátové cesty (flavonoidy, taniny, stilbeny a kurkuminoidy) (Dewick 2001). Dále se v textu zaměřuji na skupinu flavonoidů, stilbenů a kurkuminoidů, které byly z uvedených skupin polyfenolů nejvíce studovány ve vztahu k aktivitě a expresi CBR1.



Obr. 1 Chemická struktura hlavních skupin polyfenolů (Boušová a kol. 2015).

Doposud není provedena přesná evidence o transkripční regulaci CBR1 pomocí polyfenolů. Na druhé straně mnoho polyfenolů prokázalo interakci s regulačními elementy CBR1, jako jsou AhR, Nrf2, HIF-1 $\alpha$  a AP-1, což naznačuje jejich schopnost modulovat expresi CBR1. Protože CBR1 není typický cíl transkripčního faktoru Nrf2, efekt přírodních sloučenin na regulaci transkripce skrze AhR nebo Nrf2 je velmi zřídka studován ve spojení s tímto enzymem. Stejně tak je to i s jinými transkripčními faktory, kde například přímý efekt polyfenolů na indukci/inhibici AP-1 a jeho dopadu na expresi CBR1 nebyl dosud studován (Boušová a kol. 2015).

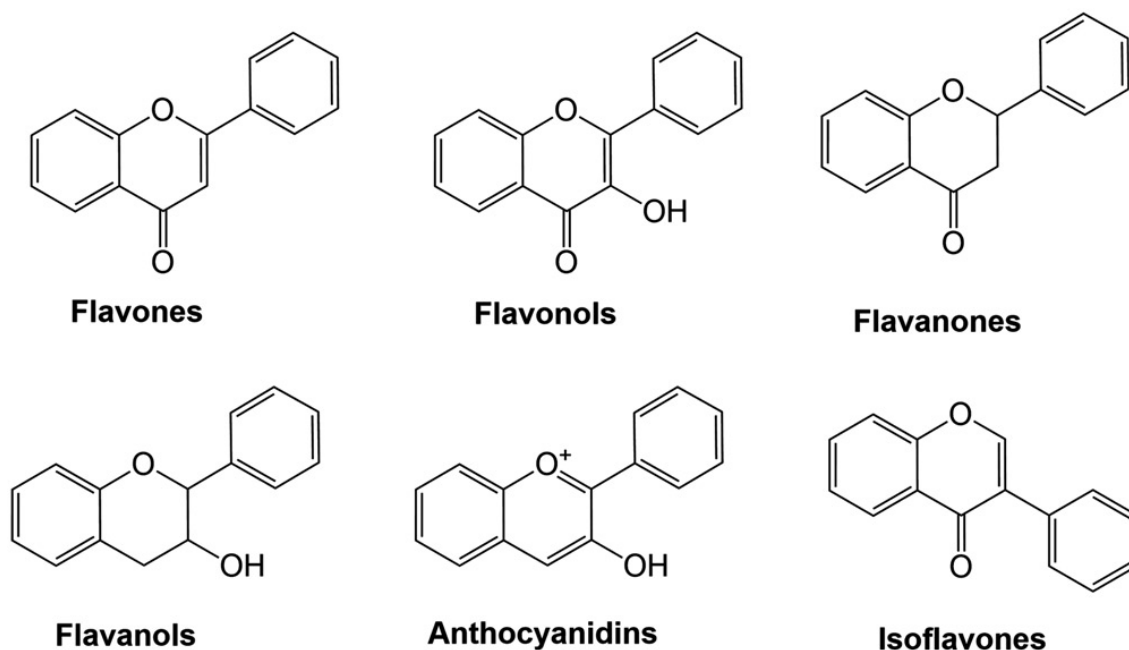
Inhibice CBR1 se jeví jako výhodná v souvislosti se zvýšením účinnosti protinádorové terapie antracykliny, ale může působit zhoršení detoxikace reaktivních karbonylů. Nicméně všechny známé informace o interakcích polyfenolů s CBR1 jsou založeny na výsledcích *in vitro* studií. S ohledem na významný vliv CBR1 a častou konzumaci polyfenolů, by bylo vhodné provést také *in vivo* studie pro zhodnocení rizik a prospěšnosti interakcí polyfenolů s CBR1 (Boušová a kol. 2015).

### *Flavonoidy – vztah k modulaci/expresi aktivity CBR1*

Flavonoidy reprezentují nejvíce studovanou skupinu polyfenolů. Vykazují množství biologických vlastností včetně aktivit antioxidantních, protinádorových, protivirových, antibakteriálních, protizánětlivých a vazodilatačních (Rodríguez-Mateos a kol. 2014).

Struktura flavonoidů je založena na flavonoidním jádře, které se skládá ze tří fenolických kruhů (C6-C3-C6) nazvaných kruhy A, B a C. Benzenový kruh A je kondenzován s šestičlenným heterocyklickým kruhem C, který na druhé pozici nese benzenový kruh B jako substituent. Kruh C může být heterocyklický pyran, jako je tomu u flavanolů (katechinů) a antokyanů, nebo pyron, jako je tomu v případě flavonolů, flavonů a flavanonů (Obr. 2) (Aherne a O'Brien 2002).

Flavonoidy mohou být rozděleny do šesti hlavních podskupin: flavony (luteolin, apigenin), flavonoly (kvercetin, kaempferol), flavanony (naringenin, taxifolin), flavanoly (katechin, epikatechin), antokyany (kyanidin) a isoflavony (genistein, daidzein) (Boušová a kol. 2015). V rostlinách se flavonoidy vyskytují jako glykosylované a sulfatované deriváty, převládající cukerné zbytky jsou glukosa, rhamnosa, xylosa, galaktosa, arabinosa a fruktosa (Williams a Grayer 2004).



Obr. 2 Chemická struktura hlavních podskupin flavonoidů (Boušová a kol. 2015).

U mnoha typů flavonoidů byla studována jejich schopnost inhibovat aktivitu CBR1 *in vitro* (Boušová a kol. 2015). Ve studii provedené Arai a kol. (2015) bylo testováno 27 flavonoidů z pohledu jejich inhibiční aktivity vůči CBR1, z nichž jako nejsilnější inhibitor se prokázal luteolin. Z dalších flavonoidů projevovaly významný inhibiční efekt na CBR1 *in vitro* apigenin, kaempferol, kvercitrin a kvercetin. Pro inhibiční potenciál flavonoidů se jeví důležitá 5-hydroxy a 7-hydroxy skupina. Dále byly testovány inhibiční aktivity flavanonů, isoflavonů, antokyanidinů a katechinů, které se ale za stejných podmínek projevovali jako slabší inhibitory (Arai a kol. 2015).

Cílem většiny těchto studií bylo zlepšení terapie antracykliny, jako jsou doxorubicin a daunorubicin, používaných při léčbě nádorových onemocnění (Forrest a Gonzales 2000). Hlavní působení antracyklinů spočívá ve vmezezení do dvoušroubovice DNA, inhibici topoisomerasy II. a DNA/RNA polymerasy a v produkci volných radikálů, což celkově vede ke zničení nádorových buněk. Ačkoli jsou antracykliny velmi účinná léčiva, jejich dávkování je přísně limitováno z důvodu zvýšeného rizika srdečního selhání při kumulaci dávek (Arai a kol. 2015). Předpokládá se, že zásadní roli v kardiotoxicitě a protinádorovém působení těchto léčiv hraje redukce jejich C13 karbonylové skupiny. Dochází ke vzniku metabolitu s hydroxylovou

skupinou (doxorubicinol, daunorubicinol), který vykazuje nižší protinádorovou aktivitu a vyšší kardiotoxicitu než původní léčivo. Redukce C13 karbonylové skupiny antracyklinů je zprostředkována několika reduktasami náležícími do nadrodiny aldo-ketoreduktas a nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem, z nichž CBR1 je považována za dominantní reduktasu doxorubicinu v lidské tkáni (Arai a kol. 2015, Kaiserová a kol. 2007, Piska a kol. 2017). Z tohoto důvodu se silné a selektivní inhibitory CBR1 jeví jako slibné molekuly pro doplňkovou léčbu s dvojitým prospěšným působením, které spočívá v prodloužení protinádorového působení antracyklinů a zároveň ve snížení jejich kardiotoxicity (Arai a kol. 2015, Piska a kol. 2017).

Antokyany, skupina flavonoidů, jsou obecně považovány za nejrozsáhlejší a nejdůležitější skupinu ve vodě rozpustných pigmentů rostlin. Antokyany a jejich aglykony antokyanidiny vykazují prospěšné působení na lidské zdraví spojené s jejich protinádorovými, antioxidačními, chemoprotektivními a protiradikálovými schopnostmi. Ve studii provedené Szotákovou a kol. (2013) byly antokyanidiny schopny inhibovat aktivitu CBR1 v potkaních a lidských subcelulárních frakcích středně silně. Delfinidin působil jako významný nekompetitivní inhibitor lidské CBR1 (Szotáková a kol. 2013).

### *Stilbeny – vztah k modulaci/expresi aktivity CBR1*

Stilbeny tvoří menší skupinu polyfenolů, jejich výskyt v lidské stravě je poměrně malý. Byly detekovány například u rostlin z čeledí *Vitaceae*, *Moraceae* a *Poaceae*. V rostlinách plní funkci fytoalexinů, tedy sloučenin, které se v rostlině kumulují v odpovědi na stres, jako je infekce, zranění, expozice UV záření a vystavení chemikáliím (Vannozzi a kol. 2012).

Stilbeny jsou strukturně charakterizovány přítomností 1,2-difenyloethylenového jádra a mohou být rozděleny na dvě kategorie a to na monomerní (resveratrol, pinosylvin) a oligomerní (hopeanol, viniferin). Monomerní stilbeny se nacházejí obvykle ve formě aglykonů nebo tvoří glykosidy v kombinaci s cukry, jako je glukosa, rhamnosa či arabinosa. Oligomerní stilbeny vznikají spojením homogenních a heterogenních monomerních stilbenů (Shen a kol. 2009)

Nejznámějším a nejvíce studovaným stilbenem je *trans*- resveratrol, monomerní stilben hojně se vyskytující v hroznovém víně a zodpovědný za kardioprotektivní vliv červeného vína (Boušová a kol. 2015). Resveratrol a některé jeho deriváty obsahující 3,5-dihydroxylové skupiny způsobily zesílení cytotoxického efektu doxorubicinu na životaschopnost nádorových buněk MCF-7 (Ito a kol. 2013). Resveratrol byl charakterizován jako smíšený inhibitor rekombinantní CBR1 (Piska a kol. 2017).

### *Kurkuminoidy – vztah k modulaci/expresi aktivity CBR1*

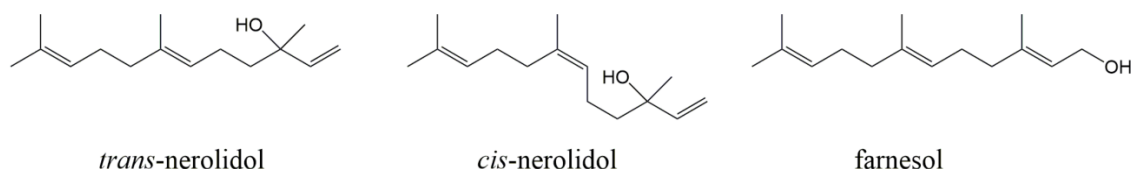
Kurkuminoidy jsou skupinou lineárních diarylheptanoidů, jejichž struktura obsahuje dvě oxy- substituované arylové části spojené sedmiuhlíkatým řetězcem. Tento řetězec lineárních diarylheptanoidů je nesaturovaný, obsahuje oxo funkce, enon části a 1,3-diketonovou skupinu vykazující keto-enol tautomerii. S výjimkou oxo- a hydroxylových skupin je sedmiuhlíkatý řetězec obecně bez substituce. Arylová jádra mohou být substituována symetricky nebo nesymetricky, s převládajícími substituenty jako jsou hydroxylové a methoxylové skupiny (Anand a kol. 2008). Kurkuminoidy vykazují antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, zkoumají se jako potenciální neuroprotektivní a protinádorové působky (Hinzpeter a kol. 2015).

Kurkumin, žluté až oranžové přírodní barvivo používané po staletí při vaření a v tradiční čínské medicíně, je hlavní složkou rostliny *Curcuma longa L.* *In vitro* studie s rekombinantní CBR1 prokázala, že kurkumin silně inhibuje vznik daunorubicinolu, redukovaného metabolitu daunorubicinu, který je katalyzován zejména CBR1. Kurkumin tak může zvyšovat terapeutickou efektivitu daunorubicinu a zároveň snížit jeho vedlejší účinky na srdeční tkáň (Hinzpeter a kol. 2015). Kurkumin vykazuje inhibiční působení na CBR1 jako nekompetitivní inhibitor (Piska a kol. 2017).

### **2.1.3.2. Modulace aktivity nebo exprese CBR1 pomocí terpenů**

Struktura a biosyntéza terpenů, rostlinných přírodních metabolitů, je popsána v následujících kapitolách. Výzkumné aktivity se zaměřují zejména na skupinu seskviterpenů pro jejich široké spektrum biologických aktivit popsaných v kapitole 2.2.4. V této kapitole se zaměřuji na studie zabývající se modulací aktivity nebo exprese CBR1 pomocí vybraných seskviterpenů používaných v praktické části rigorózní práce.

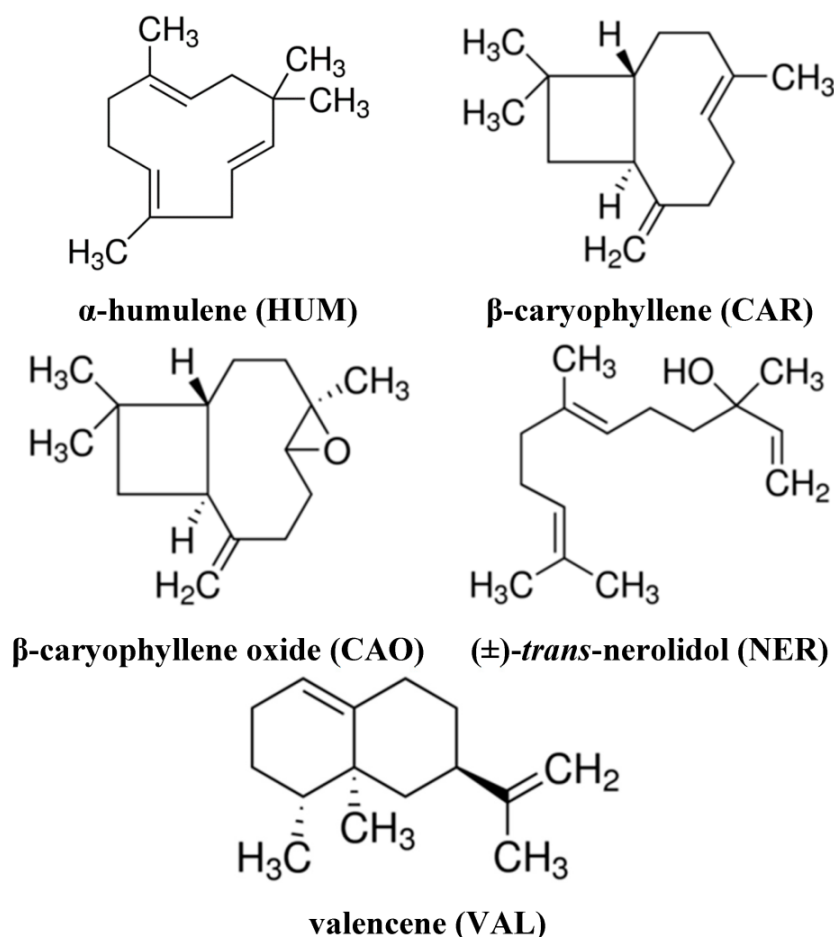
Potenciální inhibiční efekt acyklických seskviterpenů *trans*-nerolidolu, *cis*-nerolidolu a farnesolu (Obr. 3) na aktivitu hlavních enzymů metabolizujících xenobiotika, včetně karbonylredukujících enzymů, byl studován *in vitro* v lidské jaterní tkáni a jaterní tkáni potkanů. Farnesol se vyskytuje mimo jiné v jasmínové, ylangové a růžové silici. Vykazuje spektrum biologických aktivit, včetně aktivit antioxidačních, protizánětlivých, protialergických, chemoprotektivních a protinádorových. Nerolidol je alelický isomer farnesolu, vyskytuje se ve dvou geometrických isomerech a to v *cis*- a *trans*- formě. Je například součástí silice z niaouli a nerolové silice. Je běžnou složkou mnoha jídel a kosmetických produktů. Vykazuje mnoho biologických funkcí včetně antioxidačních, antibakteriálních, protiparazitárních a protinádorových. Uvedené seskviterpeny neměly významný efekt na aktivitu karbonylredukujících enzymů, včetně CBR1 (Špičáková a kol. 2017).



Obr. 3 Struktura seskviterpenů *trans*- nerolidolu, *cis*- nerolidolu a farnesolu (Špičáková a kol. 2017).

V *in vivo* studii provedené Lněničkovou a kol. (2018) byl sledován efekt *p.o.* podávání seskviterpenů  $\beta$ -karyofylenoxidu a *trans*-nerolidolu na různé enzymy metabolizující xenobiotika - včetně CBR1, a to v játrech a tenkém střevě myši.  $\beta$ -karyofylenoxid se vyskytuje například v bazalce (*Occimum* spp.) a šalvěji (*Salvia glutinosa*), nerolidol v pepři (*Piper* spp.), v jehličnanech (*Fokienia hodginsii*) a hořkém melounu (*Momordica charantia*) (Fidy a kol. 2016, Lněničková a kol. 2018). Naměřené hodnoty aktivity CBR1 byly překvapivé. Ve tkáni tenkého střeva byla aktivita CBR1 po šesti i dvacetičtyřech hodinách léčby seskviterpeny nezměněná, zatímco v jaterní tkáni byla po 6 hodinách naměřená mírně snížená aktivita CBR1 a po dvacetičtyřech hodinách byla její aktivita zvýšená oproti kontrole o přibližně 20 %. Seskviterpeny tedy mohou být reversibilními inhibitory aktivity CBR1 (Lněničková a kol. 2018).

Seskviterpeny  $\beta$ -karyofylen,  $\beta$ -karyofylenoxid,  $\alpha$ -humulen, *trans*-nerolidol a valencen (Obr. 4) jsou základní složkou silice z listů subtropického asijského ovocného stromu *Myrica rubra*, která vykazuje významný antiproliferativní efekt. Všechny tyto seskviterpeny vykazovaly ve studii provedené Ambrožem a kol. 2015 schopnost selektivně zvyšovat koncentraci doxorubicinu v nádorových buňkách, v nenádorových buňkách koncentraci doxorubicinu neovlivňovaly.  $\beta$ -karyofylenoxid,  $\alpha$ -humulen, *trans*-nerolidol a valencen inhibovaly proliferaci nádorových buněk, přičemž neovlivňovaly životaschopnost jaterních buněk. Navíc  $\beta$ -karyofylenoxid a valencen byly schopny zvýšit prooxidační efekt doxorubicinu v nádorových buňkách.  $\beta$ -karyofylenoxid také zmírňoval toxicitu doxorubicinu v buňkách jater (Ambrož a kol. 2015).



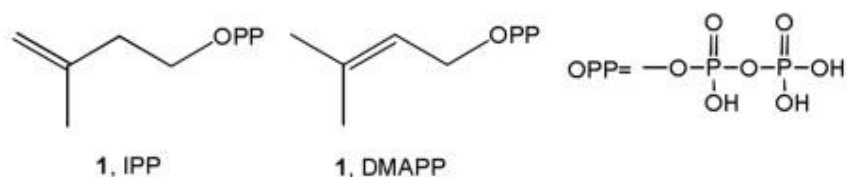
Obr. 4 Struktura testovaných seskviterpenů (Ambrož a kol. 2015).

## 2.2. Seskviterpeny

### 2.2.1. Struktura a biosyntéza terpenů

Terpeny obecně představují nejrozmanitější třídu rostlinných sekundárních metabolitů. Podle odhadů se v rostlinách vyskytuje více než 25 000 terpenových sloučenin. Strukturně náleží terpeny k isoprenům. Klasifikujeme je podle počtu isoprenových jednotek do pěti kategorií a to na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny a tetraterpeny (Huang a kol. 2012).

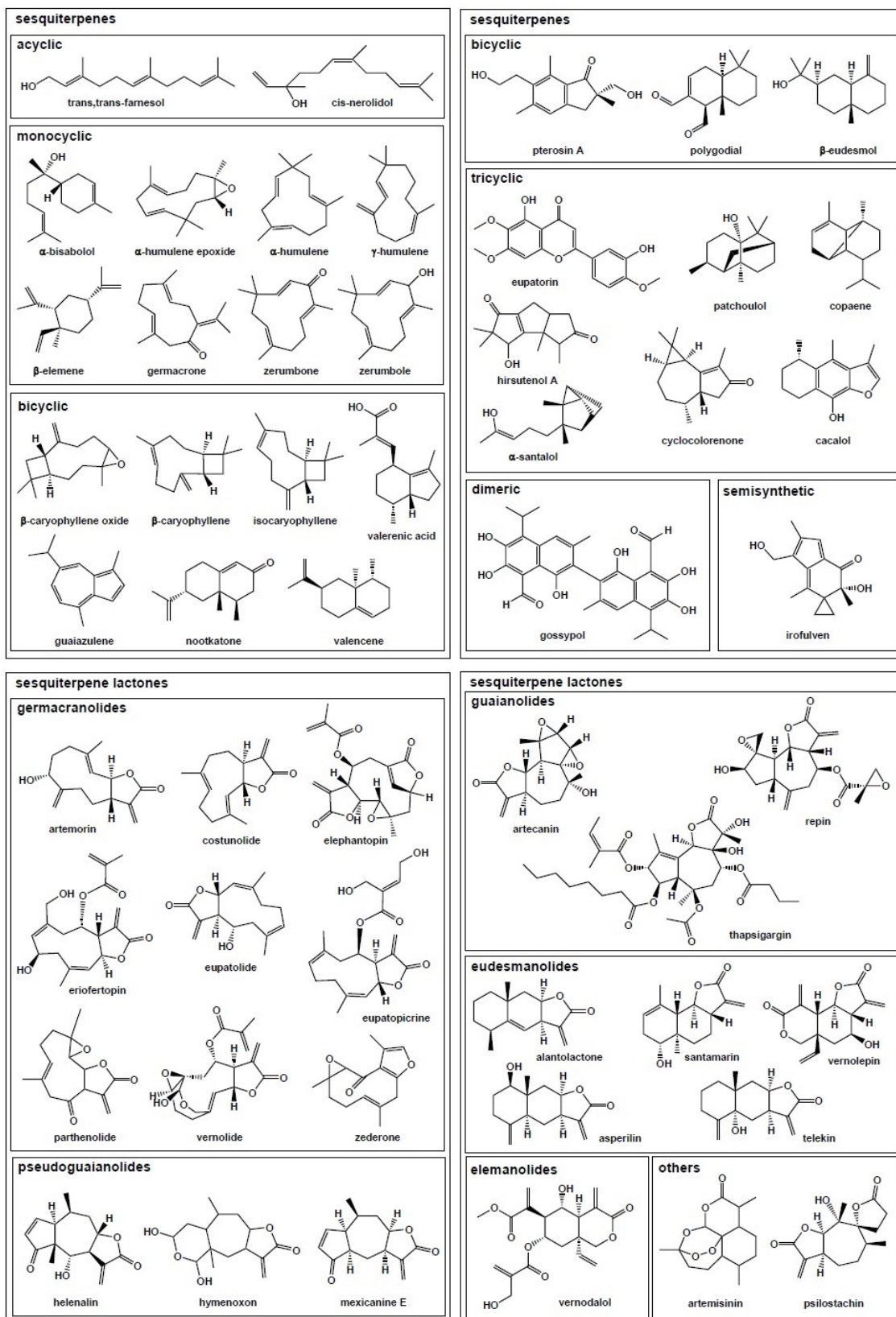
Terpeny jsou odvozeny od universálního pětiuhlíkatého prekursoru isopentenyl difosfátu (IPP) a jeho isomeru dimethylallyl difosfátu (DMAPP), které jsou uvedeny v Obr. 5 (Oldfield 2010).



Obr. 5 Biosyntéza terpenů (isoprenů) začíná vytvořením isopentenyl difosfátu (IPP) a dimethylallyl difosfátu (DMAPP) (Oldfield 2010).

IPP a DMAPP jsou ve vyšších rostlinách produkovány dvěma nezávislými biosyntetickými cestami umístěnými v oddělených nitrobuněčných kompartmentech. V cytosolu vznikají tyto základní stavební jednotky terpenů cestou mevalonové kyseliny (MVA), která začíná kondenzací 2 molekul acetylkoenzymu A. V plastidech jsou IPP a DMAPP syntetizovány z pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu cestou methylerythritolfosfátu (MEP) (Obr. 6). Cytosolický IPP slouží jako prekursor pro tvorbu farnesyldifosfátu (FPP) a následně seskviterpenů a triterpenů, zatímco IPP tvořený v plastidech poskytuje prekursory pro syntézu geranyldifosfátu (GPP) a geranylgeranyldifosfát (GGPP) následně pro tvorbu mono-, di- a tetraterpenů (Cheng a kol. 2007). Navzdory kompartmentizaci syntézy IPP a DMAPP v rostlinné buňce





Obr. 7 Klasifikace seskviterpenů s jednotlivými příklady (Bártíková a kol. 2014).

### **2.2.3. Výskyt a význam seskviterpenů**

Seskviterpeny jsou sekundární metabolity produkované nejen ve vyšších rostlinách, ale také u hub a bezobratlých (Bártíková a kol. 2014). U rostlin jsou terpeny produkovány ve vegetativních tkáních, květech a někdy i kořenech. Monoterpeny a seskviterpeny jsou hlavními těkavými sloučeninami, které produkují rostliny při napadení býložravci a tak se brání dalšímu poškození. Některé tyto látky slouží jako přímá obrana proti býložravcům nebo mikrobiálním patogenům, případně hrají roli ve vztazích s okolním prostředím nebo mezi rostlinami navzájem (Cheng a kol. 2007).

Seskviterpeny se vyskytují v lidském jídle a často jsou také součástí potravních doplňků, kosmetiky a lidové medicíny, nejčastěji jako součásti rostlinných silic. Mohou se stát bohatým rezervoárem sloučenin pro objevování nových léčiv, protože některé seskviterpeny a jejich deriváty vykazují zajímavé biologické aktivity (Bártíková a kol. 2014). Například nedávné snahy ve výzkumu a vývoji léků proti rakovině odvozených od přírodních látek vedly k identifikaci množství terpenů, které různými mechanismy inhibují proliferaci rakovinných buněk a metastáz (Huang a kol. 2012).

### **2.2.4. Biologická aktivita seskviterpenů**

Seskviterpeny vykazují množství biologických aktivit. Zejména se jedná o působení protizánětlivé, antiparazitární a protirakovinné. Na druhou stranu některé seskviterpeny mohou způsobovat závažnou toxicitu a jiné nežádoucí reakce. Většina těchto aktivit je založena na oxidačním a prooxidačním působení seskviterpenů (Bártíková a kol. 2014).

Za fyziologických podmínek je koncentrace reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) v organismu malá a antioxidační systémy jsou schopné minimalizovat oxidační poškození (Bachi a kol. 2013). U všech eukaryotických organismů se vyvinul složitý vnitřní mechanismus sloužící jako ochrana proti oxidačnímu stresu (Dinkova-Kostova a Talalay 2008). Oxidační stres vzniká nerovnováhou mezi tvorbou a odstraňováním RONS. Dochází ke vzniku velkého množství reaktivních sloučenin, které poškozují biomolekuly a tím snižují životaschopnost buněk a tkání. Oxidační stres je považován za důležitý faktor při procesu stárnutí organismu a při rozvoji mnoha onemocnění včetně rakoviny, aterosklerózy, diabetu a neurodegenerativních chorob (Bachi a kol. 2013).

Obecně je ochrana buněk proti oxidačnímu stresu uskutečňována dvěma typy nízkomolekulárních antioxidantů. Prvním typem těchto sloučenin jsou přímé antioxidanty. Jedná se o redoxně aktivní sloučeniny, které vychytávají RONS. Mohou však vyvolat následné prooxidační reakce. Druhým typem těchto sloučenin jsou nepřímé antioxidanty, které mohou, ale nemusí být redoxně aktivní. Nepřímé antioxidanty slouží jako induktory antioxidantních enzymů a dalších enzymů podílejících se na ochraně buňky. Pravděpodobně nevyvolávají prooxidační reakce (Dinkova-Kostova a Talalay 2008).

Mnoho silic, jejichž hlavními složkami jsou monoterpeny a seskviterpeny, má antioxidantní vlastnosti. Také čisté seskviterpeny mohou ochraňovat zdravé buňky před oxidačním stresem a to několika mechanismy (Bártíková a kol. 2014):

1. přímým vychytáváním RONS
2. chelatací iontů kovů
3. stimulací antioxidantních ochranných mechanismů
4. zeslabením zánětu

Vedle prospěšných antioxidantních vlastností mohou seskviterpeny působit také jako prooxidanty a zvyšovat tak míru oxidačního stresu (Lee a kol. 2013).

#### **2.2.4.1. Ochrana buněk přímým vychytáváním RONS**

Byla zkoumána schopnost seskviterpenů a seskviterpenových laktonů darovat elektron a tím uplatnit antioxidantní působení. Například *trans,trans*-farnesol a *cis*-nerolidol byly schopné vychytávat hydroxylové radikály efektivněji než kyselina askorbová (Vinhols a kol. 2014). Také proces peroxidace lipidů může být zmírněn působením seskviterpenů. Například *p.o.* podávání alkoholu samcům myši vedlo k intenzivnímu zánětlivému procesu a zvýšení peroxidace lipidů v žaludku těchto zvířat. Při preventivním podávání  $\alpha$ -bisabololu v dávce 100 mg/kg došlo zcela k zastavení tvorby malondialdehydu *in vivo* (Rocha a kol. 2011).

#### **2.2.4.2. Ochrana buněk chelatací iontů kovů**

Redukované ionty přechodných kovů (např.  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$ ) jsou schopné katalyzovat tvorbu volných radikálů z peroxidů prostřednictvím Fentonovy reakce. Sloučeniny se schopností chelatovat ionty kovů ochraňují buňky před oxidačním stresem tak, že

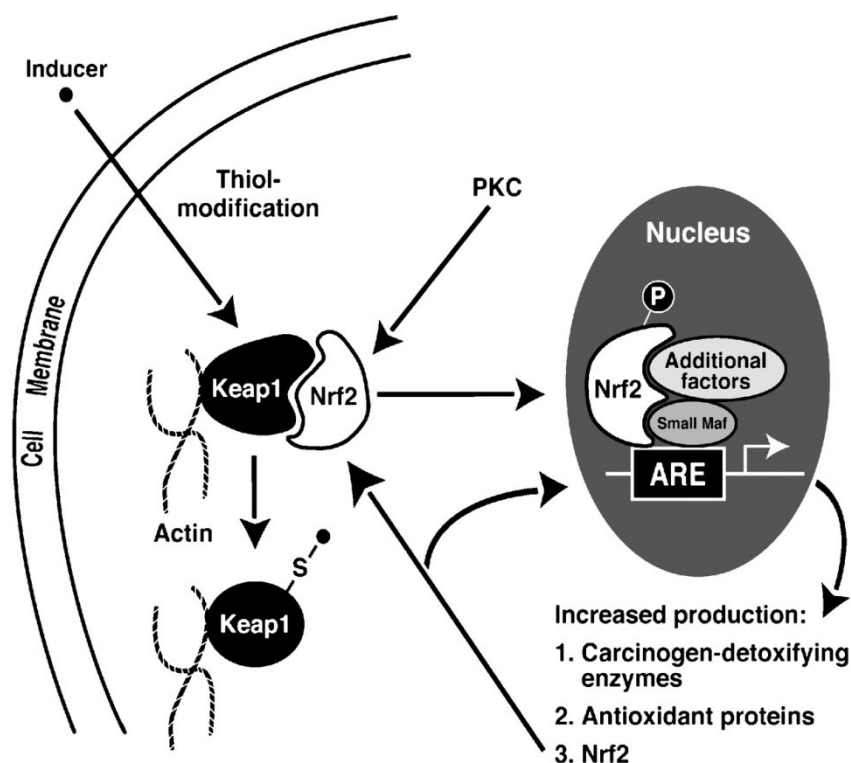
snižují koncentraci těchto iontů a zabraňují působení těchto iontů kovů jako katalyzátorů v radikálových reakcích (Bártíková a kol. 2014).

### **2.2.4.3. Ochrana buněk stimulací antioxidantních ochranných mechanismů**

Stimulace antioxidantních ochranných mechanismů probíhá cestou indukce exprese genů, které jsou schopné bojovat s nežádoucími účinky oxidačního stresu. Mezi tyto geny patří intracelulární proteiny udržující redoxní rovnováhu ( $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasa, hemoxygenasa-1), enzymy 2. fáze biotransformace (glutathion-S-transferasa) a transportéry (proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí, MRP). Všechny tyto geny jsou indukovatelné a sdílí stejnou transkripční regulaci prostřednictvím transkripčního faktoru Nrf2. Indukce transkripce těchto cytoprotektivních genů probíhá pomocí třech buněčných složek: antioxidantního responsabilního elementu (ARE), nukleárního transkripčního faktoru Nrf2 a Kelch proteinu 1 (Keap1, *Kelch-like ECH-associated protein 1*) (Dinkova-Kostova a Talalay 2008, Villeneuve a kol. 2010).

V nepřítomnosti induktoru tvoří protein Keap1 komplex s Cullinem 3 (Cul3) a potlačuje transkripční faktor Nrf2, který je vystaven ubikvitinylaci a následné degradaci v proteasomu. Po vniknutí induktoru do buňky dojde k modifikaci vysoce reaktivních cysteinových zbytků Keap1. Konformační změny vedou k uvolnění Nrf2, základního spojovacího transkripčního faktoru. Nrf2 podstoupí nukleární translokaci a v heterodimerní kombinaci s malým transkripčním faktorem *Maf* se naváže na ARE, specifickou sekvenci přítomnou v regulačních oblastech cytoprotektivních genů. Tím dojde ke spuštění základního procesu aktivace transkripce těchto genů (Dinkova-Kostova a Talalay 2008, Zhang a Gordon 2004) (Obr. 8).

Seskviterpenový lakton parthenolid prokázal silnou intracelulární antioxidantní aktivitu v buňkách hippokampu izolovaných z myší. Tento efekt byl zprostředkován zvýšením množství glutathionu (Herrera a kol. 2005).



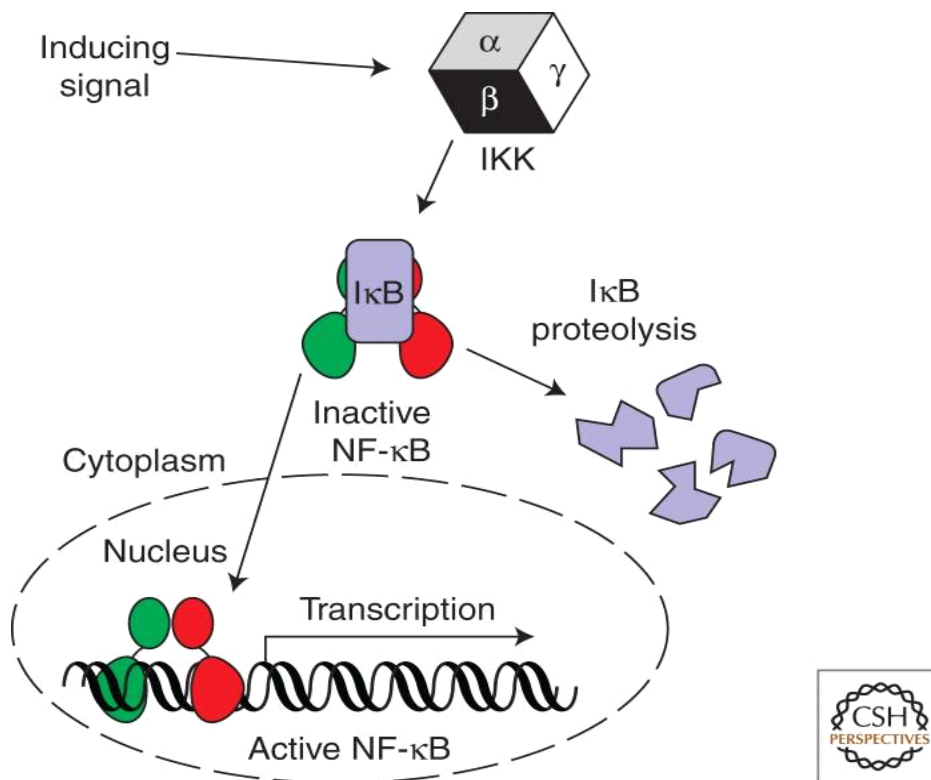
Obr. 8 Mechanismus indukce cytoprotektivních genů (Zhang a Gordon 2004).

#### 2.2.4.4. Ochrana buněk zeslabením zánětu

Zánět, fyziologická odpověď organismu na infekci a zranění, je doprovázen zvýšenou tvorbou RONS, aktivací enzymů produkujících RONS a vyplavením prozánětlivých cytokinů (Bollrath a Greten 2009). Mezi prozánětlivé cytokiny, účastníci se časné fáze zánětu, patří rodina interleukinů 1. typu (IL), například IL-1a, IL-1b, tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), TNF  $\beta$  a IL-18. Navázání těchto cytokinů na povrch receptorů cílových buněk vede k aktivaci dvou hlavních transkripčních faktorů - nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) a aktivačního proteinu 1 (AP-1) (Bártíková a kol. 2014).

NF- $\kappa$ B, transkripční faktor přítomný ve všech eukaryotických buňkách, hraje důležitou roli při zánětlivém procesu a při imunitních reakcích. NF- $\kappa$ B indukuje v imunitních buňkách transkripci genů, které kódují prozánětlivé cytokiny, a je považován za potencionální spojení mezi zánětem a rakovinou (Bollrath a Greten 2009, Surh 2008). Tento transkripční faktor je za normálních okolností umístěn v cytoplasmě jako inaktivní komplex s inhibičním proteinem  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B). Po stimulaci mitogeny, prozánětlivými cytokiny, UV zářením, virovou infekcí či bakteriálními toxiny je

fosforylován I- $\kappa$ B-kinasou nebo MAP-kinasou. Fosforylovaný I- $\kappa$ B je po ubikvitinylaci translokován do proteasomu k proteolytické degradaci. Uvolnění I- $\kappa$ B umožňuje NF- $\kappa$ B přesunout se do jádra a navázat se na promotorové oblasti cílových prozánětlivých genů a tak kontrolovat jejich expresi (Obr. 9) (Surh 2008, Huxford a Ghosh 2009).



Obr. 9 Indukce transkripce prozánětlivých cytokinů pomocí NF- $\kappa$ B (Huxford a Ghosh 2009).

Sloučeniny s protizánětlivou aktivitou zabraňují oxidačnímu stresu (Surh 2008). Například  $\alpha$ -humulen a *trans*-karyofylen, seskviterpeny identifikované v silici *Cordia verbenacea* (*Boraginaceae*), prokázaly v rozdílných experimentálních modelech topický i systémový protizánětlivý účinek (Medeiros 2007).  $\alpha$ -Humulen působí inhibici cesty NF- $\kappa$ B, což vede ke snížení množství prozánětlivých cytokinů jako TNF  $\alpha$ , IL-1b a prostaglandinu E<sub>2</sub> (Bártíková a kol. 2014).

#### **2.2.4.5. Prooxidační efekt seskviterpenů**

Kromě prospěšných antioxidačních vlastností mohou seskviterpeny také prohlubovat oxidační stres a tím působit jako prooxidanty. Prooxidační efekt přírodních látek je vysoce závislý na původním redoxním stavu buňky, který podmiňuje citlivost k cytotoxickým účinkům těchto sloučenin (Lee a kol. 2013). Proto není jednoduché předvídat celkový dopad působení terpenů, který navzdory jejich antioxidačním vlastnostem může způsobit poškození kvůli převažujícím prooxidačním podmínkám (Bártíková a kol. 2014).

Rozlišujeme dva hlavní mechanismy prooxidačního působení terpenů. První cestou, jak se tyto sloučeniny mohou stát prooxidanty, je redukce oxidovaných forem iontů kovů. Za fyziologických podmínek je většina iontů kovů vázána na bílkoviny ve formě neaktivních komplexů, pouze malé množství se jich vyskytuje ve volné formě. Je-li v buňce přítomné nadměrné množství iontů kovů (např. v nádorových buňkách), rostlinné antioxidanty redukují oxidovanou formu iontů kovů a ty se pak mohou účastnit Fentonovy reakce. Výsledkem Fentonovy reakce je vznik velkého množství hydroxylových radikálů, které buňky poškozují, a přírodní látky se tak stávají prooxidanty (Lee a kol. 2013).

Druhým mechanismem je produkce ROS díky depleci glutathionu sloučeninami s elektrofilní skupinou. Přírodní sloučeniny s elektrofilní skupinou mohou tvořit kovalentní vazbu s cysteinovými zbytky bílkovin. Množství glutathionu, nejhojnějšího peptidu obsahujícího cysteinové zbytky, může být rychle vyčerpáno díky jeho navázání na elektrofilní přírodní sloučeniny. Při sníženém množství glutathionu je oslabená schopnost buňky vylučovat ROS a dochází ke zvýšení množství ROS v buňce.

Z tohoto důvodu vykazují elektrofilní přírodní látky vyšší prooxidační účinek v nádorových buňkách s vysokou bazální produkcí ROS, a tak dochází k překročení množství ROS, které jsou tyto buňky schopné tolerovat. Naproti tomu stejné dávky přírodních látek vykazují zanedbatelný prooxidační efekt v normálních buňkách s nízkou bazální produkcí ROS a podporují antioxidační schopnosti buňky díky aktivaci transkripčního faktoru Nrf2 (Lee a kol. 2013).

Seskviterpeny se tedy jeví jako nadějně protinádorové působky. Jejich terapeutický potenciál je založen na myšlence, že nádorové buňky se zvýšenou produkcí ROS jsou náchylnější k dalšímu oxidačnímu poškození indukovanému látkami produkujícími ROS nebo sloučeninami ovlivňujícími antioxidační systém buněk. Tím dochází ke zvýšení oxidačního stresu v nádorové buňce nad tolerovaný limit a je spuštěn proces apoptózy a buněčné smrti (Trachootham a kol. 2009, Lee a kol. 2013). Proto je ovlivňování množství ROS pomocí redoxní modulace cestou jak selektivně zničit nádorové buňky bez významné toxicity pro buňky normální (Trachootham a kol. 2009).

Prooxidační vlastnosti seskviterpenů mohou být také spojeny s jejich prospěšným biologickým působením, jako je působení antiparazitární, protizánětlivé, antibakteriální, protivirové a protiplísňové (Chaturvedi 2011).

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem mé rigorózní práce bylo zjistit, zda mohou seskviterpeny valencen,  $\beta$ -karyofilenoxid,  $\alpha$ -humulen, *cis*-nerolidol a *trans*-nerolidol ovlivňovat aktivitu CBR1. Vliv studovaných látek na aktivitu tohoto enzymu jsem sledovala jednak v cytosolické frakci získané z jater potkana a také na rekombinantně připravené lidské CBR1. K tomu bylo nutné provést následující kroky:

1. Zjištění vlivu jednotlivých seskviterpenů na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*:
  - a) Stanovení koncentrace bílkoviny v cytosolu metodou BCA
  - b) Inkubace cytosolu s jednotlivými seskviterpeny v koncentraci 1, 10 a 100  $\mu$ M
  - c) Stanovení aktivity CBR1 pomocí metody podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem
  
2. Sledování vlivu jednotlivých seskviterpenů na aktivitu rekombinantní CBR1:
  - a) Inkubace rekombinantní lidské CBR1 s jednotlivými seskviterpeny v koncentraci 100  $\mu$ M po dobu 10 a 20 minut
  - b) Stanovení aktivity CBR1 pomocí metody podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1. Použitý materiál

Rekombinantní lidská CBR1	MyBioSource
NADPH	Merck spol. s.r.o.
Menadion	Sigma-Aldrich
Cytosol z jater potkana	Katedra biochemických věd
<i>Trans</i> -nerolidol	Sigma-Aldrich
<i>Cis</i> -nerolidol	Sigma-Aldrich
<i>Alfa</i> -humulen	Sigma-Aldrich
<i>Beta</i> -karyofilenoxid	Sigma-Aldrich
Valencen	Sigma-Aldrich

Ostatní běžné chemikálie čistoty p.a. jsem používala od firem Sigma-Aldrich a PENTA s.r.o.

### 4.2. Použitá zařízení

Digitální analytické váhy Sartorius  
Magnetická míchačka, Biosan  
pH-metr, inoLab  
Programovatelný termomixer Thermomixer Comfort, Eppendorf  
Laboratorní třepačka Orbital Shaker, Biosan  
Čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200

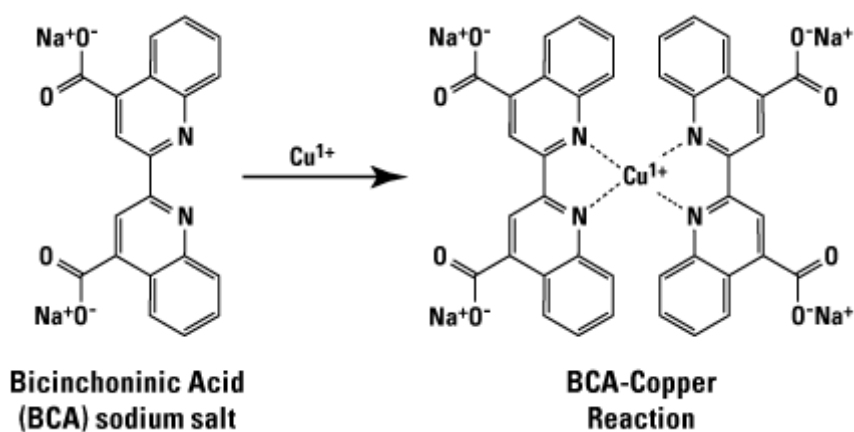
## 4.3. Metodika

### 4.3.1. Prováděná stanovení

#### 4.3.1.1. Stanovení koncentrace bílkoviny metodou BCA

##### *Princip*

Principem metody je reakce měďnatých iontů s proteiny v alkalickém prostředí. Působením proteinů přechází  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^{1+}$  za redukce bicinchinové kyseliny (BCA). Vzniká modrofialový chelát, jehož intenzita zabarvení je přímo úměrná množství bílkoviny ve vzorku.



Obr. 10 Tvorba chelátu z BCA a měďných iontů (ThermoFisher 2019).

##### *Příprava roztoků*

###### *Roztok A*

Roztok od výrobce Thermo Fisher Scientific obsahující  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a BCA v 0,1 M NaOH.

###### *Roztok B*

Roztok s obsahem 4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  od výrobce Thermo Fisher Scientific.

###### *Roztok C*

Smícháním 50 dílů roztoku A a 1 dílu roztoku B jsem připravila roztok C.

### *Postup stanovení*

Výchozí roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 2 mg/ml jsem použila pro přípravu standardní koncentrační řady ředěním podle Tab. 1.

Tab. 1 Příprava standardní koncentrační řady ředěním roztoku BSA 2 mg/ml

Vzorek	Roztok BSA 2 mg/ml [μl]	Redestilovaná voda [μl]	Koncentrace [μg/ml]
1	0	100	0
2	10	90	200
3	20	80	400
4	30	70	600
5	40	60	800
6	50	50	1000

Potom jsem si připravila vzorky obsahující bílkovinu v ředění 10x a 20x a kontrolní vzorky. Do každé jamky mikrotitrační destičky jsem pipetovala vždy 10 μl vzorku bílkoviny a 200 μl roztoku C. Mikrotitrační destičku jsem nechala inkubovat 15 minut při 37 °C v termomixéru.

Na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 jsem měřila absorbanci vzorků v jejich maximu 562 nm a poté jsem vypočítala obsah bílkovin v jednotlivých vzorcích pomocí kalibrační přímky.

#### **4.3.1.2. Vliv seskviterpenů na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana**

##### *Princip*

Metoda je založena na inkubaci subcelulární frakce se substrátem menadionem podle Maté a kol. 2008. Menadion je biotransformován karbonylreduktasou za současné oxidace NADPH. Tato reakce je fotometricky zaznamenána jako pokles absorbance a s použitím molárního absorpčního koeficientu NADPH lze kvantitativně vyjádřit aktivitu CBR.

## *Příprava roztoků*

### *Příprava 0,1 M K-fosfátového pufru (pH 7,4)*

Do odměrné baňky jsem navážila 8,71 g  $K_2HPO_4$  a doplnila redestilovanou vodou do 500 ml. Do druhé odměrné baňky jsem navážila 2,72 g  $KH_2PO_4$  a doplnila redestilovanou vodou do 200 ml. Oba roztoky jsem v kádince vzájemně smísila do dosažení pH 7,4, které jsem zkontrolovala na pH metru. Výsledný roztok jsem nechala 15 minut míchat na magnetické míchačce a poté jsem provedla kontrolu pH na pH-metru. Případné odchylky od pH 7,4 jsem upravila pomocí výchozích vodných roztoků  $K_2HPO_4$  nebo  $KH_2PO_4$ .

### *Roztok menadionu 50mM*

Potřebné množství menadionu jsem navážila a rozpustila v odpovídajícím množství 96% ethanolu tak, aby koncentrace výsledného roztoku byla 50 mM.

### *Vodný roztok NADPH 5 mM*

Potřebné množství NADPH jsem rozpustila v odpovídajícím množství redestilované vody tak, aby vznikl 5 mM roztok. Před použitím jsem uchovávala v ledu.

### *Příprava inhibitorů*

Inhibitory jsem připravila ve třech koncentracích:

1. 10 mM roztok seskviterpenu jsem připravila rozpuštěním potřebného množství seskviterpenu v dimethylsulfoxidu (DMSO).
2. 1 mM roztok seskviterpenu jsem získala naředěním 10 mM roztoku pomocí DMSO.
3. 0,1 mM roztok seskviterpenu jsem poté získala naředěním 1 mM roztoku v DMSO.

### *Postup stanovení*

Cytosol z jater potkana jsem naředila 10x pomocí 0,1 M K-fosfátového pufru. Poté jsem si připravila vzorky daného seskviterpenu (SQT) ve třech koncentracích a kontrolní vzorek podle Tab. 2.

Tab. 2 Příprava vzorků seskviterpenů o výsledné koncentraci 0 μM, 1 μM, 10 μM a 100 μM.

Vzorek	Cytosol řed. 10x [μl]	Roztok DMSO [μl]	10 mM SQT [μl]	1 mM SQT [μl]	0,1 mM SQT [μl]	Výsledná koncentrace [μM]
1	99	1	-	-	-	0
2	99	-	1	-	-	100
3	99	-	-	1	-	10
4	99	-	-	-	1	1

Vzorky jsem nechala inkubovat 10 min. při 25 °C v termomixéru. Připravila jsem mastermix o složení 178 μl K-fosfátového pufru (0,1 M, pH 7,4), 2 μl menadionu (50mM) a 10 μl NADPH (5 mM). Do jednotlivých jamek mikrotitrační GAMA destičky jsem pipetovala vždy po 10 μl vzorku ke kterému jsem přidala 190 μl mastermixu. Celkový objem reakční směsi v jedné jamce byl tedy 200 μl. Destičku jsem okamžitě přenesla a vložila do čtečky přístroje Tecan Infinite M200. Pokles absorbance jsem sledovala při vlnové délce 340 nm po dobu 5 min. při 37 °C.

Aktivitu CBR1 jsem vyhodnocovala podle následujícího vzorce:

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz.} - \Delta A_{sl.}) * 1000 * V_i}{\epsilon_{NADPH} * l * V_s}$$

aktivita	aktivita CBR [nmol/min/ml]
$\Delta A_{vz.}$	pokles absorbance vzorku za minutu zjištěn z oblasti lineárního poklesu
$\Delta A_{sl.}$	pokles absorbance slepého vzorku za minutu
$V_i$	objem reakční směsi [ml], tj. 0,2 ml
$\epsilon_{NADPH}$	molární absorpční koeficient NADPH [ $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ], tj. $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$l$	délka měřené vrstvy [cm], tj. 0,75 cm
$V_s$	objem vzorku [ml], tj. 0,01 ml

Jednotky aktivity jsem přepočítala na mg proteinu.

### 4.3.1.3. Vliv seskviterpenů na aktivitu rekombinantní lidské CBR1 *in vitro*

#### *Princip*

Princip stanovení je stejný jako u předchozí metody 4.3.1.2.

#### *Příprava 0,1 M K-fosfátového pufru (pH 7,4)*

Do odměrné baňky jsem navážila 8,71 g  $K_2HPO_4$  a doplnila redestilovanou vodou do 500 ml. Do druhé odměrné baňky jsem navážila 2,72 g  $KH_2PO_4$  a doplnila redestilovanou vodou do 200 ml. Oba roztoky jsem v kádince vzájemně smísila do dosažení pH 7,4, které jsem zkontrolovala na pH metru. Výsledný roztok jsem nechala 15 minut míchat na magnetické míchače a poté jsem provedla kontrolu pH na pH-metru. Případné odchylky od pH 7,4 jsem upravila pomocí výchozích vodných roztoků  $K_2HPO_4$  nebo  $KH_2PO_4$ .

#### *Roztok menadionu 50mM*

Potřebné množství menadionu jsem navážila a rozpustila v odpovídajícím množství 96% ethanolu tak, aby koncentrace výsledného roztoku byla 50 mM.

#### *Vodný roztok NADPH 5 mM*

Potřebné množství NADPH jsem rozpustila v odpovídajícím množství redestilované vody tak, aby vznikl 5 mM roztok. Před použitím jsem uchovávala v ledu.

#### *Příprava seskviterpenů*

Jednotlivé seskviterpeny jsem připravila v koncentraci 10 mM rozpuštěním potřebného množství seskviterpenu v dimethylsulfoxidu (DMSO). Vzorky jsem poté připravila o výsledné koncentraci seskviterpenů 100  $\mu$ M, a to rozpuštěním 50  $\mu$ l CBR1 o koncentraci 100  $\mu$ g/ml se 49  $\mu$ l 0,1 M K-fosfátového pufru a 1  $\mu$ l jednotlivých SQT o koncentraci 10 mM. Kontrolní vzorek byl připraven rozpuštěním 50  $\mu$ l CBR1 o koncentraci 100  $\mu$ g/ml se 49  $\mu$ l 0,1 M K-fosfátového pufru a 1  $\mu$ l DMSO.

#### *Příprava slepých vzorků pro jednotlivé seskviterpeny*

Slepé vzorky bez CBR1 jsem připravila rozpuštěním 99  $\mu$ l 0,1 M K-fosfátového pufru a 1  $\mu$ l jednotlivých SQT o koncentraci 10 mM, jako kontrola byl použit 1  $\mu$ l DMSO

rozpuštěný v 99  $\mu\text{l}$  0,1 M K-fosfátového pufru . Tyto slepé vzorky seskviterpenů jsem stanovovala pro ověření, zda seskviterpeny neovlivňují absorpční poměr přímo.

### *Postup stanovení*

Vzorky jsem pro první část měření nechávala inkubovat 10 min. při 25 °C v termomixéru. Pro další část měření jsem vzorky inkubovala 20 min. při 25 °C v termomixéru. Připravila jsem mastermix o složení 178  $\mu\text{l}$  K-fosfátového pufru (0,1 M, pH 7,4), 2  $\mu\text{l}$  menadionu (50mM) a 10  $\mu\text{l}$  NADPH (5 mM). Do jednotlivých jamek mikrotitrační GAMA destičky jsem pipetovala vždy po 10  $\mu\text{l}$  vzorku ke kterému jsem přidala 190  $\mu\text{l}$  mastermixu. Celkový objem reakční směsi v jedné jamce byl tedy 200  $\mu\text{l}$ . Destičku jsem okamžitě přenesla a vložila do čtečky přístroje Tecan Infinite M200. Pokles absorbance jsem sledovala při vlnové délce 340 nm po dobu 5 min. při 37 °C.

Aktivitu CBR1 jsem vyhodnocovala podle následujícího vzorce:

$$\text{aktivita} = \frac{(\Delta A_{\text{vz.}} - \Delta A_{\text{sl.}}) * 1000 * V_i}{\epsilon_{\text{NADPH}} * l * V_s}$$

aktivita	aktivita CBR [nmol/min/ml]
$\Delta A_{\text{vz.}}$	pokles absorbance vzorku za minutu zjištěn z oblasti lineárního poklesu
$\Delta A_{\text{sl.}}$	pokles absorbance slepého vzorku za minutu
$V_i$	objem reakční směsi [ml], tj. 0,2 ml
$\epsilon_{\text{NADPH}}$	molární absorpční koeficient NADPH [ $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ], tj. 6,22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$l$	délka měřené vrstvy [cm], tj. 0,75 cm
$V_s$	objem vzorku [ml], tj. 0,01 ml

Jednotky aktivity jsem přepočítala na mg proteinu.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Vliv jednotlivých seskviterpenů na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*

Cílem této části práce bylo zjistit, zda seskviterpeny valencen,  $\beta$ -karyofilenoxid,  $\alpha$ -humulen, *trans*-nerolidol a *cis*-nerolidol ovlivňují *in vitro* aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana.

K měření jsem použila metodu podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem. Jednotlivé seskviterpeny jsem připravila ve třech koncentracích naředěním v roztoku DMSO, a to v koncentraci 10 mM, 1 mM a 0,1 mM. Cytosol z jater potkana jsem naředila 10x. Vzorky jsem dále připravila podle výše uvedené Tab. 2. Výsledné koncentrace seskviterpenů ve vzorku byly tedy 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Inkubace probíhala 10 min. při 25 °C v termomixéru a do reakční směsi o celkovém objemu 200  $\mu$ l jsem pipetovala vždy 10  $\mu$ l vzorku. Pomocí poklesu absorbance naměřeného spektrofotometricky a s použitím molárního absorpčního koeficientu NADPH jsem vypočítala aktivitu CBR1 [nmol/min/ml].

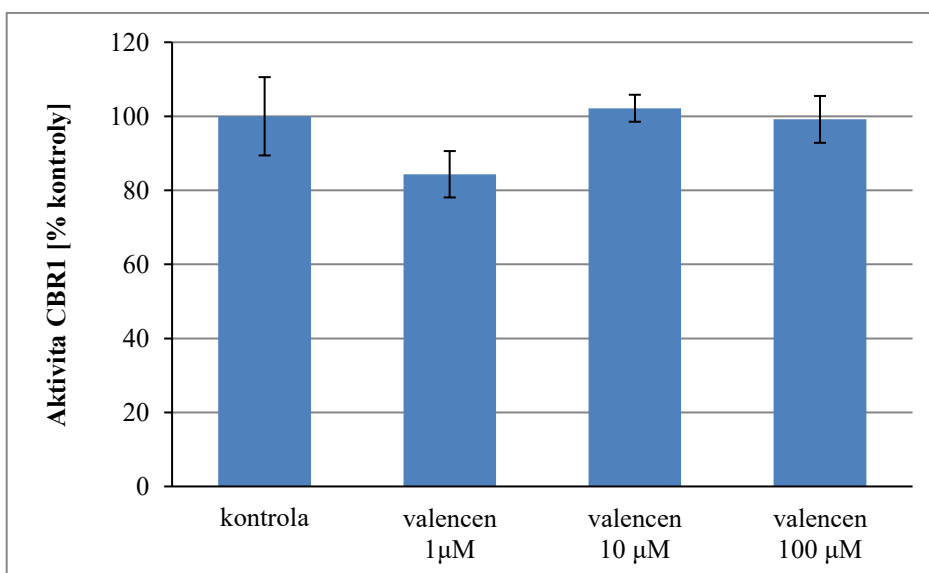
Dále jsem stanovila obsah bílkovin v cytosolu z jater potkana metodou BCA. Na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 jsem měřila absorbanci vzorků v jejich maximu 562 nm a poté jsem vypočítala obsah bílkovin v jednotlivých vzorcích pomocí kalibrační přímky. Pomocí zjištěného množství bílkoviny v cytosolu jsem přepočítala aktivitu CBR1 [nmol/min/mg]. Průměrné výsledky aktivity CBR1 inkubované s jednotlivými seskviterpeny o výsledných koncentracích 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M ze třech nezávislých měření jsem zaznamenala do Tab. 3. Ve výsledkové části dále uvádím grafy aktivity CBR1 v % kontroly.

Tab. 3 Naměřené průměrné hodnoty aktivity CBR1 při inkubaci s jednotlivými seskviterpeny. Data jsou uvedena jako průměr ze 3 měření  $\pm$  SD.

Aktivita CBR1 [nmol/min/mg] $\pm$ SD					
Koncentrace SQT [ $\mu$ M]	Valencen	$\beta$ -karyofilen-oxid	$\alpha$ -humulen	Cis-nerolidol	Trans-nerolidol
0	23,3 $\pm$ 2,5	26,8 $\pm$ 6,0	20,4 $\pm$ 2,5	23,2 $\pm$ 3,2	25,3 $\pm$ 0,9
1	19,6 $\pm$ 1,5	19,8 $\pm$ 3,1	20,3 $\pm$ 2,6	21,5 $\pm$ 1,8	24,7 $\pm$ 2,4
10	23,8 $\pm$ 0,9	23,0 $\pm$ 4,6	20,8 $\pm$ 1,5	24,7 $\pm$ 4,3	27,5 $\pm$ 1,7
100	23,1 $\pm$ 1,5	23,2 $\pm$ 4,9	18,8 $\pm$ 1,4	21,7 $\pm$ 2,0	21,7 $\pm$ 0,9

### 5.1.1. Vliv valencenu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*

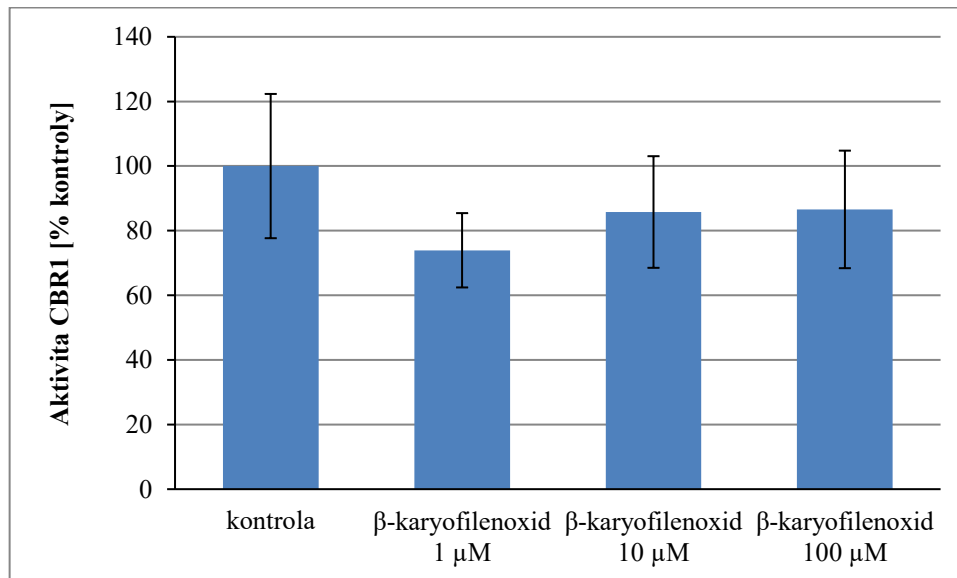
Výsledky měření zjištěné metodou podle Maté a kol. (2008) jsem vynesla do grafu, kde jsou zaznamenány průměrné hodnoty aktivity CBR1 v % kontroly se směrodatnou odchylkou ze třech nezávislých měření. Valencen nevykazoval významný inhibiční efekt na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*.



Obr. 11 Vliv valencenu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro* za použití substrátu menadionu. Data jsou vyjádřena jako aktivita CBR1 v %  $\pm$  SD. Každý bod představuje průměr ze 3 nezávislých experimentů (\* Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

### 5.1.2. Vliv $\beta$ -karyofilenoxidu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*

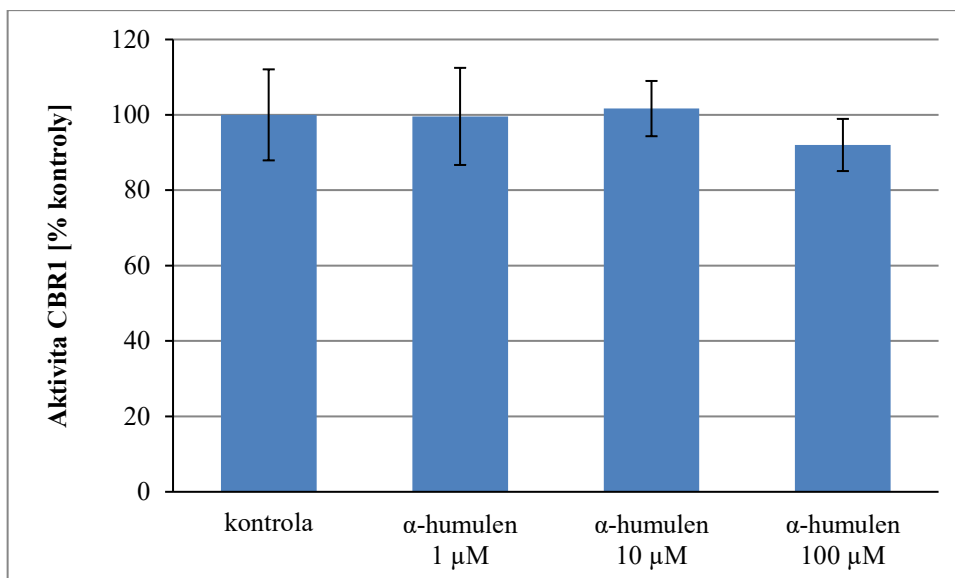
$\beta$ -Karyofilenoxid vykázal určitý inhibiční vliv na aktivitu CBR1, když snížil aktivitu tohoto enzymu o 13,4 až 26,1 %. Tento účinek však nebyl statisticky významný.



Obr. 12 Vliv  $\beta$ -karyofilenoxidu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro* za použití substrátu menadionu. Data jsou vyjádřena jako aktivita CBR1 v %  $\pm$  SD. Každý bod představuje průměr ze 3 nezávislých experimentů (\* Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

### 5.1.3. Vliv $\alpha$ -humulenu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*

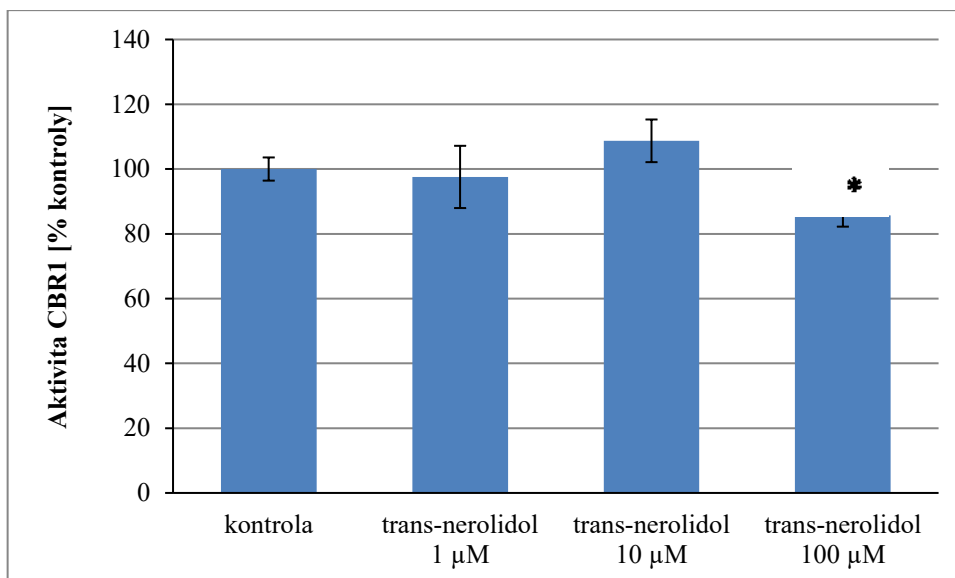
Data z tohoto grafu vyjadřují průměrné hodnoty aktivity CBR1 v % v cytosolu z jater potkana při působení  $\alpha$ -humulenu *in vitro*.  $\alpha$ -Humulen neměl vliv na aktivitu CBR1.



Obr. 13 Vliv  $\alpha$ -humulenu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro* za použití substrátu menadionu. Data jsou vyjádřena jako aktivita CBR1 v %  $\pm$  SD. Každý bod představuje průměr ze 3 nezávislých experimentů (\* Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

#### 5.1.4. Vliv *trans*-nerolidolu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*

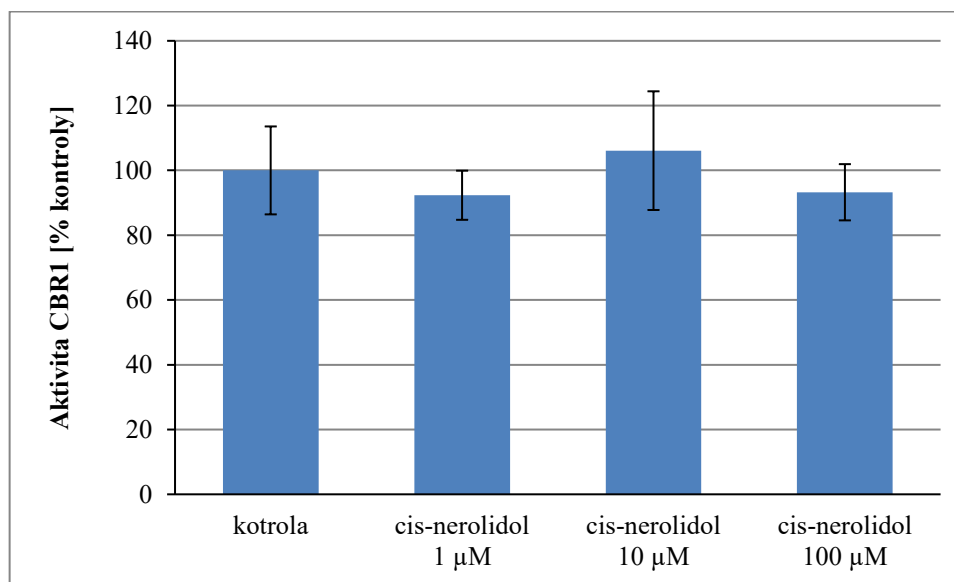
*Trans*-nerolidol jako jediný ze zkoumaných seskviterpenů v koncentraci 100  $\mu$ M vykazoval signifikantní vliv na aktivitu CBR1. Tento seskviterpen vykazoval mírnou inhibiční aktivitu na CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*, když snížil její aktivitu o 14,3 % ve srovnání s kontrolou.



Obr. 14 Vliv *trans*-nerolidolu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro* za použití substrátu menadionu. Data jsou vyjádřena jako aktivita CBR1 v %  $\pm$  SD. Každý bod představuje průměr ze 3 nezávislých experimentů (\* Studentův t-test,  $p < 0,05$ , \*\* Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).

### 5.1.5. Vliv *cis*-nerolidolu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*

Podle naměřených výsledků neměl *cis*-nerolidol významnější inhibiční vliv na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*.



Obr. 15 Vliv *cis*-nerolidolu na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro* za použití substrátu menadionu. Data jsou vyjádřena jako aktivita CBR1 v %  $\pm$  SD. Každý bod představuje průměr ze 3 nezávislých experimentů, tedy  $n = 3$  (\* Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

## 5.2. Vliv jednotlivých seskviterpenů na aktivitu rekombinantní lidské CBR1 *in vitro*

Cílem této části práce bylo zjistit přímý vliv valencenu,  $\beta$ -karyofilenoxidu,  $\alpha$ -humulenu, *cis*-nerolidolu a *trans*-nerolidolu na aktivitu rekombinantní CBR1 *in vitro*. Pro veškeré pokusy s CBR1 jsem používala rekombinantní lidskou karbonylreduktasu 1 připravenou v kvasinkách *Sacharomyces cerevisiae* od firmy MyBioSource o koncentraci 1 mg/ml.

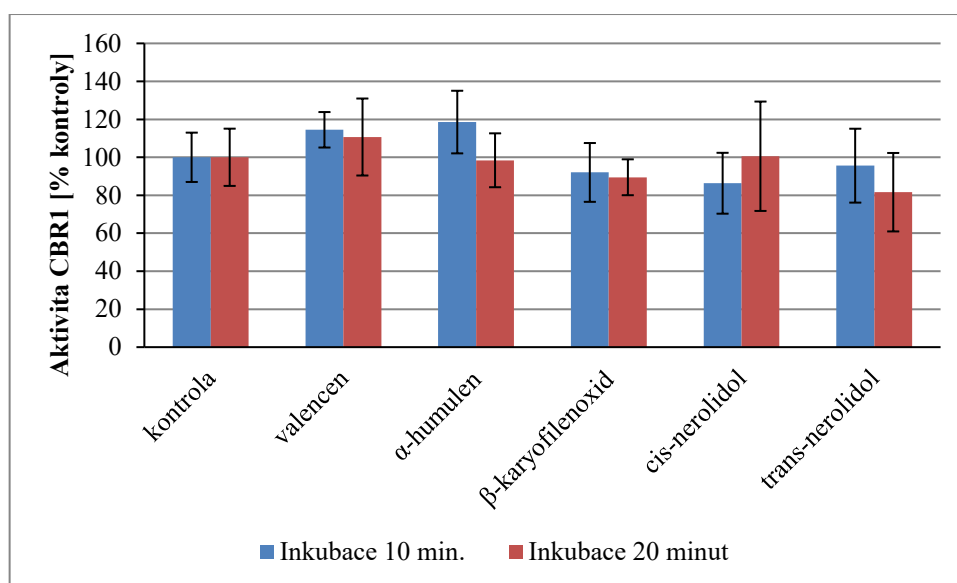
K měření byla použita metoda podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem. Jednotlivé seskviterpeny byly připraveny v koncentraci 10 mM rozpuštěním potřebného množství seskviterpenu v DMSO. Vzorky jsem poté připravila o výsledné koncentraci seskviterpenů 100  $\mu$ M a výsledné koncentraci CBR1 50  $\mu$ g/ml podle postupu v kapitole

4.3.1.3. Doba inkubace byla 10 min. a 20 min. při 25 °C v termomixéru. Do reakční směsi o celkovém objemu 200 µl bylo pipetováno vždy 10 µl vzorku. Pomocí poklesu absorbance naměřeného spektrofotometricky a s použitím molárního absorpčního koeficientu NADPH jsem spočítala aktivitu CBR1 [nmol/min/ml]. Pomocí známé výsledné koncentrace CBR1 ve vzorku jsem přepočítala aktivitu CBR1 [nmol/min/mg] a naměřené hodnoty jsem uvedla do Tab. 4. Aktivitu CBR1 jsem dále vyjádřila v % kontroly v grafu na Obr. 16.

Tab. 4 Průměrné naměřené hodnoty aktivity rekombinantní CBR1 při inkubaci s jednotlivými seskviterpeny (100 µM) po dobu 10 a 20 minut. Data jsou uvedena jako průměr ze 4 měření ± SD.

Průměrná aktivita CBR1 [nmol/min/mg]±SD		
Doba inkubace	10 minut	20 minut
Kontrola	844,4±109,7	725,8±109,4
Valencen	966,8±78,9	803,3±147,2
α-humulén	1001,2±139,2	714,4±103,0
β-karyofilenoxid	777,2±130,8	649,5±68,5
Cis-nerolidol	729,0±135,4	729,8±209,1
Trans-nerolidol	807,2±164,4	592,4±149,9

Z grafu aktivity CBR1 na Obr. 16 vyplívá, že za dané koncentrace a podmínek měření, neměly jednotlivé seskviterpeny významnější vliv na aktivitu CBR1. K nejvýznamnější inhibici došlo v případě *trans*-nerolidolu po 20 min inkubace, kdy došlo ke snížení aktivity o 18,4 % proti kontrole. Slabá inhibice byla nalezena též v případě *cis*-nerolidolu po 10 min inkubace a β-karyofilenoxidu po 10 a 20 minutách inkubace. V případě valencenu a α-humulenu bylo po 10 minutové inkubaci zaznamenáno mírné zvýšení aktivity CBR1. Žádný z těchto účinků však nebyl statisticky významný.



Obr. 16 Vliv seskviterpenů (100  $\mu\text{M}$ ) na aktivitu rekombinantní CBR1 po 10 min a 20 min inkubace za použití substrátu menadionu. Data jsou vyjádřena jako aktivita CBR1 v %  $\pm$  SD. Každý bod představuje průměr ze 4 nezávislých experimentů (\* Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

Pro ověření, jestli terpeny sami o sobě neovlivňují absorbanci svým zbarvením, jsem připravila slepé vzorky neobsahující CBR1 s každým seskviterpenem. Slepé vzorky obsahovaly vždy 9,9  $\mu\text{l}$  0,1 M K-fosfátového pufru o  $\text{pH} = 7,4$  a 0,1  $\mu\text{l}$  jednotlivých seskviterpenů. Jako kontrola byl použit vzorek obsahující 9,9  $\mu\text{l}$  0,1 M K-fosfátového pufru o  $\text{pH} = 7,4$  a 1  $\mu\text{l}$  DMSO. Do reakční směsi o celkovém objemu 200  $\mu\text{l}$  bylo pipetováno vždy 10  $\mu\text{l}$  vzorku. Měření probíhalo za stejných podmínek popsaných výše.

Jednotlivé seskviterpeny svým zbarvením neovlivňovaly absorbanci. Výsledky měření by tedy neměly být ovlivněné vlastní schopností seskviterpenů absorbovat záření.

## 6. DISKUZE

Enzym karbonylreduktasa 1 je jedním z enzymů nezbytných při udržování homeostázy a při ochraně organismu (Boušová a kol. 2015). Funkcí tohoto enzymu je redukce karbonylových skupin aldehydů, ketonů a chinonů na odpovídající hydroxylové deriváty. Podílí se na metabolismu mnoha endogenních a xenobiotických sloučenin (Oppermann a Maser 2000). Modulace exprese nebo aktivity tohoto enzymu může významně ovlivnit náchylnost organismu k působení toxických karbonylových sloučenin (Boušová a kol. 2015).

Jedním ze substrátů CBR1 je i chemoterapeutikum doxorubicin, který je používán k léčbě celé řady nádorových onemocnění. Jeho použití je však omezené díky vedlejším účinkům, zejména kardiotoxicitě. CBR1 je hlavním enzymem, který metabolizuje doxorubicin na méně účinný metabolit doxorubicinol, který je však zodpovědný za kardiotoxicitu doxorubicinu. Lze tedy předpokládat, že inhibice CBR1 by mohla zvýšit chemoterapeutickou účinnost doxorubicinu a snížit jeho vedlejší účinky (Jo a kol. 2017, Kaiserová a kol. 2007).

Nejvíce studovanou skupinou přírodních látek ve vztahu k aktivitě a expresi CBR1 jsou polyfenoly (z nich zejména skupina flavonoidů, stilbenů a kurkuminoidů). Další významnou skupinou přírodních metabolitů jsou terpeny. Výzkumné aktivity se zaměřují zejména na skupinu seskviterpenů, pro jejich široké spektrum biologických aktivit, jako je působení antiparazitární, protizánětlivé, antibakteriální, protivirové a protiplísňové. Seskviterpeny se jeví také jako nadějně protinádorové působky (Chaturvedi 2011, Trachootham a kol. 2009, Lee a kol. 2013).

Rostlinné terpeny, zejména monoterpeny a seskviterpeny, jsou nedílnou součástí koření, tradičních jídel a nápojů. Navíc jsou hlavní složkou silic, často používaných v lidové medicíně, farmaceutickém průmyslu a kosmetice. Díky jejich širokému výskytu a běžnému použití je zde riziko nežádoucích interakcí s léčivými, které mohou být založeny na potenciální schopnosti terpenů modulovat aktivitu důležitých enzymů metabolizujících léčiva a další xenobiotika, kam patří i CBR1. Navzdory tomu, že lidský organismus přijde se seskviterpeny do častého kontaktu, informace o jejich vlivu

na aktivitu enzymů metabolizujících léčiva a jiná xenobiotika zůstávají omezené (Nguyen a kol. 2017).

Ve studii podle Nguyen a kol. (2017) byl zkoumán potenciální inhibiční vliv seskviterpenů  $\beta$ -karyofilenenu,  $\beta$ -karyofilenoxidu a  $\alpha$ -humulenu na aktivitu hlavních enzymů metabolizujících xenobiotika včetně CBR1 *in vitro*. Tyto seskviterpeny významně inhibovaly aktivitu cytochromů P450 podrodiny 3A v lidských i potkaních mikrosomálních frakcích i frakcích získaných z jaterní tkáně, kdy  $\beta$ -karyofilen se prokázal jako nejsilnější inhibitor. Na druhou stranu žádný z uvedených seskviterpenů významněji neovlivňoval aktivitu konjugáčnických ani redukujících enzymů, včetně CBR1 (Nguyen a kol. 2017). Potenciální inhibiční efekt acyklických seskviterpenů *trans*-nerolidolu, *cis*-nerolidolu a farnesolu na aktivitu hlavních enzymů metabolizujících xenobiotika, včetně karbonylredukujících enzymů, byl studován *in vitro* v subcelulárních frakcích získaných z lidské a potkaní jaterní tkáně. Uvedené seskviterpeny neměly významný efekt na aktivitu CBR1 (Špičáková a kol. 2017).

V *in vivo* studii provedené Lněničkovou a kol. (2018) byl sledován efekt *p.o.* podávání seskviterpenů  $\beta$ -karyofylenoxidu a *trans*-nerolidolu na různé enzymy metabolizující xenobiotika (včetně CBR1), a to v játrech a tenkém střevě myši. Naměřené hodnoty aktivity CBR1 byly překvapivé. Ve tkáni tenkého střeva byla aktivita CBR1 po šesti i dvacetičtyřech hodinách léčby seskviterpeny nezměněná, zatímco v jaterní tkáni byla po 6 hodinách naměřená mírně snížená aktivita CBR1 a po dvacetičtyřech hodinách byla její aktivita naopak zvýšená oproti kontrole o přibližně 20 %. Seskviterpeny tedy mohou být v *in vivo* podmínkách reversibilními inhibitory aktivity CBR1 (Lněničková a kol. 2018).

Tato rigorózní práce měla za cíl přispět studiu vlivu seskviterpenů valencenu,  $\alpha$ -humulenu,  $\beta$ -karyofilenoxidu, *cis*-nerolidolu a *trans*-nerolidolu na aktivitu CBR1 *in vitro*. V první části práce byl zjišťován vliv daných seskviterpenů na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana. Jednotlivé seskviterpeny jsem si připravila o výsledné koncentraci 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Pro měření aktivity CBR1 jsem používala metodu podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem. Ze získaných výsledků je patrné, že valencen,  $\beta$ -karyofilenoxid,  $\alpha$ -humulen ani *cis*-nerolidol neměly významnější inhibiční účinek na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*. Signifikantní

inhibiční efekt byl zjištěn pouze u *trans*-nerolidolu o koncentraci 100  $\mu$ M. Tyto výsledky jsou v souladu s údaji publikovanými v pracích Nguyen a kol. (2017) a Špičáková a kol. (2017). Jediným seskviterpenem, který nebyl v těchto pracích studován, byl cyklický valencen.

Ve druhé části práce jsem stanovovala vliv uvedených seskviterpenů na aktivitu rekombinantní CBR1. Pro veškeré pokusy jsem používala rekombinantní karbonylreduktasu 1 získanou ze *Sacharomyces cerevisiae* od firmy MyBioSource o koncentraci 1 mg/ml. Vzorky jsem připravila o výsledné koncentraci seskviterpenů 100  $\mu$ M a výsledné koncentraci CBR1 50  $\mu$ g/ml. Pro měření aktivity CBR1 jsem používala metodu podle Maté a kol. (2008) se substrátem menadionem. Za dané koncentrace a podmínek měření neměly jednotlivé seskviterpeny významnější vliv na aktivitu CBR1. K nejvýznamnější inhibici došlo opět v případě *trans*-nerolidolu, který po 20 min inkubace snížil aktivitu enzymu o 18,4 % proti kontrole. Tento výsledek však nebyl statisticky významný.

Výsledky této studie lze shrnout tak, že studované seskviterpeny neprokázaly významnější inhibiční účinek vůči CBR1.

## 7. SHRNU TÍ

Ve své rigorózní práci jsem stanovila schopnost seskviterpenů valencenu,  $\beta$ -karyofilenoxidu,  $\alpha$ -humulenu, *cis*-nerolidolu a *trans*-nerolidolu ovlivňovat aktivitu enzymu karbonylreduktasy 1 *in vitro*.

Vliv studovaných látek na aktivitu tohoto enzymu jsem nejprve stanovila v cytosolické frakci z jater potkana. Z výsledků měření metodou podle Maté a kol.(2008) je patrné, že dané seskviterpeny neměly významnější inhibiční účinek na aktivitu CBR1 v cytosolu z jater potkana *in vitro*. Signifikantní inhibiční efekt byl zjištěn pouze u *trans*-nerolidolu v koncentraci 100  $\mu$ M.

Následně jsem sledovala vliv jednotlivých seskviterpenů na aktivitu rekombinantně připravené lidské CBR1 metodou podle Maté a kol. (2008). Za dané koncentrace a podmínek měření neměly jednotlivé seskviterpeny vliv na aktivitu CBR1.

Výsledky této studie tedy neprokázaly, že by seskviterpeny valencen,  $\beta$ -karyofilenoxid,  $\alpha$ -humulen, *cis*-nerolidol a *trans*-nerolidol měli významnější inhibiční účinek na CBR1.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AGEs	koncové produkty pokročilé glykace
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky
AP-1	aktivační protein 1
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CBR1	karbonylreduktasa 1
DMAPP	dimetylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FPP	fanesyldifosfát
GGPP	geranylgeranyldifosfát
GPP	geranyldifosfát
HIF	hypoxií indukovaný faktor
IL	interleukin
IPP	isopentenylidifosfát
I- $\kappa$ B	inhibiční protein $\kappa$ B
Keap 1	Kelch protein 1
MEP	methylerythritolfosfát
MRP	proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí
MVA	mevalonová kyselina
NADPH/NADP <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukovaná/oxidovaná forma
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor $\kappa$ B
NNK	derivát odvozený od nikotinu (4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon)
Nrf2	nukleární transkripční faktor (nuclear factor-erythroid 2-related factor)
SDR	nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem
siRNA	malé interferující RNA (small interfering RNA)
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku

RNA	ribonukleová kyselina
SQT	seskviterpen
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aherne SA, O'Brien NM (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18:75-81.
- Ambrož M, Boušová I, Skarka A, Hanušová V, Králová V, Matoušková P, Szoťáková B, Skálová L (2015). The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and prooxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules* 20:15343-58.
- Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB (2008). Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol* 76:1590-1611.
- Arai Y, Endo S, Miyagi N (2015). Structure-activity relationship of flavonoids as potent inhibitors of carbonyl reductase 1 (CBR1). *Fytoterapia* 101:51-56.
- Bachi A, Dalle-Donne I, Scaloni A. (2013). Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chem Rev* 113:596-698.
- Bártíková H, Hanušová V, Skálová L, Ambrož M, Boušová I (2014). Antioxidant, prooxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Curr Top Med Chem* 14:2478-2494.
- Bollrath J, Greten FR (2009). IKK/NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep* 10(12):1314-1319.
- Boušová I, Skálová L, Souček P, Matoušková P (2015). The modulation of carbonylreductase 1 by polyphenols. *Drug Metab Rev* 1-14.
- Cicerale S, Lucas L, Keast R (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci* 11:458-479.
- Dewick PM (2001). *Medicinal natural products, a biosynthetic approach*. Chichester (UK): John Wiley and Sons.

- Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52:S128-S138.
- Fidyt K, Fiedorowicz A, Strzadala L, Szumny A (2016). B-caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide – natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med* 5:3007-17.
- Filling C, Berndt KD, Benach J (2002). Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem* 277:25677-25684.
- Forrest GL, Gonzalez B (2000). Carbonyl reductase. *Chem Biol Interact* 129:21-40.
- Herrera F, Martin V, Rodriguez-Blanco J, Garcia-Santos G, Antolin I, Rodriguez C. (2005). Intracellular redox state regulation by parthenolide. *Biochem Biophys Res Commun* 332(2):321-325.
- Hintzpeter J, Hornung J, Ebert B (2015). Curcumin is a tight-binding inhibitor of the most efficient human daunorubicin reductase – Carbonyl reductase 1. *Chem Biol Interact* 234:162-168.
- Huang M, Lu J-J, Huang M-Q, Bao J-L, Chen X-P, Wang Y-T (2012). Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Exp Opin Invest Drugs* 21(12):1801-1818.
- Huxford T, Ghosh G (2009). Structural Guide to Proteins of the NF $\kappa$ B Signaling Module. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 1(3):a000075,16 pages.
- Chaturvedi D (2011). In: Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry: Tiwari VM, Mishra BB Eds: Research Signpost:Trivadrum: pp 313-334.
- Cheng A-X, Lou Y-G, Mao Y-B, Lu S, Wang L-J, Chen X-Y (2007). Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *J Integr Plant Biol* 49(2):179-186.
- Ito Y, Mitani T, Harada N (2013). Identification of carbonyl reductase 1 as a resveratrol-binding protein by affinity chromatography using 4'-amino-3,5-dihydroxy-*trans*-stilbene. *J Nutr Sci Vitaminol* 59:358-364.

- Jo A, Choi TG, Jo YH, Jyothi KR, Nguyen MN, Kim JH, Lim S, Shahid M, Akter S, Lee S, Lee KH, Kim W, Cho H, Lee J, Shokat KM, Yoon KS, Kang I, Ha J, Kim SS (2017). Inhibition of Carbonyl Reductase 1 Safely Improves the Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment. *Antioxid Redox Signal* 26(2):70-83.
- Kaiserová H, Šimůnek T, Van Der Vijgh WJF (2007). Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: Role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochim Biophys Acta-Molecular Basis of Disease* 1772:1065-1074.
- Lee WL, Huang JY, Shyur LF (2013). Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 925804:22 pages.
- Lim S, Shin JY, Jo A, Jyothi KR, Nguyen MN, Choi TG, Kim J, Park JH, Eun YG, Yoon KS, Ha J, Kim SS. (2013). Carbonyl reductase 1 is an essential regulator of skeletal muscle differentiation and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 45:1784-1793.
- Lněničková K, Svobodová H, Skálová L a kol. (2018). The impact of sesquiterpenes beta-caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol on xenobiotic metabolizing enzymes in mice *in vivo*. *Xenobiotica* 48(11):1089-1097.
- Malatkova P, Maser E, Wsol V(2010). Human carbonyl reductases. *Curr Drug Metab* 11:639-658.
- Manach C, Scalbert A, Morand C (2004). Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metab Rev* 46:96-123.
- Maser E, Stinner B, Atalla A. (2000). Carbonyl reduction of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-butanone (NNK) by cytosolic enzymes in human liver and lung. *Cancer Lett* 148:135-144.
- Matsunaga T, Shintani S, Hara A. (2006). Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacokinet* 21:1-18.

- Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianowski LF, Campos MM, Calixto JB (2007). Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol* 151(5):618-627.
- Nguyen LT, Myslivečková Z, Szotáková B, Špičáková A, Lněničková K, Ambrož M, Kubíček V, Kristýna K, Anzenbacher P, Skálová L (2017). The inhibitory effects of  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -caryophyllene oxide and  $\alpha$ -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro*. *Chemico-Biol Interact* 278:123-128.
- Oldfield E (2010). Targeting isoprenoid biosynthesis for drug discovery: Bench to bedside. *Accounts Chem Res* 43(9):1216-1226.
- Osawa Y, Yokoyama Y, Shigeto T (2015). Decreased expression of carbonyl reductase 1 promotes ovarian cancer growth and proliferation. *Int J Oncol* 46:1252-1258.
- Oppermann UCT, Maser E. (2000). Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicol* 144:71-81.
- Piska K, Koczurkiewicz P, Bucki A, Wojcik-Pszczola K, Kolaczkowski M, Pekala E (2017). Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines – role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Invest New Drugs* 35(3): 375- 385.
- Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M (2012). New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol plant* 5(5):964-7.
- Rocha NFM, de Oliveira GV, de Araujo FYR, Rios ERV, Carvalho AMR, Vasconcelos LF, Macedo DS, Soares PMG, de Sousa DP, de Sousa FCF (2011). (-)- $\alpha$ -Bisabolol induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur J Pharm Sci* 44(4):455-461.

- Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Kreuger CG (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: An update. *Arch Toxicol* 88:1803-1853.
- Shen T, Wang XN, Lou HX (2009). Natural stilbenes: An overview. *Nat Prod Rep* 26:916-935.
- Surh YJ (2008). NF- $\kappa$ B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pac J Clin Nutr* 17:269-272.
- Szotáková B, Bártíková H, Hlaváčová J (2013). Inhibitory effect of anthocyanidins on hepatic glutathion S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase and carbonyl reductase activities in rat and human. *Xenobiotica* 43:679-685.
- Špičáková A, Szotáková B, Dimunová D a kol. (2017). Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome P450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules* 22:E509.
- Thermofisher [online] (2019). Dostupné z:  
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>
- Trachootham D, Alexandre J, Huang P (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8(7):579-591.
- Vanozzi A, Dry IB, Fasoli M (2012). Genome-wide analysis of the grapevine stilben synthase multigenic family: Genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biol* 12:130.
- Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD (2010). Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid Redox Signal* 13(11):1699-712.

- Vinholes J, Goncalves P, Martel F, Coimbra MA, Rocha SM (2014). Assessment of the antioxidant and antiproliferative effect of sesquiterpenic compounds in *in vitro* Caco-2 cell models. *Food Chem* 156:204-211.
- Williams CA, Grayer RJ (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 21:539-573.
- Zhang YS, Gordon GB (2004). A strategy for cancer prevention: Stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 3(7):885-893.