

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Modulační účinek *cis*-nerolidolu, *trans*-nerolidolu a farnesolu na vybrané enzymy 1. fáze biotransformace v lidských jaterních řezech

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

Hradec Králové, 2019

Bc. et Bc. Kristýna Deingruberová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své školitelce doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. hlavně za odborné vedení doplněné cennými radami a návrhy, dále za trpělivost, ochotu a čas, který mi při vypracování této diplomové práce věnovala. Zároveň mé poděkování patří i Mgr. Michaele Šadibolové a Mgr. Tomášovi Zárybnickému za pomoc při realizaci experimentální části. V neposlední řadě děkuji rodině za neutuchající podporu při studiu.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 10.5.2019

.....

Bc. et Bc. Kristýna Deingruberová

Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 Isoprenoidy.....	9
2.1.1 Biosyntéza terpenoidů.....	10
2.1.2 Seskviterpeny.....	11
2.1.2.1 Farnesol.....	13
2.1.2.2 Nerolidol.....	14
2.2 Biotransformace.....	15
2.2.1 Enzymy 1. fáze biotransformace.....	16
2.2.1.1 Cytochromy P450 (CYP).....	16
2.2.1.1.1 CYP1A2.....	19
2.2.1.1.2 CYP2B6.....	19
2.2.1.1.3 CYP2C.....	19
2.2.1.1.4 CYP3A4.....	20
2.2.1.2 Reduktasy xenobiotik.....	21
2.2.1.2.1 Karbonylreduktasa 1 (CBR1).....	21
2.2.1.2.2 Aldo-ketoreduktasa 1C (AKR1C).....	22
2.3 Tkáňové řezy.....	23
3. CÍL PRÁCE.....	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
4.1 Chemikálie.....	27
4.2 Přístroje.....	28
4.3 Biologický materiál.....	29
4.4 Příprava ultratenkých jaterních řezů.....	30
4.4.1 Příprava Krebsova–Henseleitova pufu.....	30
4.4.2 Příprava média William's E.....	31
4.4.3 Preinkubace a inkubace řezů.....	32
4.5 Stanovené proteinové exprese.....	32
4.5.1 Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blot.....	33
4.5.1.1 Stanovení bílkoviny pomocí bicinchoninové kyseliny.....	34
4.5.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek ..	36
4.5.2.1 Příprava polyakrylamidového gelu.....	36

4.5.2.2	Průběh elektroforézy	38
4.5.3	Western blot	40
4.5.3.1	Průběh Western blotu	40
4.5.3.2	Detekce proteinů pomocí chemiluminiscence	41
4.6	Stanovení genové exprese	44
4.6.1	Izolace RNA	44
4.6.2	Měření koncentrace a čistoty vzorků	45
4.6.3	Ošetření DNAsou	46
4.6.4	Reverzní transkripce	47
4.6.5	Kvantitativní PCR v reálném čase	48
5.	VÝSLEDKY	51
5.1	Modulační účinek <i>cis</i> -nerolidolu, <i>trans</i> -nerolidolu a farnesolu na proteinovou expresi vybraných enzymů 1. fáze biotransformace	51
5.1.1	Vliv cNER, tNER a FAR na proteinovou expresi enzymu CYP2C	53
5.1.2	Vliv cNER, tNER a FAR na proteinovou expresi enzymu CYP3A4	55
5.1.3	Vliv cNER, tNER a FAR na proteinovou expresi enzymu CBR1	57
5.1.4	Vliv cNER, tNER a FAR na proteinovou expresi enzymu AKR1C3	59
5.2	Modulační účinek <i>cis</i> -nerolidolu, <i>trans</i> -nerolidolu a farnesolu na genovou expresi vybraných enzymů 1. fáze biotransformace	60
5.2.1	Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu CYP1A2	62
5.2.2	Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu CYP2B6	64
5.2.3	Vliv cNER, tNER, FAR na genovou expresi enzymu CYP2C	66
5.2.4	Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu CYP3A4	68
5.2.5	Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu CBR1	70
5.2.6	Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu AKR1C	71
6.	DISKUZE	74
7.	ZÁVĚR	80
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	81
9.	SEZNAM TABULEK	84
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	85
11.	POUŽITÁ LITERATURA	87

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Bc. et Bc. Kristýna Deingruberová

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

Název diplomové práce: Modulační účinek *cis*-nerolidolu, *trans*-nerolidolu a farnesolu na vybrané enzymy 1. fáze biotransformace v lidských jaterních řezech

Seskviterpeny jsou přírodní látky, které můžeme najít v alternativních léčivech či doplňcích stravy. Nicméně ne všichni zástupci působí na zdraví blahodárně. Existují totiž poznatky o vážných toxicitách a vedlejších účincích, kterým by se měla věnovat dostatečná pozornost. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jestli mají acyklické seskviterpeny *cis*-nerolidol (cNER), *trans*-nerolidol (tNER) a farnesol (FAR) modulační účinek na proteinovou a genovou expresi vybraných enzymů 1. fáze biotransformace - čtyři isoformy cytochromu P450 (CYP), jmenovitě CYP1A2, CYP2B6, CYP2C a CYP3A4, karbonylreduktasa 1 (CBR1) a aldo-ketoreduktasa 1C3 (AKR1C3). Zkoumaným materiálem byly ultratenké lidské jaterní řezy pocházející od pěti pacientů obou pohlaví ve věku od 45 do 81 let. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 μM (u jednoho pacienta cNER a tNER i v koncentraci 30 μM) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Proteinovou expresi jsem stanovovala pomocí elektroforézy s Western blotem a relativní expresi mRNA pomocí kvantitativní polymerasové řetězové reakce (qPCR).

U jednoho pacienta FAR a tNER v koncentraci 10 μM významně inhibovaly proteinovou expresi CBR1. U jiného cNER (10 a 30 μM) a tNER (30 μM) snižovaly expresi proteinu AKR1C3. Nejsilnější účinek na expresi mRNA měl tNER, který indukoval expresi CYP1A2 u pacienta č. 9 2,1x. FAR a tNER významně snížily expresi mRNA všech sledovaných enzymů u jednoho pacienta, u kterého zároveň cNER významně zvýšil expresi mRNA CYP2B6. Kromě inhibičních účinků vyvolal FAR u dvou pacientů zvýšení exprese mRNA CYP1A2 a CYP2B6. Výsledky poukázaly na interindividuální variabilitu mezi jednotlivci. Závěrem lze říci, že je málo pravděpodobné, že by tyto acyklické seskviterpeny v koncentracích běžně dostupných v potravě významně ovlivňovaly biotransformaci současně podávaných léčiv.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Bc. et Bc. Kristýna Deingrubarová

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

Title of diploma thesis: Modulatory effect of *cis*-nerolidol, *trans*-nerolidol and farnesol on selected phase 1 drug-metabolizing enzymes in human liver slices

Sesquiterpenes are natural compounds which can be found in alternative medicines or food supplements. However, not all representatives have a beneficial effect on health. Indeed, sufficient attention should be paid to the evidence of serious toxicities and side effects. The aim of this diploma thesis was to find out, whether acyclic sesquiterpenes *cis*-nerolidol (cNER), *trans*-nerolidol (tNER) and farnesol (FAR) possess a modulatory effect on protein and gene expression of selected phase 1 drug-metabolizing enzymes - four cytochrome P450 (CYP) isoforms, namely CYP1A2, CYP2B6, CYP2C and CYP3A4, carbonyl reductase 1 (CBR1) and aldo-ketoreductase 1C3 (AKR1C3). The ultra-thin liver slices from five patients of both sexes aged 45 to 81 years were used as studied material. The liver slices were incubated with studied compounds at a concentration of 10 μM (in one patient, cNER and tNER also at 30 μM concentration) at 37 °C for 24 hours. The protein expression was determined by electrophoresis with Western blot and relative mRNA expression by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

The FAR and tNER at 10 μM concentration markedly inhibited CBR1 protein expression in the one patient. In other patient, cNER (10 and 30 μM) and tNER (30 μM) decreased AKR1C3 protein expression. The strongest effect on mRNA expression expressed tNER, which 2.1-times induced CYP1A2 expression in patient No. 9. Furthermore, FAR and tNER significantly reduced mRNA expression of all followed enzymes in one patient, at whom cNER at the same time significantly increased CYP2B6 mRNA expression. Beside inhibitory effects, FAR cause increase in CYP1A2 and CYP2B6 expression in two patients. The results pointed out interindividual variability among individuals. In conclusion, these acyclic sesquiterpenes at concentrations commonly available in the diet are unlikely to markedly affect the biotransformation of co-administered drugs.

1. ÚVOD

Přírodní alternativy výživy, ale i léčiv jsou v současnosti nesmírně populární. Častou složkou právě těchto výrobků jsou seskviterpeny. Jedná se o látky přírodního původu vykazující částečně protizánětlivé, antiparazitické a antikancerogenní účinky. Nutno ale říci, že ne všechny seskviterpeny působí na zdraví blahodárně. Existují totiž poznatky o vážných toxicitách a vedlejších účincích, kterým by se měla věnovat dostatečná pozornost. Seskviterpeny jsou považovány za pravděpodobné modulátory (inhibitory a/nebo induktory) biotransformačních enzymů, ale dostupné poznatky jsou značně omezené (Bártíková a kol. 2014).

Na katedře biochemických věd FaF-UK se skupina prof. Skálové dlouhodobě věnuje studiu biologických účinků přírodních látek (např. flavonoidů, prenylflavonoidů, mono- a seskviterpenů). Tato skupina popsala antiproliferační účinky seskviterpenů pocházejících ze silice rostliny *Myrica rubra* (Myricaceae) a jejich potenciál v kombinační terapii s klasickými cytostatiky *in vitro* v různých nádorových buněčných liniích (např. Ambrož a kol. 2015, Ambrož a kol. 2016, Ambrož a kol. 2017) a *in vivo* v tumorizovaných myších (Hanušová a kol. 2017). Rovněž sledovali účinek vybraných seskviterpenů na aktivitu biotransformačních enzymů *in vitro* v subcelulárních frakcích (Špičáková a kol. 2017, Nguyen a kol. 2017) a *in vivo* na myších (Lněničková a kol. 2017).

Vzhledem k tomu, že vlivu acyklických seskviterpenů *cis*-nerolidolu (cNER), *trans*-nerolidolu (tNER) a farnesolu (FAR) na aktivitu a/nebo expresi biotransformačních enzymů nebyla dosud věnována příliš velká pozornost, jsem se ve své diplomové práci věnovala modulačnímu účinku těchto látek na vybrané enzymy 1. fáze biotransformace v lidských jaterních řezech pocházejících od pěti pacientů. Mezi vybrané enzymy patřily - čtyři isoformy cytochromu P450 (CYP), jmenovitě CYP1A2, CYP2B6, CYP2C a CYP3A4, dále karbonylreduktasa 1 (CBR1) a aldo-ketoreduktasa 1C3 (AKR1C3). Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 μ M (u pacienta č. 16 cNER a tNER i v koncentraci 30 μ M) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Studovala jsem vliv těchto látek na proteinovou expresi a expresi mRNA výše zmíněných enzymů. K tomuto účelu jsem použila polyakrylamidovou gelovou elektroforézu za denaturujících podmínek s následným Western blotem (určení proteinové exprese) a kvantitativní polymerasovou řetězovou reakci v reálném čase s použitím reverzní transkripce (RT-qPCR) (stanovení relativní exprese mRNA).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ISOPRENOIDY

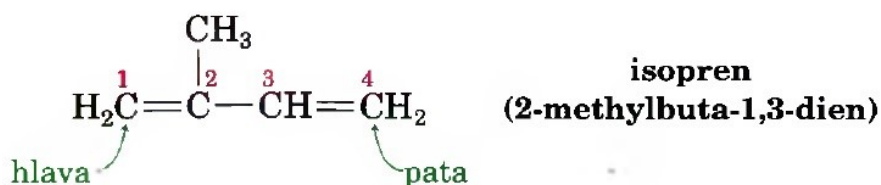
Isoprenoidy (též terpeny) jsou rozsáhlou skupinou biomolekul lipidní povahy převážně rostlinného původu, kam řadíme terpenoidy a steroidy (Kodíček a kol. 2018; Špilková a kol. 2015).

Terpenoidy disponují přibližně 25 000 různými chemickými strukturami, zahrnujícími systémy lineární (= acyklické), cyklické, dále uhlovodíky, ale i sloučeniny obsahující atomy kyslíku (Huang a kol. 2012; McMurry 2007).

Terpenoidy jsou rostlinné sekundární metabolity a hrají roli v interakcích typu rostlina-hmyz, rostlina-patogen a rostlina-rostlina (Cheng a kol. 2007).

Strukturu všech terpenoidů lze odvodit od jednoduché pětiuhlíkaté jednotky **isoprenu** (2-methylbuta-1,3-dien, Obrázek 1), ale prekursorem jejich biosyntézy je **isopentenyl-difosfát** = isopentenyl-pyrofosfát (3-methylbut-3-en-1-yl-difosfát, zkráceně **IPP**), který vzniká několikasupňovou syntézou vycházející z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) (Kodíček a kol. 2018; McMurry 2007).

Díky isoprenovému pravidlu víme, že vznikají spojováním jednotlivých isoprenových jednotek v pořadí hlava-pata. Jako hlava isoprenové jednotky se označuje atom uhlíku C1 a jako pata atom uhlíku C4 (McMurry 2007).



Obrázek 1 Vzorec isoprenu a naznačení isoprenového pravidla (převzato z McMurry 2007)

A právě na počtu isoprenových jednotek je založena i samotná klasifikace terpenoidů (Tabulka 1) – rozeznáváme hemiterpeny, monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, sesterterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny (McMurry 2007; Singh a Sharma 2015).

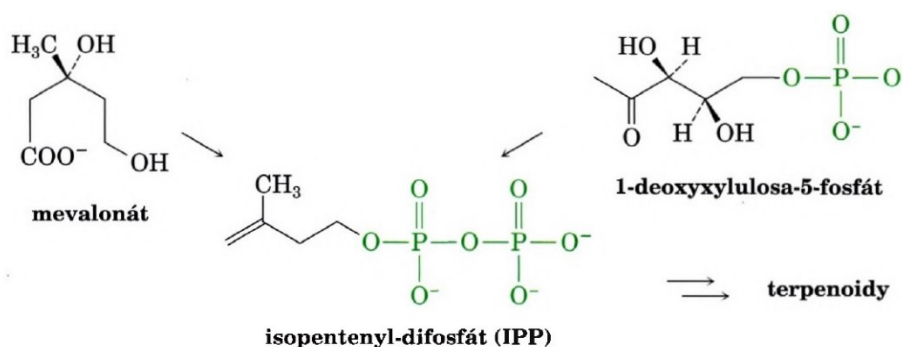
Tabulka 1 Přehled terpenů (převzato a změněno ze Singh a Sharma 2015; McMurry 2007)

Název	Počet atomů	Počet isoprenových jednotek
hemiterpeny	5	1
monoterpeny	10	2
seskviterpeny	15	3
diterpeny	20	4
sesterterpeny	25	5
triterpeny	30	6
tetraterpeny	40	8
polyterpeny	> 40	> 8

2.1.1 Biosyntéza terpenoidů

Biosyntetické cesty seskviterpenů jsou lokalizovány v cytosolu (Bártíková a kol. 2014).

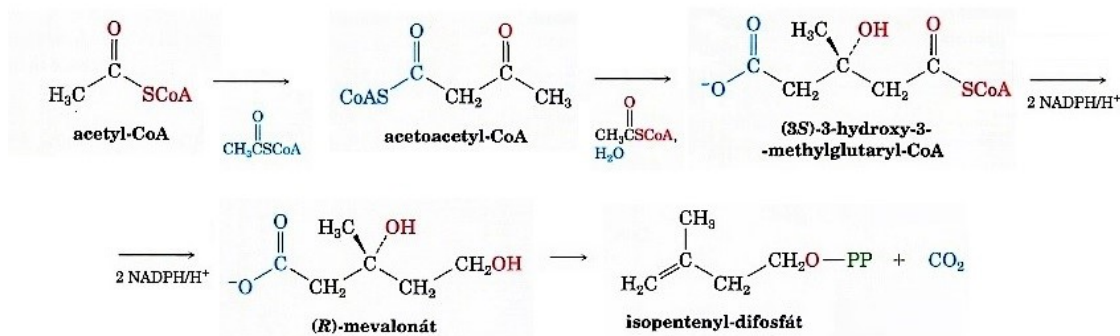
Biosyntéza prekursoru **IPP** může probíhat dvěma cestami – **mevalonátovou a deoxyxylulosovou** (Obrázek 2). Mevalonátová cesta, která je obvyklejší, vychází z mevalonátu ((R)-3,5-dihydroxy-3-methylpentanoát) a dává vznik seskviterpenům a triterpenům. Druhá cesta využívá jako výchozí sloučeninu 1-deoxyxylulosa-5-fosfát (derivát D-xylosy) – tímto způsobem vznikají monoterpeny, diterpeny a tetraterpeny (Bártíková a kol. 2014; McMurry 2007).



Obrázek 2 Dvě možné cesty biosyntézy isopentenyl-difosfátu (IPP) (převzato z McMurry 2007)

Mevalonátová cesta (Obrázek 3) startuje konverzí acetátu na acetyl-CoA a pokračuje tzv. Claisenovou kondenzací za vzniku produktu – acetoacylkoenzymu A (acetoacetyl-CoA). Karbonylová skupina dále aldolově reaguje s třetí molekulou acetyl-CoA a hydrolyzou vzniká šestiuhlíkatý 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. Ten se pak

redukuje na mevalonát. Následuje fosforylace, dekarboxylace, odštěpení fosfátového iontu a proces je ukončen vznikem IPP (Bártíková a kol. 2014; McMurry 2007).



Obrázek 3 Mevalonátová dráha (převzato a upraveno z McMurry 2007)

Dále se IPP isomerizuje na dimethylallyl-difosfát (3-methyl-2-en-1-yl-difosfát nebo dimethylallyl-pyrofosfát), zkráceně DMAPP. Syntézou IPP a DMAPP (resp. jejich C5 stavební jednotky) se umožní vytvoření geranyl-difosfátu (GPP) a vznik monoterpenů (C10). Po navázání další molekuly IPP vzniká farnesyl-difosfát (FPP), který je prekursorem seskviterpenů (C15). V syntéze terpenů hrají klíčovou roli enzymy označované jako syntasy (Bártíková a kol. 2014; McMurry 2007).

2.1.2 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou patnáctiuhlíkaté sloučeniny a skládají se ze tří isoprenových jednotek. Jakožto sekundární metabolity jsou produkovány vyššími rostlinami (obsaženy jsou v květech, listech, plodech a dalších orgánech), houbami a bezobratlými organismy (Ambrož a kol. 2015; Bártíková a kol. 2014; Špilková a kol. 2015).

Směsi terpenů, známé jako **silice**, jsou těkavé, prchavé, s nízkou teplotou varu a navíc intenzivně a příjemně voní. Své využití nacházejí v oblasti lidové medicíny (např. proti respiračním onemocněním), v doplňcích stravy, jako koření či v kosmetickém průmyslu. Důležitou funkcí je i funkce ochranná, kdy rostlina v případě poškození vypouští tekutinu, která na vzduchu oxiduje a mění se na **pryskyřici**, zabírající bakteriální nebo houbové infekci. Zároveň lze říci, že těkavé seskviterpeny slouží i jako nástroj k odpuzování býložravců. Spojením pryskyřice a silice se získává polotekutá směs, která je součástí **balzámů** (Bártíková a kol. 2014; Špilková a kol. 2015).

Destilace s vodní parou umožňuje z přírodních rostlinných látek extrahovat voňavé, kapalné silice. Využívá se ale i tuhý zbytek, který v destilační aparatuře zůstane

(Špilková a kol. 2015). Říká se mu kalafuna a nachází využití při pájení či v hudbě jako prostředek pro zvýšení třecího odporu na smyčci (Keira a kol. 1997).

Mnoho seskviterpenů a jejich derivátů mají zajímavé biologické aktivity, díky kterým se staly tématem výzkumů pro vývoj nových léků. Seskviterpeny vykazují částečně protizánětlivé, antiparazitické a antikancerogenní účinky. Nutno říci, že ne všechny seskviterpeny působí na zdraví blahodárně, existují poznatky o vážných toxicitách a vedlejších účincích, které se většinou zakládají na antioxidačních a prooxidačních vlastnostech seskviterpenů. Seskviterpeny jako vysoce lipofilní sloučeniny mohou být považovány za pravděpodobné modulátory (inhibitory a/nebo induktory) biotransformačních enzymů (Bártíková a kol. 2014).

Několik studií ukázalo, že některé seskviterpeny (např. zederon, germakron) působí hepatotoxicky a to díky vzniku reaktivních metabolitů, zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku a narušením antioxidační obrany buněk. Je pravděpodobné, že další zástupci terpenů nacházejících se v silicích, jejichž metabolismus a účinky na lidská játra ještě nebyly dostatečně prozkoumány, by mohly tento problém sdílet. Podrobnější výzkum v oblasti toxicity a metabolismu těchto látek by výrazně pomohl k předcházení rizika jaterního poškození (Zárybnický a kol. 2018).

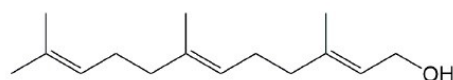
Hepatotoxikanty, tedy látky způsobující poškození jater, se liší v morfologických a funkčních změnách, které svým působením v játrech vyvolávají. Možné jaterní poškození naznačuje výskyt zonální nekrózy, hepatitidy, cholestázy, steatózy, granulomu, vaskulárních lézí, novotvaru či venookluze (Singh a kol. 2011). Diagnostickými biochemickými parametry oznamujícími jaterní poškození jsou bilirubin, aspartátaminotransferasa (AST), alaninaminotransferasa (ALT) a alkalická fosfatasa (ALP). Relevantním indikátorem jaterního poškození je elevace hladin těchto enzymů v séru. Zatímco zvýšení celkového i konjugovaného bilirubinu vypovídá o celkové funkci jater. V případě, že dojde k vzestupu AST a bilirubinu (bez významné elevace ALP), mohlo by jít o další známku poškození. Ovšem samotné zvýšení AST může být méně specifické pro diagnostiku vážného jaterního poškození (Reuben a kol. 2004; Zárybnický a kol. 2018).

V současné době se z rostlin používaných v tradiční čínské medicíně či ajurvédě izolují a identifikují další seskviterpeny s biologickými účinky. Například kurkumel-9,10-epoxid a kurkuzedoalid B byly izolovány z metanolového extraktu pocházejícího z *Curcuma zedoaria* (čeleď Zingiberaceae) a byl popsán jejich cytotoxický účinek v buňkách lidského karcinomu žaludku (AGS buňky) (Lee a kol. 2019).

Nejznámějšími **acyklickými seskviterpeny** jsou **farnesol** (FAR) a **nerolidol** (NER). Díky svým biologickým aktivitám jsou hodně prozkoumány a vzniká řada nových poznatků o jejich použití v terapii. Jejich možná interakce s léčivy ale nebyla dosud plně prostudována, stejně jako jejich schopnost modulovat aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika typu cytochromu P450 (CYP) a dalších. Modulace aktivity biotransformačních enzymů by mohla vyvolat vážné vedlejší účinky a ohrozit život pacienta (Špičáková a kol. 2017).

2.1.2.1 *Farnesol*

Ze základní struktury **farnesolu** ((2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeka-2,6,10-trien-1-ol, FAR), uvedené v Obrázku 4, jsou přímo odvozeni i další acyklickí zástupci (Bártíková a kol. 2014).



farnesol

Obrázek 4 Vzorec farnesolu (převzato ze Špičáková a kol. 2017)

Farnesol je bezbarvá kapalina získaná z rostlinných silic, vyznačující se jemnou květinovou vůní. Kromě zjevného použití v parfumerii, kde podtrhuje sladkou květinou vůni parfémů, se také přidává do cigaretového tabáku, využívá se jako insekticidní atraktant či přírodní pesticid proti roztočům, nebo se přidává do výrobků proti pocení nohou (Williams 2011).

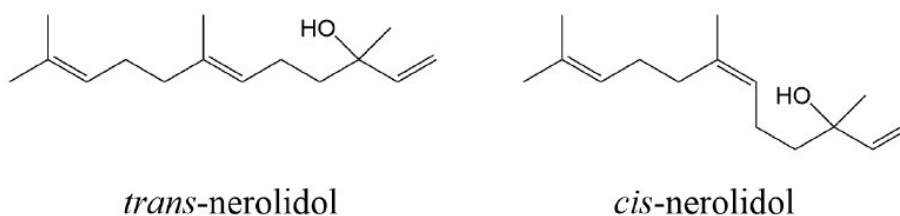
Nachází se v květech jasmínu, růže, pomeranče hořkého, tuberózy či bramboříku (Jung a kol. 2018, Špičáková a kol. 2017).

Farnesol je antioxidant s protizánětlivými, antialergickými, chemopreventivními a antikancerogenními účinky (Špičáková a kol. 2017). Proto se používá k léčbě alergického astmatu, diabetu, aterosklerózy, obezity a hyperlipidémie. Z některých studií vyplývá, že farnesol reguluje zánětlivou odpověď a má příznivý účinek na edém, alergické astma, gliózu, onkogenezi v tlustém střevě, kožní kancerogenezi a imunitní systém. Vykazuje také antineoplastické účinky pomocí inhibice buněčné proliferace *in vitro* a potlačení růstu tumoru *in vivo* u různých druhů nádorových onemocnění, např. u nádorů pankreatu, plic, prostaty, prsu, u leukémie či mnohočetného myelomu. Nicméně

krémy obsahující farnesol mohou kromě příznivých účinků u pacientů s atopickou dermatitidou vyvolat i alergické reakce, a proto je vhodné jejich toxicitu v přípravcích pečlivě monitorovat (Jung a kol. 2018).

2.1.2.2 Nerolidol

Nerolidol (3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodekatrien-3-ol, peruviol, NER) je allylický isomer farnesolu a existuje ve dvou geometrických konformacích – *trans* a *cis* (Obrázek 5). Můžeme jej najít v silicích různých rostlin, jako jsou cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*, čeleď Fabaceae), niaouli (*Melaleuca quinquenervia*, Myrtaceae) a neroli (*Citrus aurantium*, Rutaceae) (Schiller a Schiller 2008; Špičáková a kol. 2017).



Obrázek 5 Vzorec *trans*- a *cis*-nerolidolu (převzato ze Špičáková a kol. 2017)

Obecně je nerolidol popisován jako čirá, světle žlutá až žlutá kapalina se slabým květinovým oděrem připomínajícím růži a jablko (Lapczynski a kol. 2008). Své využití nachází v různých odvětvích průmyslu, kde se přidává do šampónů nebo čisticích prostředků, ale i jako potravinové dochucovadlo (Chan a kol. 2016).

Nerolidol má antibakteriální, antiparazitické, antikancerogenní účinky a díky svým antioxidačním a protizánětlivým účinkům je také neuroprotektivní (pozorováno na rotenonem-indukovaném modelu Parkinsonovy choroby u potkanů), což z něho dělá kandidáta pro potencionální léčbu Parkinsonovy choroby (Javed a kol. 2016; Špičáková a kol. 2017). Další možné naděje přináší i do léčby babesiosy (pozorováno *in vitro*) (AbouLaila a kol. 2010), schistosomasy (pozorováno u myši) (Silva a kol. 2014) či malárie (pozorováno na myších) (Saito a kol. 2016).

Souhrnně lze říci že, nerolidol disponuje velkým potenciálem a mohl by přispět k objevení nových léčiv.

Nerolidol může být extrahován z různých částí rostliny, jako jsou listy (nejčastější zdroj pro extrakci), květiny, semena, ovoce, pryskyřice, větvičky a dřevo. Z hlediska procentuálního podílu nerolidolu v **listech** byl nejvyšší podíl nalezen v *Piper*

claussonianum (Miq.) C. DC. (Piperaceae, 81,4 %), následovaný *Zanthoxylum hyemale* A.St.-Hil. (Rutaceae, 51,0 %), *Zornia brasiliensis* Vogel (Fabaceae, 48,0 %) a *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. (Rutaceae, 28,4 %). Nejvíce **cis-nerolidolu** bylo nalezeno ve větvičce *Myrocarpus fastigiatus* Alemao (Fabaceae, 80 %). Na přítomné koncentrace nerolidolu mají vliv jak mikroklimatické, tak environmentální faktory, jako třeba roční období, klima nebo typ půdy. Nejčastější metodou detekce je plynová chromatografie s hmotností detekcí (GC-MS) (Chan a kol. 2016).

2.2 BIOTRANSFORMACE

Během tzv. **biotransformace** se léčiva v organismu přeměňují působením specifických, ale i nespecifických enzymových reakcí, přičemž vznikají látky lépe rozpustné ve vodě, které jsou snáze vylučovány z organismu. Výsledkem mohou být metabolity vykazující stejný nebo podobný farmakologický účinek jako parentní látka. Frekventovaněji ale dochází k přeměně na neúčinnou látku (inaktivace), popřípadě vzniká látka účinnější (aktivace). Nebezpečnější je případ, kdy přeměna vede ke vzniku toxické nebo toxickejší látky, než byla látka původní. Raritně se můžeme setkat s tím, že k biotransformaci nedochází vůbec (Hampl a kol. 2007).

Biotransformace je definována jako **dvojstupňový proces** a rozděluje se do dvou fází (Linhart a kol. 2012):

- **1. fáze** – oxidační, redukční a hydrolytické reakce
- **2. fáze** – konjugační (slučovací) reakce s polárními endogenními látkami (např. glutathion (GSH), sulfát, acetát a další).

V **první fázi** se xenobiotikum přeměňuje na obvykle polárnější metabolity vyznačující se snadnější rozpustností v tělních tekutinách než původní látka. Setkáváme se s reakcemi **oxidačními**, které jsou katalyzované převážně cytochrom P450 monooxygenasovým systémem v játrech, dále s reakcemi **redukčními**, katalyzovanými např. nitroreduktasami a azoreduktasami nacházejícími se v endoplasmatickém retikulu, a reakcemi **hydrolytickými**, které jsou katalyzované různými esterasami či amidasami (Hampl a kol. 2007).

Druhá fáze je zastoupena reakcemi **konjugačními** s endogenními produkty normálního metabolismu, kdy, kdy vzniká konjugát ve vodě rozpustný (výjimkou je methylace, při které vzniká metabolit lipofilnější než parentní látka) a vylučující se močí,

stolicí nebo potem (HAMPL a kol. 2007). Slučovací reakce vyžaduje přívod energie, proto endogenní látka musí být aktivována vazbou s kofaktorem (Skálová a kol. 2013).

V experimentální části své diplomové práce jsem se zabývala vlivem acyklických seskviterpenů na genovou a proteinovou expresi vybraných enzymů 1. fáze biotransformace, a proto se dále soustředím pouze na ně.

2.2.1 Enzymy 1. fáze biotransformace

Biotransformační enzymy mění chemickou strukturu cizorodé látky a snižují její koncentraci v celém organismu a/nebo v určité tkáni, a zároveň vytvářejí v těle další xenobiotické sloučeniny. Z původně přijaté látky se tvoří nová sloučenina s jinou chemickou strukturou (metabolit) a jinými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (Skálová a kol. 2013). Biotransformační enzymy se vyznačují tím, že tentýž enzym může katalyzovat biotransformaci více substrátů (Linhart a kol. 2012).

Jejich primárním úkolem je detoxikovat cizorodé látky a usnadnit tak jejich eliminaci (Skálová a kol. 2013). Kdyby nedocházelo k vylučování lipofilních látek, následovalo by jejich uskladňování v tukové tkáni, které by v průběhu času umožňovalo dosažení toxických koncentrací i po relativně nízké hladině expozice (Linhart a kol. 2012).

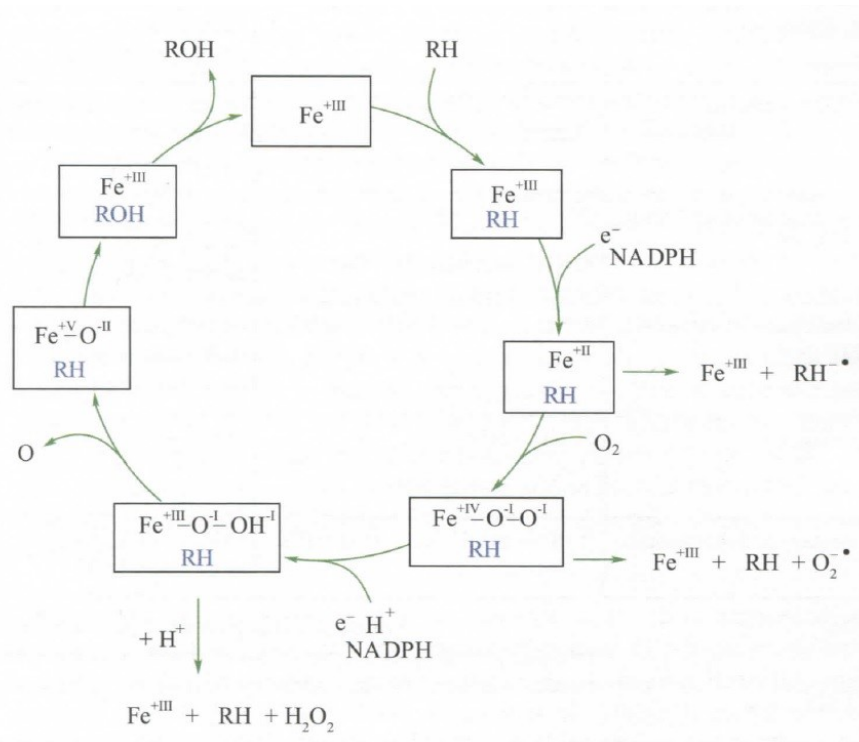
Kromě biotransformačních enzymů se na metabolismu xenobiotik podílí transportní proteiny přenášející cizorodé látky a jejich metabolity skrze membrány (Skálová a kol. 2013).

2.2.1.1 Cytochromy P450 (CYP)

Nejběžnějšími enzymy 1. fáze biotransformace jsou **cytochromy P450** (CYP), které katalyzují oxidační reakce především xenobiotik, přičemž využívají jako oxidační činidlo kyslík a jako kofaktor redukováný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) (redukční činidlo) (Linhart a kol. 2012; Špičáková a kol. 2017).

Jedná se o nadrodinu tzv. hemoproteinů – jejich redukováná forma tvoří komplex s oxidem uhelnatým s výrazným absorpčním maximem v UV-VIS spektru při 450 nm. Zároveň s oxidací substrátu kyslíkem (vstupem jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu) se druhý atom kyslíku, tedy druhá polovina O₂, redukuje na vodu. NADPH je právě zdrojem elektronů (Linhart a kol. 2012; Skálová a kol. 2013).

Katalytický cyklus CYP (Obrázek 6) začíná tím, že se do aktivního místa enzymu s hemovým železem v oxidačním čísle Fe^{III} naváže substrát (RH). Vzniklý komplex ($\text{Fe}^{\text{III}}\cdots\text{RH}$) se redukuje elektronem z NADPH pomocí enzymu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou. Tento enzym má jako kofaktory flavinadenindinukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN). Po redukcí na železnatý komplex ($\text{Fe}^{\text{II}}\cdots\text{RH}$) se na hemové železo naváže kyslík za vzniku hemoperoxidového radikálu, který je dále redukován elektronem z NADPH a protonizován – vzniká tzv. hemhydroperoxidový komplex ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}^{\text{-1}}\text{-OH}^{\text{-1}}\cdots\text{RH}$). Následuje katalýza NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou nebo NADPH:cytochrom b5 reduktasou (další hemovým enzym). Komplex hemhydroperoxidu se substrátem se pak aktivuje heterolytickým štěpením peroxidové vazby (odštěpením OH^- , popř. molekuly vody po předcházející protonizaci), vzniká hemový komplex železa v oxidovaném stupni Fe^{V} ($\text{Fe}^{\text{V}}\text{O}^{\text{-II}}\cdots\text{RH}$). Tento komplex přenese kyslík na navázaný substrát (za redukce hemového železa na Fe^{III}) a produkt vzniklý touto oxidací (ROH) se uvolní z komplexu. Vlastním oxidačním činidlem je hemoporfyrinový komplex $\text{Fe}^{\text{V}}\text{-O}^{\text{-II}}$ (Linhart a kol. 2012).



Obrázek 6 Katalytický cyklus cytochromu P450 (převzato z Linhart a kol. 2012)

V současné době existuje 57 funkčních genů a 88 pseudogenů kódujících CYP v lidském genomu, přičemž bylo identifikováno 35 isoformů, z nichž 18 metabolizuje

xenobiotika. Pro zajímavost, myš má 102 funkčních genů a 88 pseudogenů (Nelson a kol, 2004; Skálová a kol. 2013).

Nejhojnějším místem výskytu CYP jsou játra, dále pak gastrointestinální trakt, plíce a ledviny. CYP najdeme v menší míře prakticky ve všech tkáních (např. kůže, mozek, svaly, cévy atd.) a specializovaných buňkách (krevní destičky, makrofágy) (Skálová a kol. 2013).

Vzhledem k velkému množství identifikovaných členů této nadrodiny se CYP klasifikují na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci apoproteinu, a to na rodiny, podrodiny a jednotlivé isoformy. Příkladem může být CYP1A1, kde CYP je zkratka cytochromu P450, 1 je identifikací rodiny, A je identifikací podrodiny a 1 je identifikací isoformy (Skálová a kol. 2013).

První místo za zkratkou cytochromu zaujímá **číslice** - zástupci jedné **rodiny** se vyznačují 40% shodou v aminokyselinové sekvenci. **Druhé** v pořadí je velké **písmeno (podrodina)**, a to je stejné pro proteiny se shodou vyšší než 60-70 %. **Poslední číslice** definuje **isoformu**. Každá isoforma má jinou aminokyselinovou sekvenci, a tudíž odlišné vlastnosti či aktivitu. Není výjimkou, že pár isoform existuje pouze u jednoho druhu organismu. Najdeme ale i takové, které lze nalézt i u naprosto různých druhů (Skálová a kol. 2013).

Z 57 funkčních lidských CYP se jedná asi o tucet enzymů, které patří do rodiny CYP1, 2 a 3, které jsou zodpovědné za biotransformaci většiny cizorodých látek včetně 70-80 % všech léčiv v klinickém použití. Nejvíce exprimované formy v játrech jsou CYP3A4, 2C9, 2C8, 2E1 a 1A2, zatímco 2A6, 2D6, 2B6, 2C19 s 3A5 jsou méně zastoupené a CYP 2J2, 1A1 a 1B1 jsou exprimovány převážně extrahepatálně. Expres každého cytochromu je ovlivněna jedinečnou kombinací mechanismů, včetně genetických polymorfismů, indukce xenobiotiky, regulace cytokinů, hormonů a během chorobných stavů taky pohlavím, věkem a dalšími faktory (Handschin a Meyer 2003; Zanger a Schwab 2013).

Genetické polymorfismy, které silně závisí na etnickém původu, hrají významnou roli při působení CYP2D6, 2C19, 2C9, 2B6, 3A5 a 2A6 a vedou k různým farmakogenetickým fenotypům známých jako pomalí, střední, normální, rychlí a ultrarychlí metabolizátoři (Perlík a Slanař 2015; Zanger a Schwab 2013).

2.2.1.1.1 CYP1A2

Z podrodiny 1A je isoforma **CYP1A2** primárně exprimována v játrech a nachází se na dlouhém raménku 15. chromosomu. Zajímavostí je, že tato isoforma patří mezi enzymy, které se objevují až po 1. měsíci života (Skálová a kol. 2013; Zanger a Schwab 2013).

Spolu s isoformou CYP1A1 je hlavním aktivátorem kontaminantů životního prostředí, hlavně prekarcinogenů typu polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a dalších, které může CYP1A2 transformovat na vysoce škodlivé genotoxické produkty. Indukce CYP1A2 kouřením je dobře prokázána a byla potvrzena v nedávných studiích *in vivo*. Tato isoforma je velmi aktivní v metabolismu paracetamolu nebo kofeinu. Právě při fenotypizaci pomocí kofeinu se zjistilo, že disponuje velkou interindividuální variabilitou ve své expresi (Skálová a kol. 2013; Zanger a Schwab 2013).

2.2.1.1.2 CYP2B6

Dříve se předpokládalo, že isoforma CYP2B6 má malou funkci v metabolismu léčiv, nyní ale víme, že průměrný relativní podíl CYP2B6 na celkovém obsahu jaterního CYP je v rozmezí 2 – 10 %. Můžeme jej najít v menší míře i v ledvinách, srdci či placentě, zatímco jeho exprese v kůži je nízká nebo nulová (Wang a Tompkins 2008; Zanger a Schwab 2013).

Zvýšený zájem o jeho výzkum stimulovala identifikace stále většího počtu substrátů pro tento enzym. Četné studie dokumentují významnou úlohu CYP2B6 v metabolismu pesticidů, léčiv (např. cyklofosfamid, bupropion, propofol) a několika dalších environmentálních polutantů. Zároveň vykazuje velkou interindividuální variabilitu v expresi (Wang a Tompkins 2008; Zanger a Schwab 2013).

2.2.1.1.3 CYP2C

Podrodina lidského **cytochromu P450 2C (CYP2C)** se skládá ze čtyř isoform: CYP2C8, 2C9, 2C18 a 2C19, jejichž geny jsou lokalizovány na dlouhém raménku 10. chromozomu (Skálová a kol. 2013; Zanger a Schwab 2013).

Enzymy CYP2C mohou být exprimovány extrahepatálně zejména v tenkém střevě a kardiovaskulární tkáni. V lidském srdci převládá exprese CYP2C8 (a CYP2J2), naopak v aortě a koronárních arteriích převažuje CYP2C9, i když je zde přítomen i CYP2J2 (Delozier a kol. 2007).

CYP2C8 je zodpovědný za metabolismus antidiabetik rosiglitazonu a pioglitazonu, některých léků obsahujících kyselinu retinovou, antiarytmika amiodaronu nebo i přírodního antikancerogenního léku paklitaxelu (Zanger a Schwab 2013). Klinický význam inhibice CYP2C8 byl podpořen lékovou interakcí hyperlipidemika gemfibrozilu s cerivastatinem, při které se zvyšuje riziko rhabdomyolýzy (Backman a kol. 2002).

CYP2C9 je nejdůležitější isoformou na poli metabolismu léčiv. Vykazuje genetický polymorfismus, který se klinicky projevuje např. krvácením po aplikaci warfarinu. Jeho substrátem je tedy antikoagulant warfarin, dále antiepileptika fenytoin a kyselina valproová, perorální antidiabetika glibenklamid a tolbutamid a většina nesteroidních antiflogistik (NSAID) (Skálová a kol. 2013; Zanger a Schwab 2013). Enzym CYP2C9 také metabolizuje endogenní látky, zejména kyselinu arachidonovou a některé steroidy (Zanger a Schwab 2013). Současné podání warfarinu s amiodaronem způsobuje inhibici CYP2C9 (Skálová a kol. 2013).

Ačkoliv je mRNA **CYP2C18** vysoce exprimovaná v játrech, nemá významný vliv na metabolismus léků. Důvodem je, že přítomná mRNA není efektivně translatována do řetězce proteinu (Zanger a Schwab 2013).

CYP2C19 byl prvním z podrodiny CYP2C, který byl objeven a hraje roli v metabolické inaktivaci inhibitorů protonové pumpy (PPI) omeprazolu i pantoprazolu (Bremer a kol. 2018) a antidepresiv 1. a 2. generace. Jeho endogenními substráty jsou progesteron a melatonin (Zanger a Schwab 2013).

2.2.1.1.4 CYP3A4

Nejvýznamnější isoformou CYP je **cytochrom P450 3A4** (CYP3A4), který se vyskytuje převážně v játrech, střevě a v menším množství i v ledvinách, placentě, plicích i mozku (Skálová a kol. 2013). CYP3A4 je jedním z nejhojněji exprimovaných cytochromů v lidských játrech, zaujímá okolo 15-30 % celkového obsahu (Klein a Zanger 2013).

Je zapojen do metabolismu zhruba poloviny všech klinicky používaných lidských léčiv na trhu (Marsch a kol. 2018). Spolu s CYP3A5 vykazuje vysokou sekvenční podobnost - sdílí více než 83 % primární aminokyselinové sekvence (Zanger a Schwab 2013; de Wildt a kol. 1999). Exprese CYP3A4 je regulována prostřednictvím pregnanového X receptoru (PXR), mezi jehož ligandy řadíme např. rifampicin (RIF), a konstitutivního androstanového receptoru (CAR) (Skálová a kol. 2013; Timsit a Negishi 2007).

I když nebyl u CYP3A4 prokázán genetický polymorfismus, jeho aktivita je interindividuálně variabilní. Důvodem je výrazná indukovatelnost a citlivost k inhibičnímu působení složek v potravě i k enviromentálním kontaminantům. Výkyvy v aktivitě (nárůst a pokles) často zapříčiňují selhání léčby a výskyt vedlejších účinků. Klinicky závažné lékové interakce ohrožují pacienta při současném podávání více léčiv, kdy dochází ke kompetici o vazebné místo na CYP3A4 (Skálová a kol. 2013).

Mezi známé **induktory** CYP3A4 patří **rifampicin** (silný), **barbituráty**, **dexametazon** či **extrakt z třezalky tečkované**. Tento extrakt, jehož hlavními složkami jsou hypericin a hyperforin, indukuje CYP3A4 v závislosti na dávce, trvání a způsobu podání. Důsledkem této interakce je pokles plasmatické hladiny metabolizované látky a nárůst koncentrace metabolitu (Komorski a kol. 2004; Kousalová a kol. 2003). **Inhibitorem** CYP3A je např. **grepový džus**, který pravděpodobně inaktivuje střevní CYP3A4, nicméně existují i zprávy, které poukazují na inhibiční účinky grepové šťávy na funkci P-glykoproteinu, který transportuje substráty z enterocytů zpět do lumen střeva (Saito a kol. 2005).

2.2.1.2 Reduktasy xenobiotik

2.2.1.2.1 Karbonylreduktasa 1 (CBR1)

Pravděpodobně nejvýznamnějšími zástupci nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) účastníci se metabolismu cizorodých látek, jsou karbonylreduktasy 1 a 3 (CBR1 a CBR3) řadící se do rodiny SDR21C. I přes společnou strukturu je jejich celková podobnost menší než 20-30 % a najdeme je ve všech živých formách organismů (Skálová a kol. 2013).

Karbonylreduktasa 1 (CBR1 = SDR21C1) je jednou z nejdůležitějších cytosolických reduktas, která katalyzuje NADPH-dependentní redukcí rozdílných endogenních a xenobiotických ketonů a chinonů. CBR1 najdeme ve všech lidských tkáních, nejvíce ale v játrech, placentě nebo centrální nervové soustavě (CNS) (Skálová a kol. 2013).

Navzdory sdílení 72% sekvenční identity je substrátové spektrum CBR3 poměrně omezené ve srovnání s CBR1. Význam CBR1 tkví v metabolismu endogenních zánětlivých mediátorů (prostaglandinů), xenobiotik a různých konvenčních léčiv (daunorubicin, doxorubicin, haloperidol). Navíc ztráta CBR1 by mohla vést k hromadění

reaktivních aldehydů, vzniku oxidačního stresu (ochranná funkce) a tím k podpoření zánětlivých procesů (Selinger a kol. 2019).

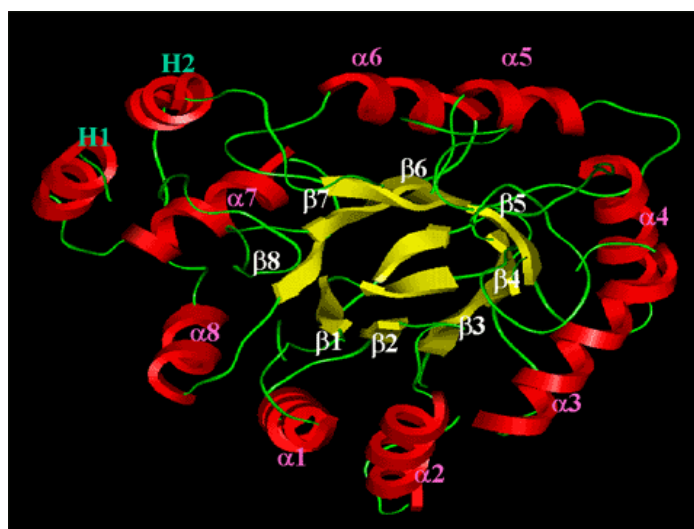
CBR1 inaktivuje vysoce reaktivní lipidové aldehydy jako např. akrolein, který je schopen modifikovat proteiny a produkovat při tom poškození DNA v buňkách (Yun a kol. 2018).

2.2.1.2.2 Aldo-ketoreduktasa 1C (AKR1C)

Termín aldo-ketoreduktasa (**AKR**) definuje nadrodinu monomerních cytosolických oxidoreduktas (multimerní komplexy tvoří rodina AKR2, AKR6 a AKR7) s více než 190 zástupci, kteří se dělí na 16 rodin (AKR1-AKR16). U člověka bylo dosud identifikováno 15 enzymů (Penning 2015; Skálová a kol. 2013).

Jejich úkolem je redukovat karbonylové substráty (cukerné a lipidové aldehydy, keto-steroidy, keto-prostaglandiny atd.) a patří k enzymům I. fáze biotransformace (Penning 2015). AKR se vyznačují tkáňovou specificitou, nízkou substrátovou selektivitou a schopností přeměňovat endogenní (např. ketosteroid nebo retinal) i exogenní látky (dolasetron, daunorubicin). AKR primárně redukuje aldehydy a ketony na primární a sekundární alkoholy s využitím NADPH jako kofaktoru (Jin a Penning 2007; Skálová a kol. 2013).

Proteiny z AKR rodiny mají charakteristickou strukturu s přítomností $(\alpha/\beta)_8$ (Obrázek 7) nebo triosafosfatisomerasového soudkového motivu v prostorovém uspořádání (Skálová a kol. 2013).



Obrázek 7 Prostorové uspořádání $(\alpha/\beta)_8$ -soudkového motivu v rodině AKR (převzato z https://www.med.upenn.edu/akr/akr_graphic.html)

Klasifikace je podobná jako u nadrodiny CYP. První číslice za zkratkou nadrodiny AKR definuje rodinu, přičemž shoda musí být minimálně ve 40 % aminokyselinové sekvence. Následuje písmeno reprezentující podrodinu (i tady je shoda alespoň v 60 % aminokyselinové sekvence). Poslední místo tvoří opět číslice vyjadřující jedinečnou proteinovou sekvenci isoformy (Skálová a kol. 2013). Členové podrodiny AKR1C (AKR1C1-C4) sdílejí více než 86% sekvenční homologii s AKR1C3 (Liu a kol. 2019).

U lidí je **AKR1C3 = hydroxysteroiddehydrogenasa** (jedna z 15 lidských aldo-ketoreduktas) nejvíce exprimována ve tkáních závislých na steroidních hormonech (prsa, endometrium, prostata) a v ledvinách. Abnormálně se exprimuje u maligních karcinomů (prsa, endometria, prostaty), ale také u myelodysplastického syndromu (MDS), karcinomu mozku nebo nemalobuněčného karcinomu plic (Chang a kol. 2013; Skálová a kol. 2013).

Kromě významné role AKR1C v metabolismu androgenů a estrogenů, se zapojují i do deaktivace protinádorového léčiva doxorubicinu a potencionálního cytostatika oracinu (Skálová a kol. 2013).

2.3 TKÁŇOVÉ ŘEZY

Technika umožňující přípravu ultratenkých tkáňových řezů (PCTS) zaujímá významné místo v oblasti výzkumu metabolismu a toxicity xenobiotik a může být využita k mezidruhovému srovnávání (de Graaf a kol. 2010).

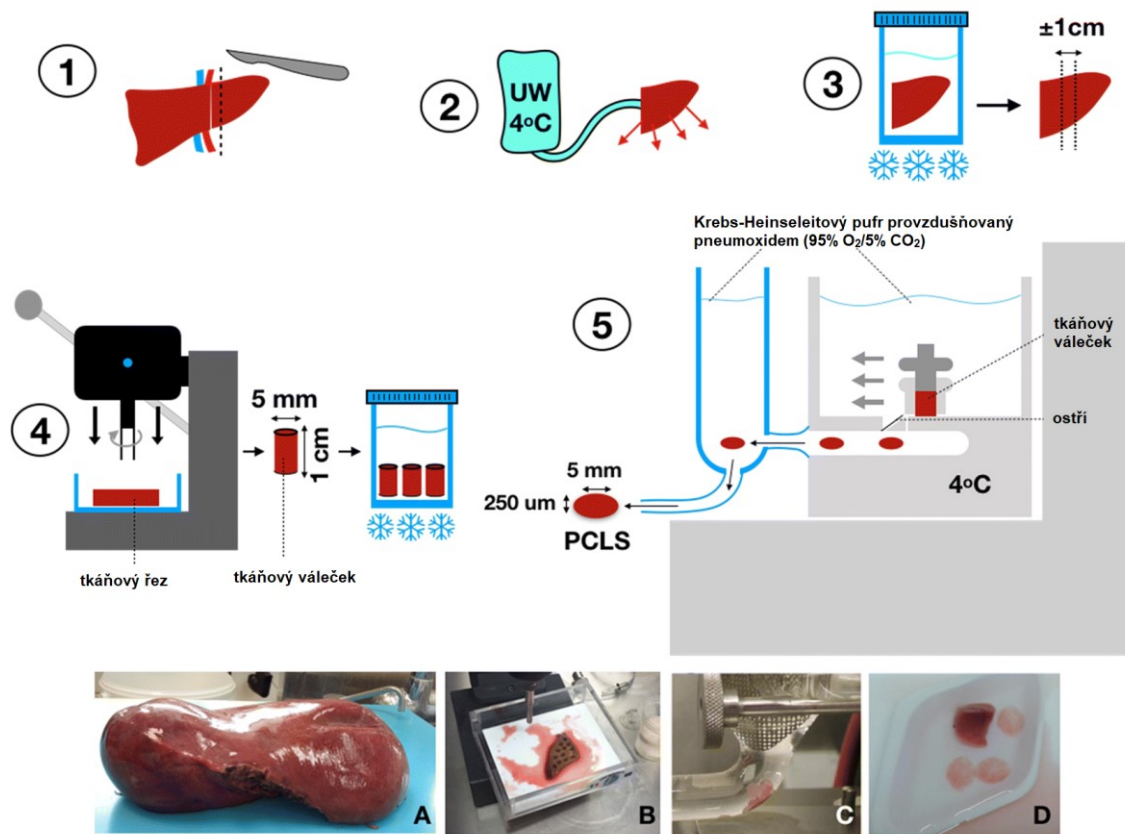
Ultratenké řezy představují *in vitro* model studovaného orgánu, přičemž je zachována jejich životaschopnost a mohou být kultivovány *ex vivo*. Řezy o definované tloušťce obsahují všechny buňky tkáně, takže je zachována intercelulární interakce mezi buňkami. Kromě toho jsou rovněž zachovány individuální vlastnosti pacienta, jako je složení extracelulární matrix s Kupfferovými buňkami a funkce stelátových buněk (= Itovy buňky), které jsou důležité pro normální funkci hepatocytů. Navíc je tato metoda díky specializovanému vybavení (automatický kráječ popsán v 80. letech 20. století Carlos L. Krumdieck a kol.), poskytujícímu univerzální způsob přípravy řezů, i dobře reprodukovatelná. Obvykle se lidské jaterní řezy pro výzkumné účely obstarávají chirurgicky z biologického odpadu, který vzniká po částečné hepatektomii (odstranění části jater) nebo se použijí játra, která nejsou vhodná pro transplantaci (de Graaf a kol. 2010; Zimmermann a kol. 2009).

Hlavním omezením použití této techniky je délka životnosti tkáňových řezů. Pro většinu tkání činí za optimálních podmínek inkubace jen 24 hodin, v případě jater až 96 hodin. Další limitace techniky spočívá v tom, že exprese biotransformačních enzymů včetně cytochromu P450 v řezech má tendenci se snižovat během prodloužené kultivace, i když rozsah snižování může být částečně závislý na podmínkách kultivace. Pro studium toxicity látek je důležitá rovněž tloušťka řezu (12-14 vrstev buněk), protože řezy tenčí než 12 vrstev mají nižší viabilitu a u řezů silnějších než 14 vrstev trpí buňky z vnitřních vrstev deprivací kyslíku a živin (de Graaf a kol. 2010; Settivari a kol. 2017).

Životnost řezů lze zachovat až po dobu 96 hodin v případě jejich inkubace v atmosféře pneumoxidu (95% O₂/5% CO₂). Nejlevnější a nejjednodušší způsob inkubace je vložení řezů do 6- nebo 12-jamkové kultivační destičky. Existují ale další možnosti – systém orgánové kultury (DOC) nebo Erlenmeyerův systém. Pro tyto systémy je nezbytné kontinuálně pohybovat médiem pomocí třepání a obnovovat jej alespoň jednou za 24 hodin (de Graaf a kol. 2010).

Možné potenciální využití tkáňových řezů spočívá i v personalizaci léčby. Ultratenké řezy mohou být připravovány i z resekovaných nádorových materiálů, což umožní stanovit nejefektivnější cytostatický lék nebo lékovou kombinaci. Je potřeba ale další validace této techniky, aby dosáhla prediktivní síly v oblasti patologie jater a farmakologickém zásahu *in vivo* (Olinga a Schuppan 2013).

Příklad možného postupu přípravy ultratenkých jaterních řezů i s popisem lze vidět na Obrázku 8.



Obrázek 8 Příprava ultratenkých jaterních řezů (převzato a upraveno z Palma a kol. 2018)
 Resekovaná jaterní tkáň (1) je ihned propláchnuta roztokem UW (University of Wisconsin) o teplotě 4°C, aby se odstranila krev (2). Poté se z resekované tkáně připraví kousek o přibližné tloušťce 1 cm (3). Pro přípravu tkáňových válečků o průměru 5 mm se využívá dutý válcový tkáňový vykrajovač (4). Tkáňové válečky jsou umístěny do držáku a krájeny v Krumdieckově kráječce (mikrotomu). Řezy (PCLS) by měly mít přibližnou tloušťku 250 μm. Tento krok se provádí při 4°C v Krebsově-Henseleitově pufru (KBH), který je provzdušňovaný pneumoxidem (95% O₂/5% CO₂) (5). Řezy se poté přesunou do destiček, kde se inkubují.

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit modulační účinek acyklických seskviterpenů na proteinovou a genovou expresi vybraných enzymů 1. fáze biotransformace v tkáňových jaterních řezech.

Tato práce tedy zahrnuje provedení:

- Příprava ultratenkých lidských jaterních řezů z tkání získaných od pacientů a jejich inkubace se studovanými acyklickými seskviterpeny (*cis*-nerolidol, *trans*-nerolidol a farnesol)
- stanovení proteinové exprese enzymů CYP2C, CYP3A4, CBR1 a AKR1C3 pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy za denaturujících podmínek s následným Western blotem
- stanovení genové exprese enzymů CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4, CBR1 a AKC1C pomocí kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase s použitím reverzní transkripce (RT-qPCR)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE

- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) ROTH
- β -glycerolfosfát SIGMA
- β -naftoflavon SIGMA
- absolutní ethanol PENTA
- akrylamid/bis-akrylamid, 40% roztok SIGMA
- BCA Protein Assay kit THERMO SCIENTIFIC
- bromfenolová modř SIGMA
- *cis*-nerolidol ALDRICH
- D-glukosa RIEDEL-DE-HAËN
- diethylpyrokarbonát (DEPC) SIGMA
- dihydrogenuhličitan sodný SIGMA
- dimethylsulfoxid (DMSO) SIGMA
- dithiotreitol (DTT) FLUKA
- dodecylsíran sodný (SDS) SIGMA
- ECL Prime Western Blotting detection reagent GE HEALTHCARE
- ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) SIGMA
- ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraoctová kyselina (EGTA) SIGMA
- farnesol ALDRICH
- fenylmethansulfonylfluorid (PMSF) SIGMA
- fluorid sodný SIGMA
- Fomadon – negativní vývojka FOMA
- Fomafix - ustalovač (univerzální, kyselý) FOMA
- gentamycin SIGMA
- glycerol 85% p.a DR. KULICH PHARMA
- glycin SIGMA
- hydrogenuhličitan sodný PENTA
- chlorid sodný PENTA
- chlorid vápenatý PENTA
- chloroform PENTA

○ inhibitory proteas	SIGMA
○ inhibitory ribonukleas (RNaseIN)	SIGMA
○ isobutanol	SIGMA
○ kyselina citronová	PENTA
○ kyselina chlorovodíková 35% p.a.	PENTA
○ L-glukosa	FLUKA
○ methanol	PENTA
○ náhodné hexamery	GENERI BIOTECH
○ N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA
○ persíran amonný (APS)	SIGMA
○ phosphate Buffered Saline (PBS)	SIGMA
○ pyrofosfát sodný	SIGMA
○ reverzní transkriptasa ProtoScript II	NEB
○ rifampicin	SIGMA
○ hovězí sérový albumin (BSA, 20%)	SIGMA
○ roztok persíranu amonného (APS)	SIGMA
○ síran hořečnatý	SIGMA
○ směs deoxynukleotidů (dNTPs)	EUROGENTEC
○ sušené odtučněné mléko	FLUKA
○ <i>trans</i> -nerolidol	SIGMA
○ TRI reagent (Trizol)	MRC
○ Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	PENTA
○ Triton X-100	SIGMA
○ Tween 20	SIGMA
○ vanadičnan sodný	ROTH
○ Xceed SG qPCR 2x mix Lo ROX	IABIO

4.2 PŘÍSTROJE

○ analytické váhy	SCALTEC
○ centrifuga Heraeus Biofuge Stratos	THERMO SCIENTIFIC
○ CO ₂ inkubátor s regulací kyslíku CB-170-O	BINDER
○ DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR	BIOSAN
○ hlubokomrazící box	JOUAN
○ laboratorní váhy	SARTORIUS

○ laminární box BioAir AURA 2000 M.A.C.	BIOAIR
○ magnetická míchačka	IKA
○ mini centrifuga Sprout	HEATHROW SCIENTIFIC
○ Mini-PROTEAN tetra	BIO-RAD
○ minivortex + minishaker MS2	IKA
○ Nanodrop 2000	THERMO SCIENTIFIC
○ PCR cyklér MJ Mini	BIO-RAD
○ pH metr inoLab	WTW
○ Real-time PCR systém Quant Studio 6	APPLIED BIOSYSTEMS
○ roler Mythic Blood Mixer 12	BIOVENDOR
○ spektrofotometr Infinite M 200	TECAN
○ termoblok Thermomixer Comfort	EPPENDORF
○ Krumdieck Tissue Slicer MD4000	TSE SYSTEMS
○ Trans-Blot Turbo Transfer System	BIO-RAD
○ ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD 2070	BANDELIN
○ UV/VIS spektrofotometr NanoDrop	THERMO SCIENTIFIC
○ vodní lázeň	THERMO HAAKE
○ zařízení na úpravu vody Milli-Q RG	MILLIPORE

4.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Pro experimentální účely byla použita **lidská játra** dárců. Játra pocházela od **pěti zástupců obou pohlaví ve věku od 45 do 81 let**, u nichž byla z terapeutických důvodů provedena částečná hepatektomie, která proběhla na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK). V Tabulce 2 lze vidět vybraný soubor pacientů spolu s doplňujícími informacemi o jejich diagnózách či komorbiditách.

Tabulka 2 Doplnující informace o vybraných pacientech

Číslo pacienta	Pohlaví	Věk (roky)	Diagnóza	Komorbidity	Patologie jater	Dlouhodobá farmakoterapie
7	MUŽ	69	kolorektální karcinom	arteriální hypertenze, cévní mozková příhoda	steatóza 15 %	Kyselina acetylsalicylová, nitrendipin
9	MUŽ	81	kolorektální karcinom	arteriální hypertenze, dyslipidémie	steatóza 5 %	betaxolol
11	ŽENA	57	karcinom rekta s metastázemi do jater	žádné	žádná	žádná
14	ŽENA	45	benigní, fokální nodulární hyperplazie	žádné	žádná	žádná
16	ŽENA	59	kolorektální karcinom	hyperlipidémie, karcinom ovária	lehký chronický zánětlivý infiltrát	žádná

U všech pacientů byly v rámci předoperačních vyšetření na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK stanoveny **parametry** ukazující na **jaterní funkce**, které byly u všech pacientů v normě (koncentrace celkového bilirubinu, aktivita aspartátaminotransferasy (AST), alaninaminotransferasy (ALT), alkalické fosfatasy (ALP)) s výjimkou **zvýšené aktivity γ -glutamyltransferasy (GMT)**, ale to je v případě kolorektálního karcinomu s metastázemi do jater nebo v případě onemocnění biliárního traktu včetně nádoru (Ciombor a Goff 2013; He a kol. 2013).

4.4 PŘÍPRAVA ULTRATENKÝCH JATERNÍCH ŘEZŮ

4.4.1 Příprava Krebsova–Henseleitova pufru

Podle Tabulky 3 jsem jednotlivé složky rozpustila v redestilované vodě a upravila pH na hodnotu 7,4 pomocí HCl. Na jedna játra jsem spotřebovala přibližně 1 litr Krebsova-Henseleitova pufru (KBH). Jako poslední jsem vždy přidávala chlorid vápenatý kvůli riziku vykrystalizování uhličitanu z pufru.

Tabulka 3 Složení KBH pufru

	Mr (g/mol)	c (mM)
chlorid sodný	58,44	150,53
síran horečnatý	246,48	1,10
chlorid draselný	74,56	3,92
hydrogenuhličitan sodný	84,01	25,00
chlorid vápenatý	147,02	1,36
dihydrogenfosforečnan draselný	138,00	1,01
D-glukosa	180,16	24,98
HEPES	238,31	9,00

4.4.2 Příprava média William's E

Do komerčně dodávaného média (Gibco) William's E + GlutaMAXem (L-alanyl-L-glutamin - stabilizovaná forma L-glutaminu) jsem v laminárním boxu přidala gentamycin (výsledná koncentrace 50 µg/µl) s L-glukosu (výsledná koncentrace 25 mM) podle Tabulky 4. Takto obohacené médium jsem sterilně přefiltrovala přes filtr s velikostí pórů 0,22 µm.

Tabulka 4 Příprava média William's E s glutaMAXem

Suplement	Mr	100 ml	200 ml	500 ml	1000 ml
50 µg/ml gentamycin	477,6	100 µl	200 µl	500 µl	1000 µl
L-glukosa	180,16	0,448 g	0,896 g	2,24 g	4,48 g

Rozložila jsem si Krumdieckův kráječ MD4000 a pak jsem jej ostříkala 70% lihem, zakryla alobalem a umístila do chladicí místnosti, kde jsem také dala připravení KBH pufr a médium.

V den experimentu jsem nechala vychlazený KBH pufr s D-glukosou provzdušnit pneumoxidem (95% O₂ /5% CO₂) zhruba jednu hodinu. Obohacené médium William's E jsem nechala předežhřát na 37 °C asi jednu hodinu předem. Kráječ jsem poskládala, naplnila okysličeným KBH pufr a vyzkoušela, zda vše funguje. Krumdieckův kráječ jsem poté připojila k vodní lázni s termostatem a nechala ho chladit vodou temperovanou na 4°C. Připravila jsem si ták s ledem, kádinku na jaterní řezy, Petriho misku s filtračním papírem na přípravu válečků z jaterní tkáně. Nachystala jsem si box s ledem, kádinku na

játra, nůžky, pinzetu, latexové rukavice, roušku a ochranné brýle. Vzorek jater jsem ihned vložila do kádinky se studeným okysličeným KBH pufrem. Vykrajovačem o průměru 8 mm jsem mírně krouživým pohybem vykrojila pravidelné válečky, které jsem umístila do otvoru v kráječi. Z nich pak Krumdieckův kráječ krájel řezy o tloušťce přibližně 150-180 μm . Po ukončení krájení jsem pufr z přístroje vypustila, přístroj opláchl a rozložený nechala uschnout.

4.4.3 Preinkubace a inkubace řezů

Do 12-jamkové destičky jsem napipetovala 1,3 ml obohaceného William's E média bez testované látky. Řezy jsem co nejrychleji přemístila pomocí pinzety s měkkými konci do jamek – vždy jeden řez do jedné jamky. Řezy jsem 60 minut preinkubovala v O_2/CO_2 inkubátoru, který byl připojen na přívod pneumoxidu. V inkubátoru byla také třepačka s horizontálním pohybem, na kterou jsem destičky s řezy položila. Během preinkubace i inkubace byla třepačka nastavená na 80 rpm. Po preinkubaci jsem řezy rychle přemístila do 12-jamkové destičky, kde byl v každé jamce 1 ml média s/bez testovaných látek (*cis*-nerolidol, *trans*-nerolidol, farnesol, rifampicin, β -naftoflavon). Výsledná koncentrace látek v médiu byla 10 popř. 30 μM . Všechny látky jsem rozpustila v dimethylsulfoxidu (DMSO). U kontrolních vzorků jsem do média přidala DMSO o výsledné koncentraci 0,1%. Řezy jsem inkubovala pro danou látku v triplicátu. Inkubace probíhala při 37 °C v atmosféře pneumoxidu po dobu 24 hodin. Následně jsem řezy rozdělila do mikrozkušavek (vždy jeden řez ve zkumavce), které obsahovaly buď 0,5 ml Trizolu (genová exprese) nebo 0,5 ml lyzačního pufru s inhibitory proteas (proteinová exprese) a dala zamrazit na -80°C.

4.5 STANOVENÉ PROTEINOVÉ EXPRESE

Pro určení proteinové exprese v lidských jaterních řezech jsem použila metodu **Western blot (= imunoblot)** umožňující identifikaci specifických proteinů z komplexní směsi proteinů extrahovaných z buněk. Součástí techniky jsou **tři kroky** – separace bílkovin dle velikosti pomocí gelové **elektroforézy**, **přenos na pevný nosič** (nitrocelulosaová membrána) a **označení a vizualizace cílového proteinu za použití primární a sekundární protilátky** (Mahmood a Yang 2012).

Tato metoda byla představena Towbinem a kol. v roce 1979 a stala se rutinní technikou pro analýzu proteinů používanou ve výzkumných laboratořích (Taylor a Posch 2014).

4.5.1 Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blot

Zásobní roztoky pro ředění vzorků

- **Zásobní lyzační pufr** (Tabulka 5) - Uchovávala jsem ho v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím jsem k 13 ml zásobního lyzačního pufru přidala 130 μl směsi inhibitorů proteas (SIGMA) a 130 μl 100 mM PMSF, který jsem získala rozpuštěním 17,42 mg/ml PMSF v ethanolu. Takto upravený lyzační pufr jsem skladovala v lednici.

Tabulka 5 Zásobní lyzační pufr

Konečná koncentrace složky	Koncentrace zásobního roztoku	Přidané množství
50 mM Tris-HCl pH 7,4	1 M	50 ml
150 mM NaCl		8,766 g
10% glycerol	85%	117,65 ml
1% Triton X-100	100%	10 ml
2 mM EDTA		0,58 g
2mM EGTA		0,76 g
40 mM β -glycerolfosfát		8,52 g
50 mM fluorid sodný		2,09 g
10 mM pyrofosfát sodný		4,46 g
2 mM DTT		0,3085 g
200 μM vanadičnan sodný		0,03678 g
redestilovaná voda		doplnit na objem 1 l

- **Zásobní vzorkový pufr (4xSDS)** – Roztok jsem připravila podle Tabulky 6 a uchovávala jsem ho v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 6 Zásobní vzorkový pufr (4xSDS)

Konečná koncentrace složky	Koncentrace zásobního roztoku	Přidané množství
200 mM Tris-HCl pH 6,8	1 M	4 ml
40% glycerol	85%	9,41 ml
6%SDS		1,2 g
0,2 M DTT		0,617 g
0,1 g bromfenolová modř		0,1 g
redestilovaná voda		20 ml

Jaterní řezy v 1,5 ml mikrozkuvkách jsem jednotlivě zhomogenizovala v lyzačním pufru krouživým pohybem pomocí tyčinkového homogenizátoru, poté jsem z každého triplikátu vytvořila směsný vzorek. Homogenát jsem poté nechala stát na ledu asi 20 minut. Vzorky jsem dále centrifugovala po dobu 10 minut při 13 000 rpm (otáčkách za minutu) v centrifuze vychlazené na 4°C. Po centrifugaci jsem odebrala supernatant a zamrazila jej na -80 °C do dalšího použití. Ve vyšetřovaných vzorcích jsem poté stanovila koncentraci bílkoviny pomocí metody s bicinchoninovou kyselinou (BCA).

4.5.1.1 Stanovení bílkoviny pomocí bicinchoninové kyseliny

Pro stanovení proteinové exprese bylo důležité, abych ve vzorcích zjistila **množství bílkoviny**. Toho jsem docílila metodou, která využívá toho, že proteiny reagují s měďnatými kationty (Cu^{2+}) v alkalickém prostředí. Měď se redukuje na Cu^{1+} , které vytváří v prostředí okolo pH 10 stabilní modrofialový komplex s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Intenzita zbarvení je přitom přímo úměrná množství bílkoviny (absorbanci komplexu jsem měřila při 562 nm) (Smith a kol. 1985).

Vytvořila jsem si tedy **kalibrační přímku**. Na začátek jsem si do mikrozkuvky napipetovala 5 μl 20% BSA a doplnila ji do 1 ml destilovanou vodou – vznikl 0,1% roztok BSA. Do dalších šesti 100 μl mikrozkuvek jsem postupně pipetovala jednotlivé komponenty podle připraveného pipetovacího schématu pro kalibrační přímku (Tabulka 7).

Tabulka 7 Pipetovací schéma pro kalibrační přímku

Číslo mikrozkuvky	Koncentrace bílkoviny ($\mu\text{g/ml}$)	Množství 0,1% roztoku BSA (μl)	Množství destilované vody (μl)
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

(např. mikrozkuvka č. 2 s koncentrací bílkoviny 200 $\mu\text{g/ml}$ obsahovala 20 μl 0,1% roztoku BSA a 80 μl destilované vody)

Pro **vzorky** jsem si také nachystala čtyři mikrozkuvky a jelikož se kompletní vzorky **ředí 5x** (tedy 1:4), vzala jsem vždy 10 μl vzorku a přidala 40 μl destilované vody.

Následně jsem si smícháním roztoku A (čirý, NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH) a B (modrý, 4% CuSO₄*6H₂O) v poměru **50:1** připravila **pracovní roztok C** (vznikne zelený roztok). Potřebný objem reagensů jsem si vypočítala podle počtu vzorků.

Všech deset mikrozkuvek s bílkovinou (pro kalibrační přímkou a pro vzorky) a pracovní roztok C jsem si rozpipetovala podle celkového pipetovacího schématu (Tabulka 8) do mikrotitrační destičky GAMA.

Tabulka 8 Celkové pipetovací schéma aplikované na mikrotitrační destičku

KALIBRAČNÍ PŘÍMKA							VZORKY								
	1		2	3	4	5	6	7	10 μl naředěného vzorku +200 μl roztoku C	8	9	10	11	12	
A	↓	10 μl bílkoviny z mikrozkuvky č. 1 +200 μl roztoku C						↓							
B															
C															
D															
E															
F															
G															
H															
		Celkové množství v jedné jamce 210 μl.							Celkové množství v jedné jamce 210 μl.						

(Do sloupce 1 jsem napipetovala 10 μl bílkoviny z mikrozkuvky č. 1 a 200 μl pracovního roztoku C a udělala celkem osm paralelních měření (A až H). Tento postup jsem zopakovala i pro ostatní koncentrace v dalších mikrozkuvkách. V rámci pipetování vzorků jsem do sloupce 7 napipetovala 10 μl naředěného vzorku a 200 μl pracovního roztoku C, udělala jsem ale jen čtyři paralelní měření.)

Po napipetování komponentů jsem destičku promíchala a nechala ji inkubovat v termobloku (Thermomixer Comfort) při 37°C po dobu 30 minut. Měření absorbance jsem prováděla na spektrofotometru (TECAN).

Po změření koncentrace bílkoviny ve vzorcích jsem si vypočetla naředění jednotlivých vzorků vzorkovým pufrem (4xSDS) a lyzačním pufrem s inhibitory proteas. Podmínkou bylo, aby každý vzorek obsahoval koncentraci bílkoviny 1 μg/μl a SDS tvořilo čtvrtinu celkového objemu (vznik 1x SDS).

Naředěné vzorky jsem denaturovala při 95°C, 5 minut a po zchlazení na pokojovou teplotu nanášela na gel. Tyto vzorky mohou být použity opakovaně, v tom případě se uchovávají v mrazáku při -20 °C i několik měsíců.

4.5.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek

Polyakrylamidová gelová elektroforéza se využívá k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Zahřátím vzorku dochází k jeho denaturaci a navázání dodecylsírany sodného (SDS), který dá proteinu záporný náboj, který je přímo úměrný hmotnosti. Po nanesení vzorku na gel a umístění do elektrického pole, dochází k migraci proteinů ke kladné elektrodě (anodě). Během migrace jsou proteiny separovány na principu molekulového síta v polyakrylamidovém gelu (Al-Tubuly 2000; García-Descalzo a kol. 2012).

4.5.2.1 Příprava polyakrylamidového gelu

Zásobní roztoky pro elektroforézu

- **4 M HCl** – Do 150 ml redestilované vody jsem přilila 88 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl) a doplnila vodou na 250 ml. Nádobu s roztokem jsem uchovávala v lednici.
- **Zásobní 40% roztok akrylamidu (AA) a bis-akrylamidu (bisAA)** – roztok byl dodaný firmou Sigma a uchovávaný v lednici
- **1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8** – Navázila jsem si 18,5 g Trisu, dále jsem přidala 75 ml redestilované vody a nechala míchat na magnetickém míchadle do rozpuštění. Pomocí 4 M HCl jsem na pH-metru upravila pH na hodnotu 8,8 a doplnila v odměrné baňce do 100 ml redestilovanou vodou. Výsledný roztok jsem uchovávala v lednici.
- **0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8** - Navázila jsem si 6 g Trisu, dále jsem přidala 75 ml redestilované vody a nechala míchat na magnetickém míchadle do rozpuštění. Pomocí 4 M HCl jsem na pH-metru upravila pH na hodnotu 6,8 a doplnila v odměrné baňce do 100 ml redestilovanou vodou. Výsledný roztok jsem uchovávala v lednici.
- **10% SDS** – Nejprve jsem si navázila 10 g SDS, který jsem rozpustila v 80 ml redestilované vody. V odměrné baňce jsem doplnila roztok redestilovanou vodou do 100 ml. Roztok jsem uchovávala při laboratorní teplotě.
- **koncentrovaný elektrodový pufr** – Navázila jsem si 72 g glycinu, 15 g Trisu a 5 g SDS. Všechny tyto složky jsem nechala rozpustit v 900 ml redestilované vody. Na pH-metru jsem upravila pH na hodnotu 8,3 pomocí 4 M HCl. Roztok jsem doplnila v odměrné baňce do 1000 ml. Následně jsem jej rozlila po 100 ml do plastových nádobek a dala zamrazit.

- **isobutanol nasycený vodou** – Smíchala jsem si čistý isobutanol a redestilovanou vodu. V horní vrstvě se potom nacházel isobutanol nasycený vodou, který jsem skladovala v lednici.

- **10% roztok persíranu amonného (APS)** – Tento roztok jsem připravovala těsně před použitím tak, že jsem si navázila 15 mg persíranu amonného, který jsem rozpustila v 250 μ l redestilované vody.

Gely (obvykle jsem připravovala **4 gely**) jsem si vždy připravovala den předem a nechala je ve stojánku v chladící místnosti.

Postupovala jsem tak, že jsem si na pracovní plochu připravila nalévací stojánek, **skla** (tloušťka **1,5 mm**), skla se spacerem, spony a hřebeny. Skla s hřebeny jsem důkladně omyla detergentem, poté redestilovanou vodou, lihomethanolem a nechala ve svislé poloze oschnout. Dvojici, sklo a sklo se spacerem, jsem přiložila k sobě a spojila sponami. Následně jsem ji postavila na určenou gumovou podložku v nalévacím stojánku, přitlačila a přichytila vrchním kolíkem. Do vytvořeného prostoru mezi oběma skly jsem nanášela roztoky na přípravu separačního a zaostřovacího gelu.

Separací (spodní) gel jsem připravovala v malé kádince, kam jsem postupně přidávala jednotlivé komponenty (redestilovaná voda, pufr 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8, roztok AA a bis-AA a 10%SDS). Další roztoky jsem přidala ihned za sebou po iniciaci polymerace a v digestoři, a to roztok APS a TEMED. Složení separačního gelu jsem uvedla v Tabulce 9.

Tabulka 9 Složení separačního gelu

	10 %- 4 gely; 1,5 mm
redestilovaná voda	19,6 ml
pufr 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	10 ml
roztok AA+ bis AA	10 ml
10 % SDS	0,4 ml
iniciace polymerace	
roztok APS	400 μ l
TEMED (digestoř)	32 μ l

Celý roztok na spodní gel jsem nechala promíchat na magnetickém míchadle a pipetou jsem ho opatrně nanasla mezi skla do výšky cca 4,5 cm od spodního okraje. Dále jsem ho opatrně převrstvila isobutanolem nasyceným vodou (na povrch každého gelu cca 200 μ l) a nechala polymerovat 60 minut. Poté jsem opatrně slila isobutanol, povrch gelu

opatrně opláchl vodou a prostor mezi skly vysušila filtračním papírem. Dávala jsem pozor, abych se nedotkla spodního gelu.

Dalším krokem bylo namíchat si roztok na **zaostřovací (vrchní) gel**. Složení zaostřovacího gelu je podobné jako u separačního, ale místo pufru 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8 jsem použila pufr 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8. Dále se liší poměrem jednotlivých složek a výslednou koncentrací gelu (Tabulka 10).

Tabulka 10 Složení zaostřovacího gelu

	4 %- 4 gely; 1,5 mm
redestilovaná voda	12,84 ml
pufr 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	5 ml
roztok AA+ bis AA	1,96 ml
10 % SDS	0,2 ml
iniciace polymerace	
roztok APS	400 μ l
TEMED (digestoř)	32 μ l

Celý roztok jsem nechala promíchat na magnetické míchače a ihned ho napipetovala mezi skla na spodní gel (po horní okraj kratšího skla). Nyní jsem opatrně zasunula hřeben až po drážky a nechala polymerovat min. 30 minut při laboratorní teplotě. Po celou dobu polymerace jsem kontrolovala gely, zda během tuhnutí nevytékají ze stojánku. Po 30 minutách jsem stojánky s gely uložila do chladicí místnosti do druhého dne.

4.5.2.2 Průběh elektroforézy

Během celého procesu elektroforézy jsem pracovala v nitrilových rukavicích. Pro potřeby elektroforézy jsem si vytáhla **naředěné vzorky** a **denaturovala** je v předeřhřátém termobloku po dobu 5 minut při 95°C. Po uplynuté této doby jsem je vložila do polystyrénové nádoby, kterou jsem do poloviny naplnila ledem.

Na pracovní plochu jsem si také přinesla sestavu na elektroforézu (vyrovnávací nádržka, stojánek na elektroforézu, napájecí zdroj, elektrody), stojánky s gely, vaničku s ledem a elektrodový pufr.

Gely jsem vytáhla ze stojánku, opláchl je pod tekoucí vodou a s opatrností z nich vytáhla hřebeny. Jamky jsem propláchl destilovanou vodou. Do připraveného stojánku na elektroforézu (možnost provádět elektroforézu až čtyř gelů) jsem vložila skla s gelem,

příčemž kratší sklo směřovalo dovnitř stojánku, přitlačila na těsnění a přitáhla je sponami. Stojánek jsem vložila do vyrovnávací nádržky.

Do vnitřního elektrodového prostoru jsem nalila elektrodový pufr, přičemž byly gely zcela ponořeny a zároveň jsem dávala pozor, aby pufr neodtékala do vyrovnávací nádržky. Pro každou další elektroforézu jsem si tento vnitřní elektrodový pufr připravovala nově ze zásobního elektrodového pufru.

Vnější elektrodový pufr jsem vyplnila vyrovnávací nádržku až po rysku určenou pro elektroforézu čtyř gelů. Tento pufr jsem používala i na další elektroforézy, tedy opakovaně.

Do stojánku se dvěma gely jsem usadila nanášecí blok s jamkami, který mi pomohl naznačit cestu pipetování.

Do krajních jamek jsem po promíchání pipetovala **5 µl molekulového standardu** (All-blue). Molekulový standard obsahuje směs modře značených proteinů o různé, ale známé molekulové hmotnosti. Denaturované **vzorky** jsem promíchala na vortexu a opatrně pipetovala (**25 µl**) do jamek. Jelikož jamek (10 jamek) bylo více než vzorků (pět - rifampicin, β-naftoflavon, farnesol, *cis*-nerolidol, *trans*-nerolidol; dvakrát molekulový standard), do zbývajících jsem po promíchání napipetovala 25 µl 1x SDS pufru, který je zředěný vodou.

Vyrovňovací nádržku jsem uzavřela víkem s elektrodami a přenesla do vaničky s ledem. Sestavu pro elektroforézu jsem připojila k napájecímu zdroji, nastavila napětí na hodnotu **90 V** a spustila. Takto elektroforéza probíhala asi **30 min**, resp. do té doby, kdy vzorky překonaly rozhraní mezi oběma gely, v tuto chvíli jsem napětí zvýšila na **150 V** a nechala dokončit elektroforézu (asi dalších **30 minut**, resp. dobu, kdy čelo překonalo spodní zelený okraj stojánku).

Následně jsem vypnula zdroj a odstranila víko s elektrodami. Stojánek jsem vytáhla z vyrovnávací nádržky, elektrodový pufr z vnitřní části vylila do výlevky a elektrodový pufr z vnější části uchovala pro další použití v lednici. Dále jsem povolila spony, vytáhla skla s gely a pomocí zeleného klínku jsem rozevřela skla. Odřízla jsem gel od spacerů, odstranila horní zaostřovací gel a u separačního gelu odřízla dolní část s barvivem. Všechny komponenty použité při elektroforéze jsem důkladně umyla, osušila a uklidila.

4.5.3 Western blot

Western blot se používá k oddělení a identifikaci proteinů ve směsi, která se separuje na základě molekulové hmotnosti gelovou elektroforézou. Následně jsou proteiny přeneseny na povrch membrány. Membrána se poté inkubuje s protilátkami specifickými pro požadovaný protein. Nenavázané protilátky se následně vymyjí a na povrchu membrány jsou proteiny detekovány značenými sekundárními protilátkami (Mahmood a Yang 2012).

Celý proces Western blotu jsem realizovala podle návodu inspirovaného, jak již bylo zmíněno, protokolem od Towbina a kol. 1979.

4.5.3.1 Průběh Western blotu

Zásobní roztok na Western blot

- **Blotovací pufr** – navážila jsem si 6,06 g 25 mM Trisu a 28,8 g 192 mM glycinu a rozpustila je v 500 ml redestilované vody. Dále jsem přidala 400 ml methanolu a v odměrné baňce doplnila do 2000 ml redestilovanou vodou. Roztok jsem přelila do 1 l láhve, kterou jsem uchovávala v lednici.

V dalším kroku jsem si připravila plastové krabičky (čtyři na jeden gel), láhev s blotovacím pufrem, nitrocelulosovou membránu, silný filtrační papír, blotovací systém Trans-Blot Turbo s dvěma kazetami a propisovací tužku.

Oříznutý gel, který jsem si takto po elektroforéze upravila, jsem vložila do plastové krabičky s blotovacím pufrem. Do další krabičky jsem do pufru naložila i jednu nitrocelulosovou membránu a do dalších dvou tlusté filtrační papíry. Vše jsem nechala v blotovacím pufru 20 minut. Jelikož jsem měla čtyři gely, opakovala jsem tento postup ještě 3x.

Vzala jsem si jednu kazetu z blotovacího systému, kterou jsem polila malým množstvím blotovacího pufru a začala **vrstvení** (odspodu směrem nahoru) – silný **filtrační papír, nitrocelulosová membrána, gel** (ten jsem opatrně od středu do stran uhladila, aby se mezi membránou a gelem netvořily bublinky) a **další silný filtrační papír**. Nakonec jsem celý komínek opět opatrně uhladila. Do jedné kazety se vešly takto připravené dva gely. Poté jsem na kazetu položila víčko a tím ji uzavřela. Obě kazety (čtyři gely) jsem vložila do blotovacího systému. Na obrazovce jsem vybrala možnost „List“, „BioRad defined“, dále „2 MINI či 1 MIDI“ a nastavila jsem tloušťku gelu na

1,5 mm. Délku blotování jsem nastavila na 20 minut a stiskla tlačítko „Run“. Posledním parametrem bylo nastavení šuplíků s kazetami. Jelikož jsem měla dvě kazety, vybrala jsem možnosti „A:Run“ a „B:Run“. Tímto jsem spustila blotování.

Po doběhnutí blotování jsem každou kazetu velmi opatrně otevřela. Nadzvedla jsem filtrační papír a zkontrolovala, zda se barva z molekulového standardu přenesla na membránu. **Na membránu jsem si propisovací tužkou vyznačila nejvýraznější proužky molekulového standardu, tj. 25, 37, 50, 75, 100 kDa.** Nejvýraznější je 75 kDa, od toho se určují ostatní.

Kazety jsem poté opláchla redestilovanou vodou a nechala je osušit.

4.5.3.2 *Detekce proteinů pomocí chemiluminiscence*

Zásobní roztoky pro detekci proteinů

- **0,1 M Tris pufr, pH 8,0** – navážila jsem si 12,11 g Trisu, který jsem rozpustila v 800 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl jsem upravila pH roztoku na hodnotu 8,0. V odměrné baňce jsem ho doplnila redestilovanou vodou na 1000 ml. Výsledný roztok jsem uchovávala v lednici.

- **TBST** – navážila jsem si 8,77 g NaCl a rozpustila jej v 300 ml redestilované vody. Přidala jsem 3 ml detergentu Tween 20 a dalších 100 ml 0,1 M Tris pufru o pH 8,0. Roztok jsem doplnila do 1000 ml redestilovanou vodou a uchovávala ho v lednici.

- **primární protilátky** – zásobní protilátky jsem dle instrukcí výrobce zředila TBST puftrem s 1% BSA. Skladovala je v mrazáku a v případě použití je včas vyndala a nechala rozmrazit.

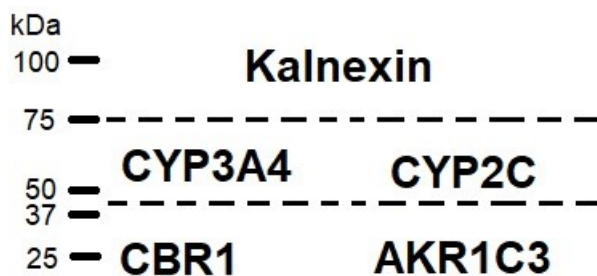
- Králičí polyklonální protilátka proti kalnexinu (ABCAM)
- Králičí polyklonální protilátka proti CYP3A4 (NOVUS BIOLOGICALS)
- Králičí polyklonální protilátka proti CYP2C8, 2C9, 2C19 a 2C12 (ABCAM)
- Králičí monoklonální protilátka proti CBR1 (ABCAM)
- Kozí polyklonální protilátka proti AKR1C3 (ABCAM)

- **sekundární protilátky** - zásobní protilátky jsem dle instrukcí výrobce zředila TBST puftrem s 1% BSA. Skladovala je v mrazáku a v případě použití je včas vyndala a nechala rozmrazit.

- Hovězí protilátka proti kozímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)

- Hovězí protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)

Pro následnou detekci proteinů jsem si rozstříhala membrány na proužky, podle toho, jaké proteiny jsem detekovala. V horní části (řez těsně nad 75 kDa) jsem detekovala kalnexin, ve střední části (řez kousek nad 37 kDa) jsem sledovala expresi CYP3A4 nebo CYP2C, ve spodní části (pod 37 kDa) jsem detekovala CBR1 nebo AKR1C3 (Obrázek 9).



Obrázek 9 Naznačení pozic pro rozstřihání membrán na proužky

Nastřížené proužky membrány jsem vkládala do jednotlivých označených 50 ml plastových zkumavek. Plastové zkumavky jsem si předem navlhčila redestilovanou vodou. Membránu jsem pinzetou srolovala do kroužku a přenesla na stěnu plastové zkumavky. Následně jsem stříčkou nalila redestilovanou vodu do zkumavky, lehce pokývala a vodu vylila, tohle jsem opakovala 3x.

Po opláchnutí jsem do plastových zkumavek s membránami nalila **5% roztok mléka v TBST pufre** v množství asi 50 ml, plastovou zkumavku jsem umístila na roler a nechala membrány blokovat aspoň 2 hodiny. Poté jsem slila roztok mléka, plastovou zkumavku opláchla redestilovanou vodou, membránu nechala lehce okapat.

Následovala **inkubace s primární protilátkou** přes noc, během které musely být plastové zkumavky na roleru v chladicí místnosti. Druhý den jsem slila primární protilátku zpět do její zkumavky a dala zamrazit. Následovalo oplachování membrán TBST pufrem, a to 4x po 15 minutách – vždy na roleru.

Dalším krokem byla **inkubace membrány se sekundární protilátkou** značenou křenovou peroxidasou (HRP) po dobu 1 hodiny a 30 minut. Dále jsem opět proplachovala membrány TBST pufrem 4x po 15 minutách.

Do temné komory jsem si připravila fotomisky s vývojkou, ustalovačem, 2x s destilovanou vodou a 1x s 3% kyselinou citronovou, 1x misku na inkubaci se substrátem, 2x kazety na vyvolávání, RTG filmy, pinzetu, fotopinzetu, ubrousky, nůžky,

rukavice, popisovač, eurofolii, pipetu (1 ml) se špičkou a kývačku s plastovými zkumavkami.

Kazety jsem vytřela čistým lihem. Pro detekci jsem použila substrát ECL Prime Western Blotting detection reagent využívaný v případě použití sekundárních protilátek s navázanou křenovou peroxidasou. Substrát obsahoval roztoky A a B, které jsem smíchala v poměru 1:1. Mikrozkušavku se substrátem jsem zabalila do alobalu a udržovala ji ve tmě do času použití.

Další postup se udál v **temné komoře pod ochranným světlem**, kde jsem si nastříhala potřebný počet RTG filmů a vložila je do kazet. Přitom jsem dávala pozor, abych se jich zbytečně nedotýkala, dotyk pouze na rohu. Nastříhala jsem si také eurofolii na vhodnou velikost.

Z plastové zkumavky jsem pinzetou vytáhla membránu, kterou jsem nechala okapat a přenesla ji do misky. Následně jsem na celou plochu membrány napipetovala připravený substrát a nechala cca 5 minut při tlumené světlo inkubovat (sledovala jsem, jestli jsou proužky ve tmě pěkně vidět). Poté jsem membrány lehce okapala, přenesla na eurofolii, zabalila a otřela přebytečnou vlhkost. Eurofolii s membránami jsem přenesla do kazety a položila na ně RTG film. Velmi opatrně, aby nedošlo k posunutí filmu, jsem kazety uzavřela. Nechala jsem je exponovat 3 – 20 minut v závislosti na intenzitě chemiluminiscence.

Záhy po expozici jsem fotopinzetou uchopila film za roh a ponořila jej do vývojky a za neustálého kývání jsem pozorovala, kdy se začnou objevovat první proužky. V tu dobu jsem zastavila vyvíjení ponořením do 3% roztoku kyseliny citronové (stačilo pár opláchnutí), poté do destilované vody, do ustalovače, kde jsem neustálým kýváním misky pozorovala, kdy film začíná černat. Posledním krokem bylo další ponoření do destilované vody. Mokrý film jsem nechala oschnout a zacházela s ním opatrně, protože byl náchylný na poškrábání. Po chvilce jsem popisovačem popsala vše potřebné a filmy uschovala. Membrány v eurofolii jsem uložila do mrazáku v případě, kdybych je chtěla znovu použít. Kazety jsem i po použití vytřela čistým lihem. Následně jsem uklidila pracoviště v temné komoře.

4.6 STANOVENÍ GENOVÉ EXPRESE

Stanovení genové exprese jsem realizovala pomocí **kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase s použitím reverzní transkripce (RT-qPCR)**.

Metoda real-time PCR (neboli **PCR v reálném čase**) se liší od klasické PCR tím, že tvorbu produktů lze sledovat v průběhu procesu v reálném čase a není tedy potřeba jejich následná elektroforetická detekce. Využívá se zvýšení intenzity fluorescenčního signálu generovaného interkalačním barvivem nebo rozpadem sondy značené barvivem během amplifikace cílové sekvence. Intenzita fluorescenčního signálu je přímo úměrná počtu amplifikovaných molekul DNA (Beránek 2016; Stephenson 2016).

Real-time PCR umožňuje **kvantifikovat** množství vyšetřovaného templátu DNA. Tato metoda je často doplňována i **reverzní transkripcí** pro stanovení genové exprese v biologickém materiálu. Hodnocení se provádí v exponenciální fázi, kdy esovitá křivka protíná mez detekce, tzv. *threshold*. Cyklus, ve kterém dochází k protnutí meze detekce, se nazývá *threshold cycle* (C_t) (Beránek 2016).

4.6.1 Izolace RNA

Jaterní řezy (jednotlivé vzorky) byly po inkubaci s testovanými látkami uloženy do mikrozkmavek naplněných 500 μ l Trizolu a uloženy do hlubokomrazicího boxu (-80°C).

Trizol (součást TRI reagentu) je specifickou směsí fenolu a guanidinisothiokyanátu a umožňuje selektivní **izolaci** celkové **RNA** (tRNA, rRNA, mRNA, mikroRNA), DNA a proteinů z buněk či tkání. Během homogenizace tkáně je tak zachována integrita RNA. Při separaci, kdy se přidává chloroform a následuje centrifugace, se směs rozdělí na vodnou a organickou fázi, přičemž RNA se nachází výlučně v horní vodné fázi. Následným selektivním vysrážením RNA pomocí isopropanolu dochází k izolaci čisté RNA (Chomczynski a Sacchi 2006; Tan a Yiap 2009).

Před samotným zahájením izolace jsem si ošetřila pracovní plochu detergentem RNaseZAP, vychladila centrifugu na 4°C a po dobu 30 minut nechala UV zářením vysvítit box pro práci s RNA. Po celou dobu procesu jsem měla na sobě rukavice, protože s ribonukleasami (RNasa) je potřeba pracovat čistě a rychle.

Vzorky tkáně jsem homogenizovala pomocí kuličkového homogenizátoru. Do každého vzorku jsem přidala jednu odměrku kuliček, vzorky jsem vložila do homogenizátoru a nechala je homogenizovat po dobu 40 s při 6 m/s. Poté jsem je vyndala a nechala 5 minut stát při laboratorní teplotě. Ke každému vzorku jsem přidala **100 µl chloroformu** a třepala 15 sekund v ruce celým stojánkem. Dále jsem vzorky nechala stát 2-3 minuty při laboratorní teplotě a následně jsem je **stočila** ve vychlazené centrifuze na 4°C po dobu 15 minut na 12 000g.

Opatrně jsem přepipetovala **horní vodnou fázi** do nových 1,5 ml mikrozkuavek a dávala pozor, aby nedošlo k promíchání mezifáze nebo dolní organické fáze a nedošlo tak ke kontaminaci genomovou DNA a proteiny.

K přepipetované horní vodné fázi jsem přidala **250 µl isopropanolu**, intenzivně v ruce protřepala a nechala stát při laboratorní teplotě 10 minut. Následně jsem vzorky stočila ve vychlazené centrifuze (4°C) 10 minut při 12 000g (mikrozkuavky jsem si poskládala otevíráním ke středu, abych v případě neviditelnosti pelet odhadla jejich polohu).

Poté jsem odstranila supernatant a omyla peletu 0,5 ml 75% ethanolu, který jsem si naředila z absolutního ethanolu DEPC vodou. Následně jsem pořádně protřepala mikrozkuavky a stočila je na 5 minut při 7 500g ve vychlazené centrifuze (4°C). Pomocí skleněné pipety jsem velmi opatrně odsála supernatant, přičemž jsem si dávala pozor, aby nedošlo k odsátí pelety, která by mohla být průhledná.

Dále jsem nechala peletu sušit na vzduchu v otevřené mikrozkuavce po dobu přibližně 10 minut (v případě brzkého zprůhledňování pelety bylo nutno zahájit další krok rozpuštění i dříve). Rozpuštění pelety jsem provedla v 40 µl DEPC vody a důkladně promíchala na vortexu. Následně jsem nechala vzorky stát 5 minut při laboratorní teplotě, promíchala ještě jednou a uložila je na led.

4.6.2 Měření koncentrace a čistoty vzorků

Měření koncentrace a čistoty RNA vzorků jsem realizovala na přístroji **NanoDrop**. Nejprve jsem si očistila hroty přístroje napipetováním 2 µl redestilované vody a spustila jsem v počítači program NanoDrop. Poté jsem horní a dolní hrot osušila buničinou. V programu se mi otevřela tabulka a já jsem měření nastavila na měření RNA. Nyní jsem opět na spodní hrot přístroje napipetovala 2 µl vody, která představovala blank, a započala měření. Po skončení jsem opět oba hroty důkladně očistila buničinou. Na

vortexu jsem si promíchala jednotlivé **vzorky** a nanášela je po **2 µl**. Před každým měřením jsem si v programu zapsala, o který vzorek se jedná. Následně jsem si celou tabulku s výsledky přenesla na flash disk.

Údaje, které mne v tabulce zajímaly: **koncentrace, čistota I a čistota II**. Čistota I (kontaminace proteiny) ukazuje poměr absorbancí DNA a proteinů, který by měl být > 1,8 (A260 (DNA)/A280 (proteiny)). Čistota II pojednává o kontaminaci fenolem a jeho hodnota by se ideálně měla blížit 2. Vzorky jsem následně ošetřila DNAsou, nebo jsem je uložila do hlubokomrazicího boxu k pozdějšímu zpracování.

4.6.3 Ošetření DNAsou

Zásobní roztoky pro ošetření DNAsou

- **0,5 M EDTA s pH 8,0** – Navážila jsem si 18,61 g ethylendiamintetraacetátu (EDTA), který jsem rozpustila v 80 ml DEPC vody a přidala 2 g hydroxidu sodného (NaOH). Během měření pH jsem roztok míchala a postupně přidávala NaOH, dokud nedošlo k rozpuštění EDTA (okolo hodnoty blížíící se pH 8). Poté jsem doplnila kádinku do 100 ml.

- **0,1 M EDTA s pH 8,0** – Zásobní roztok 0,5 M EDTA o pH 8,0 jsem si naředila redestilovanou vodou v poměru 1:4.

- **DEPC voda** – 1 l redestilované vody jsem ošetřila 1 ml 0,1% (v/v) diethylpyrokarbonátu (DEPC), protřepala, nechala stát přes noc a následně vysterilizovala v autoklávu při 120°C 20 minut.

Ošetření vzorků RNA DNAsou umožňuje selektivní štěpení pouze DNA a odstraňuje případnou kontaminaci vzorků genomovou DNA.

Z naměřené koncentrace RNA jsem vypočítala objem každého vzorku, který obsahuje 10 µg RNA, a objem DEPC vody, který musím přidat, aby byl celkový objem této směsi 26 µl. Pak jsem připravila mastermix obsahující DNAsu a pufr v poměru 1:3. Objem mastermixu odpovídal počtu vzorků zvětšeného o 1-2.

Mikrozkumavky se vzorky jsem promíchala a nechala inkubovat ve stolním termobloku po dobu 25 minut při 37°C s třepáním 500 rpm (otáčky za minutu). Následně jsem přidala 1,5 µl 0,1 M EDTA a inkubovala dalších 10 minut při 75°C (inaktivace DNAsy). V posledním kroku jsem napipetovala 18,5 µl DEPC vody do každé mikrozkumavky. Výsledná koncentrace ošetřené RNA je 0,2 µg/µl a je připravená na

reverzní transkripci. RNA ošetřená DNasou byla uchovávána v hlubokomrazicím boxu při -80°C .

4.6.4 Reverzní transkripce

Reagencie pro reverzní transkripci

- **reverzní transkriptasa (RT)** – ProtoScript II (NEB)
- **reakční pufr** – reakční pufr je dodávám spolu s reversní transkriptasou
- **DTT** – 10x ředěný, také dodávám spolu s reversní transkriptasou
- **směs deoxynukleotidů (dNTPs)**- koncentrace každého byla 5 mM
- **RNaseIN**- inhibitor ribonukleasy (RNasa)
- **oligonukleotidy** - náhodné hexamery (GENERI BIOTECH)
- **DEPC voda**

Reverzní transkriptasa (replikační enzym retrovirů) přepisuje primární sekvence nukleotidů **RNA** do struktury DNA v přítomnosti všech čtyř deoxynukleotidů (deoxyadenosintrifosfát (dATP), deoxycytidintrifosfát (dCTP), deoxyguanosintrifosfát (dGTP) a deoxythymidintrifosfát (dTTP)) za dobře definovaných podmínek. Výsledkem je jednořetězcová DNA známá jako komplementární DNA (**cDNA**), která je stabilnější. RNA je totiž náchylnější k degračním procesům katalyzovaným RNasami i během skladování. Analýzou cDNA dostaneme spolehlivější informace o molekulách RNA nacházejících se ve vzorku (Beránek 2006; Haddad a Baldwin 2010).

Připravila jsem si směs vzorků do mikrozkušavek (5 μl RNA ředěné na 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 1 μl náhodných hexamerů). Vzorky jsem promíchala a nechala stočit. Po zapnutí PCR termocykléru (BIO-RAD) jsem do něj vložila mikrozkušavky se směsí a nechala je zahřát na 65°C po dobu 5 minut. Poté jsem zmáčkla možnost „Pause“, vytáhla mikrozkušavky, které jsem vložila do chladicího stojánku a mírně je stočila.

Během zahřívání jsem si připravila mastermix „RT+“ (Tabulka 11) podle počtu vzorků (+1-2 navíc): - 4 μl 5x ředěného pufru, 2 μl DTT, 4 μl dNTPs, 0,5 μl RT a 3,5 μl DEPC vody.

Tabulka 11 Složení mastermixu RT+

RT+
4 µl pufr 5x ředěný
2 µl DTT
4 µl dNTPs
0,5 µl RT
3,5 µl DEPC vody

Do mikrozkušavek se vzorky jsem po stočení přidala 14 µl mastermixu RT+, promíchala, stočila a dala zpátky do PCR cykléru předeřhát na 10 minut při 25°C, poté na 50 minut při 42°C (syntéza cDNA) a následně 20 minut na 65°C (denaturace RT).

Po reakci jsem do směsi přidala 80 µl redestilované vody, přičemž jsem cDNA zředila 5x. Do následujících reakcí jsem přidávala 5 µl ředěné cDNA – a tedy 5 µl odpovídá 50 ng RNA.

V případě uchovávání cDNA jsem zachovala skladovací teplotu -20°C.

4.6.5 Kvantitativní PCR v reálném čase

Reagencie pro kvantitativní PCR v reálném čase

- **qPCR kit xCEED (BIOTECH)** – směs SYBR Green I 2x koncentrovaný (2x SG mix) obsahující DNA polymerasu, dNTPs, pufr a barvivo SYBR green I
- **forward (F) primer** – ředěný na koncentraci 5 µM
- **reverse (R) primer** – ředěný na koncentraci 5 µM
- **redestilovaná voda**
- **ředěná cDNA (1:4)** z minulého kroku

Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12 Použité primery

Gen	F primer	R primer
CYP1A2	CTTCCCTGAGAGTAGCGATGAGA	GCAGTCTCCACGAACTCATGAG
CYP2C	TTTGGGATGGGGAAGAGGAG	GGAGCACAGCCCAGGAT
CYP2B6	CAGCTTCCGAGGGTACATCA	AGGATTGAAGGCGTCTGGTT
CYP3A4	CCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGG	CTGGTGTCTCAGGCACAGA
CBR1	TTGGTACCCGAGATGTGTGC	CTTGGGGTTTTATTAGAGGGAG
AKR1C	ATGAGGAGCAGGTTGGACTG	GCTTTGAAGTGTAGAATATGTCTTCT

Nejprve jsem si zapnula systém pro real-time PCR (THERMO SCIENTIFIC) 30 minut předem. Do dvou 0,5 ml mikrozkušavek jsem napipetovala mastermix pro cílový a mastermix pro referenční gen. Přípravu mastermixů pro qPCR, kde finální koncentrace primerů je 250 nM, jsem realizovala pomocí Tabulky 13. Oba použité primery byly předem ověřené (kontrola účinnosti, čistoty, koncentrace) a smíchané v mikrozkušavce.

Tabulka 13 Složení obou SYBR Green I mastermixů (MM) pro qPCR

	MM pro referenční gen (1x)	MM pro cílový gen (1x)
voda	4,2 µl	4,2 µl
2x SG mix	10 µl	10 µl
směs primerů (F+R)	0,8 µl	0,8 µl
celkem	15 µl	15 µl

(V případě měření tří vzorků, bude výpočet vypadat následovně: 3 vzorky v duplikátu + 1 vzorek navíc kvůli pipetovací chybě a 1x NTC (no template control, kde místo cDNA je voda) – celkově tedy 8 x)

Směs obou mastermixů jsem rozpipetovala do 96-jamkové destičky po 15 µl dle schématu uvedeného v tabulce 14 a 15 (mikrozkušavky se vzorky byly v duplikátech). Poté jsem do každé jamky obsahující **vzorek** dala **5 µl cDNA** (ředěná 1:4) a do jamky obsahující **kontrolu 5 µl vody** (1x pro cílový gen a 1x pro referenční gen).

Tabulka 14 Pipetovací schéma jamek pro cílový gen (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4, CBR1 nebo AKR1C)

Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	NTC kontrola
15 µl MM s cílovým genem +5 µl vzorku 1	15 µl MM s cílovým genem +5 µl vzorku 2	15 µl MM s cílovým genem +5 µl vzorku 3	15 µl MM s cílovým genem +5 µl vody

Tabulka 15 Pipetovací schéma jamek pro referenční gen (GAPDH:SDHA)

Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	NTC kontrola
15 µl MM s ref. genem +5 µl vzorku 1	15 µl MM s ref. genem +5 µl vzorku 2	15 µl MM s ref. genem +5 µl vzorku 3	15 µl MM s ref. genem +5 µl vody

Takto připravené destičky jsem si uzavřela speciální folií, stočila v centrifuze a dala do PCR cykléru. Spustila jsem program a započala měření. Během měření jsem

kontrolovala průběh fluorescenčních křivek (amplifikačních) a křivky tání. Nastavený počet cyklů byl 40 a měření trvalo 1 h 10 minut.

Naměřená data jsem exportovala do programu Microsoft Excel a podle metody „comparative C_t“ jsem provedla výpočty (Schmittgen a Livak 2008):

$$\text{„comparative C}_t\text{“: } 2^{-\Delta C_t} = 2^{-(\Delta C_t(\text{cílový gen}) - \Delta C_t(\text{referenční gen}))}.$$

5. VÝSLEDKY

5.1 MODULAČNÍ ÚČINEK *CIS*-NEROLIDOLU, *TRANS*-NEROLIDOLU A FARNESOLU NA PROTEINOVOU EXPRESI VYBRANÝCH ENZYMŮ 1. FÁZE BIOTRANSFORMACE

Realizaci denaturující elektroforézy s následným Western blotem jsem zjišťovala proteinovou expresi čtyř enzymů 1. fáze biotransformace u pěti pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny těmito látkami - *cis-nerolidol* (**cNER**), *trans-nerolidol* (**tNER**), **farnesol** (**FAR**), **rifampicin** (**RIF**) a **β -naftoflavon** (**BNF**). Mezi studované enzymy patřily dvě isoformy cytochromu P450 (**CYP3A4** a **CYP2C**), karbonylreduktasa 1 (**CBR1**) a aldo-ketoreduktasa 1C3 (**AKR1C3**). **RIF** a **BNF** sloužily jako pozitivní kontroly.

Jaterní řezy byly se studovanými látkami inkubovány v koncentraci **10 μ M** (u pacienta č. 16 *cis-nerolidol* a *trans-nerolidol* i v koncentraci **30 μ M** - **cNER30** a **tNER30**) při 37°C po dobu 24 hodin. U pacienta č. 16 nebyly jaterní řezy inkubovány s **FAR** a **BNF**.

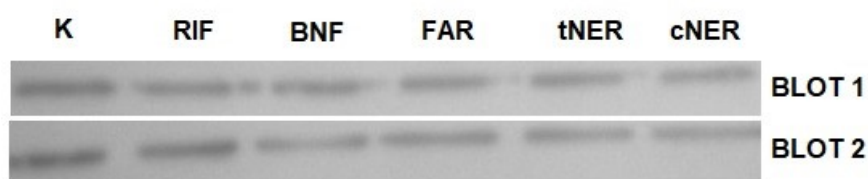
Filmy, které jsem získala při chemiluminiscenční detekci proteinů, jsem si nasnímala pomocí přístroje GelDoc XR do počítače. Denzitu jednotlivých proužků jsem vyhodnocovala v programu **ImageJ 1.51w**. Denzita proužku poskytuje informaci o množství exprimovaného proteinu jednotlivých enzymů vzhledem k denzitě proužku stabilně exprimovaného proteinu, kalnexinu (**K**). Jedná se o konstitutivně exprimovaný protein endoplasmatického retikula. Kalnexin jsem tedy brala jako kontrolu nanášení a to pro cytosolické i mikrosomální enzymy, protože jsem pracovala s tkáňovým homogenátem, který vznikl po zpracování (homogenizaci) jaterních řezů po inkubaci se studovanými látkami.

Protože jsem v rámci Western blotu pro každý stanovovaný enzym dělala opakování, měla jsem hodnoty ze dvou blotů (platí i pro protein kalnexin). Vyhodnocení jsem prováděla jako poměr denzity proužku vybraného enzymu k denzitě proužku kalnexinu ze stejného blotu (stejně i pro druhý blot). Získala jsem tedy dvě hodnoty exprese daného enzymu (pro oba bloty), které jsem zprůměrovala a vypočetla z nich směrodatnou odchylku. Kontrolnímu vzorku, který nebyl ovlivněn žádnou látkou, jsem poté přiřadila hodnotu 1,0 a k ní vztahovala hodnoty exprese dalších ovlivněných vzorků. Vzorové vyhodnocení proteinové exprese lze vidět níže (Tabulka 16 a 17) spolu

s ukázkou získaných blotů (Obrázek 10 a 11). V dalších podkapitolách uvádím výsledky vlivu vybraných látek na proteinovou expresi všech studovaných enzymů vyjádřené formou relativní exprese.



Obrázek 10 Ukázka blotů pro kalnexin u pacienta č. 9



Obrázek 11 Ukázka blotů pro CYP2C u pacienta č. 9

Tabulka 16 Vypočítané hodnoty denzit jednotlivých proužků pro kalnexin a CYP2C u pacienta č. 9

		BLOT 1 (denzita)	BLOT 2 (denzita)			BLOT 1 (denzita)	BLOT 2 (denzita)
KALNEXIN	K	9 414,94	9 977,52	CYP2C	K	9 321,99	8 015,30
	RIF	9 358,69	11 226,75		RIF	10 805,77	6 542,45
	BNF	9 251,82	5 117,85		BNF	5 079,39	6 678,05
	FAR	9 521,51	8 608,87		FAR	7 813,78	6 752,65
	tNER	9 241,34	7 722,25		tNER	7 991,67	4 798,82
	cNER	5 574,65	5 822,77		cNER	7 528,28	4 308,94

Výpočet relativní exprese pro kontrolní jaterní řez (KALNEXIN, CYP2C):

$$BLOT 1 = \frac{\text{denzita KONTROLA (CYP2C)}}{\text{denzita KONTROLA (KALNEXIN)}} = \frac{9\,321,99}{9\,414,94} = 0,99$$

$$BLOT 2 = \frac{\text{denzita KONTROLA (CYP2C)}}{\text{denzita KONTROLA (KALNEXIN)}} = \frac{8\,015,30}{9\,977,52} = 0,80$$

$$\text{průměr}_{KONTROLA (CYP2C/KALNEXIN)} = \frac{(0,99 + 0,80)}{2} = 0,90$$

Výpočet relativní exprese pro jaterní řez ovlivněný farnesolem (KALNEXIN, CYP2C):

$$BLOT\ 1 = \frac{\text{denzita FAR (CYP2C)}}{\text{denzita FAR (KALNEXIN)}} = \frac{7\ 813,78}{9\ 521,51} = 0,82$$

$$BLOT\ 2 = \frac{\text{denzita FAR (CYP2C)}}{\text{denzita FAR (KALNEXIN)}} = \frac{6\ 752,65}{8\ 608,87} = 0,78$$

$$\text{průměr}_{FAR\ (CYP2C/KALNEXIN)} = \frac{(0,82 + 0,78)}{2} = 0,80$$

Vztažení výsledku na kontrolu, která se rovná 1,0:

$$x = \frac{\text{průměr}_{FAR\ (CYP2C/KALNEXIN)}}{\text{průměr}_{KONTROLA\ (CYP2C/KALNEXIN)}} = \frac{0,80}{0,90} = \mathbf{0,89}$$

Průměr, směrodatná odchylka a výsledná relativní proteinová exprese enzymu CYP2C v jaterním řezu, který byl ovlivněn farnesolem (pacient č. 9) je uvedena v Tabulce 17.

Tabulka 17 Průměr, směrodatná odchylka a výsledná relativní proteinová exprese enzymu CYP2C v jaterním řezu, který byl ovlivněn FAR (pacient č. 9)

	Průměr	Směrodatná odchylka (SD)	Výsledná proteinová exprese
CYP2C	0,80	0,03	0,89

Statistické zhodnocení významnosti jsem provedla pomocí statistického testu **one-way ANOVA** s post-hoc Dunnettovým testem, ve kterém byly ovlivněné vzorky porovnávány s kontrolou.

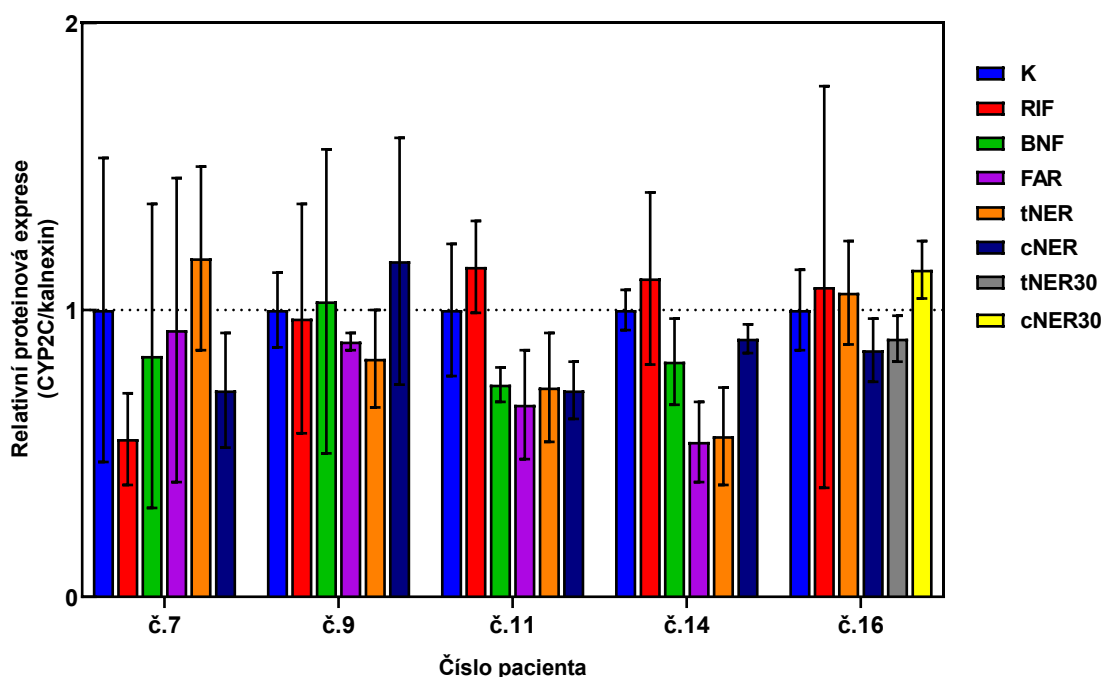
5.1.1 Vliv cNER, tNER a FAR na proteinovou expresi enzymu CYP2C

Použitá protilátka je schopná se vázat na 3 lidské isoformy CYP2C, konkrétně se jedná o isoformy 2C8, 2C9 a 2C19, a potkaní isoformu 2C12. Graf vyobrazující výslednou proteinovou expresi CYP2C u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 12.

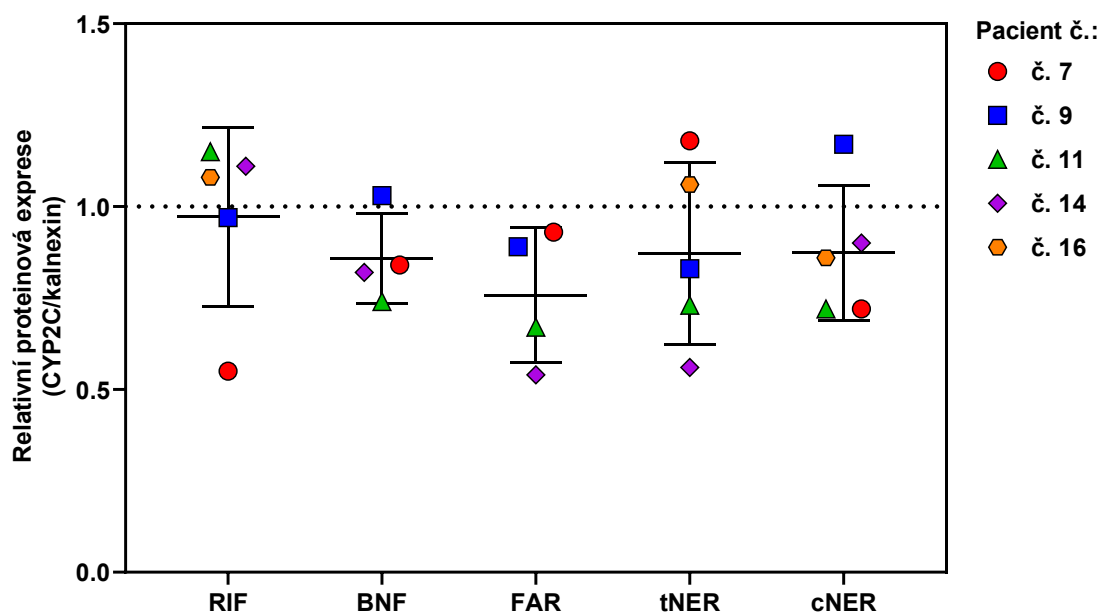
V případě vlivu studovaných látek na proteinovou expresi CYP2C v jaterních řezech získaných od všech pacientů jsem nepozorovala statisticky významné změny. Nicméně v případě FAR je patrné snížení exprese CYP2C u všech pacientů kromě

pacienta č. 16, kde nebyly jaterní řezy s farnesolem inkubovány. U pacienta č. 14 se projevil mírný inhibiční účinek FAR (o 46,1 % ve srovnání s kontrolou) a tNER (o 44,4 % ve srovnání s kontrolou) na expresi proteinu CYP2C.

Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na proteinovou expresi CYP2C měřenou u všech pacientů je uveden na Obrázku 13.



Obrázek 12 Vliv vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP2C. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μM a 30 μM (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze dvou měření spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 13 Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP2C v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

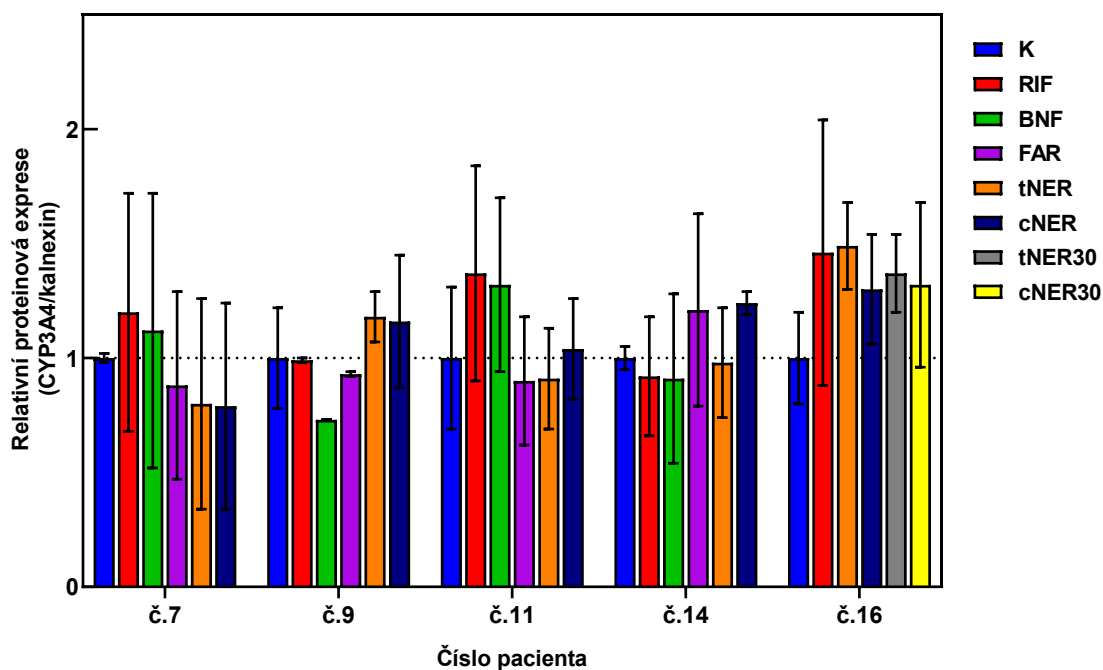
5.1.2 Vliv cNER, tNER a FAR na proteinovou expresi enzymu CYP3A4

Graf vyobrazující výslednou proteinovou expresi CYP3A4 u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 14.

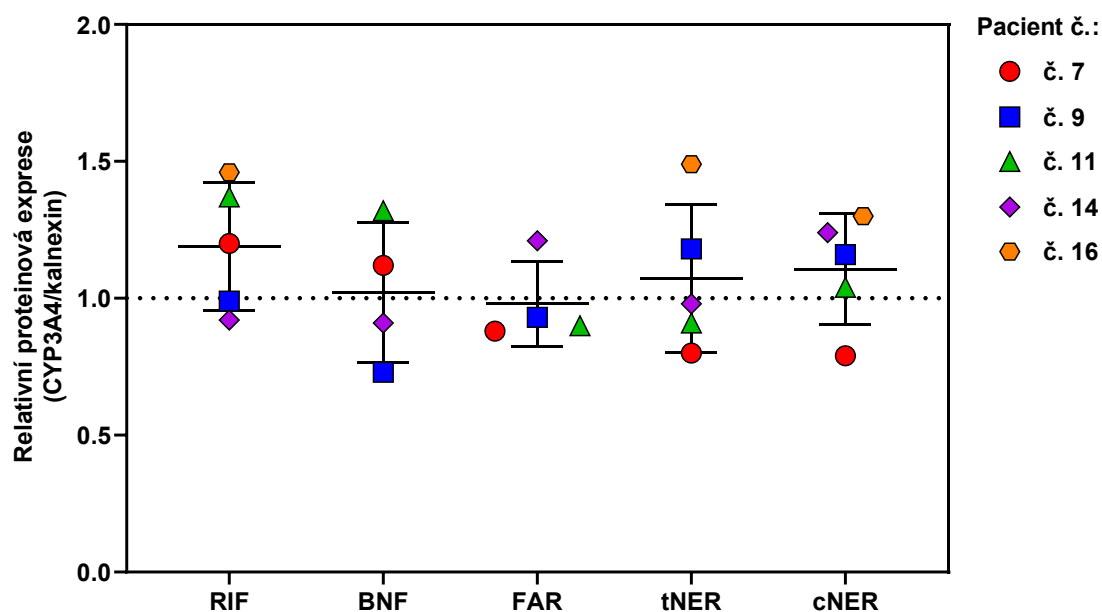
Známým a silným induktorem enzymu CYP3A4 je RIF (Kousalová a kol. 2003), ale tuto skutečnost jsem významně nepozorovala u žádného pacienta. Nejsilnější, pořád ale mírný, indukční účinek měl RIF u pacienta č. 16, kdy zvýšil proteinovou expresi CYP3A4 o 45,7 % ve srovnání s kontrolou.

Účinek seskviterpenů na expresi CYP3A4 nebyl u pacientů kvůli velkým směrodatným odchylkám statisticky signifikantní (významný). Určitý slabý indukční vliv cNER je možné nalézt u čtyř z pěti pacientů. V případě pacienta č. 16 vykazovaly mírnou indukci cNER i tNER v obou koncentracích.

K dispozici je také i souhrnný graf, kde lze vidět účinek studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP3A4 u všech pacientů (Obrázek 15).



Obrázek 14 Vliv vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP3A4. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μM a 30 μM (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze dvou měření spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 15 Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP3A4 v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

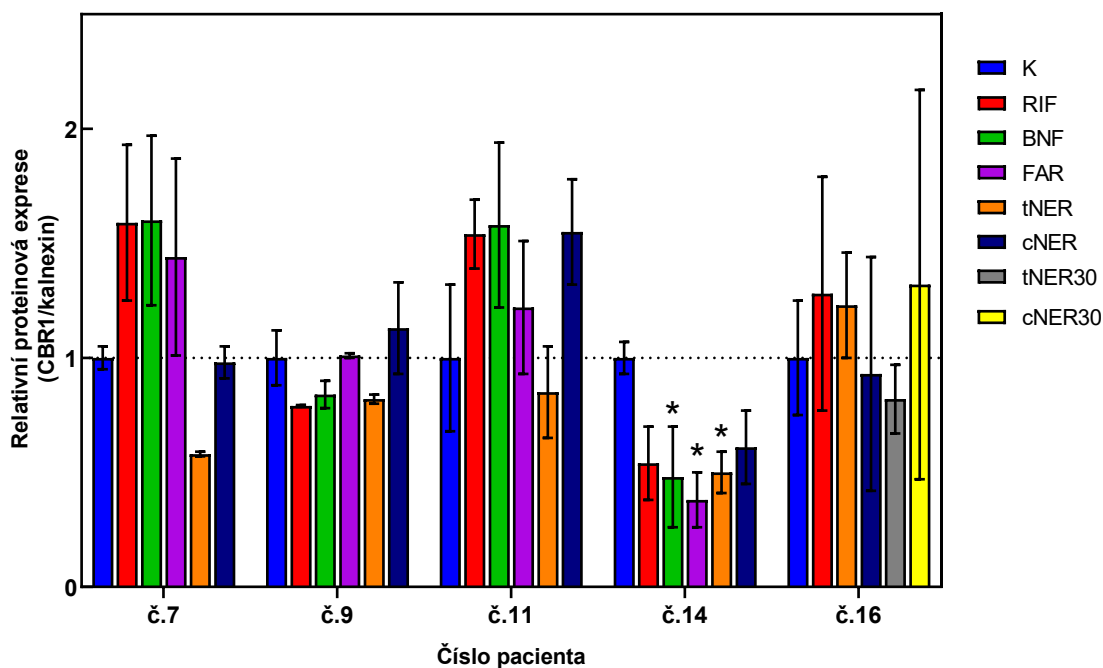
5.1.3 Vliv cNER, tNER a FAR na proteinovou expresi enzymu CBR1

Graf vyobrazující výslednou proteinovou expresi CBR1 u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 16.

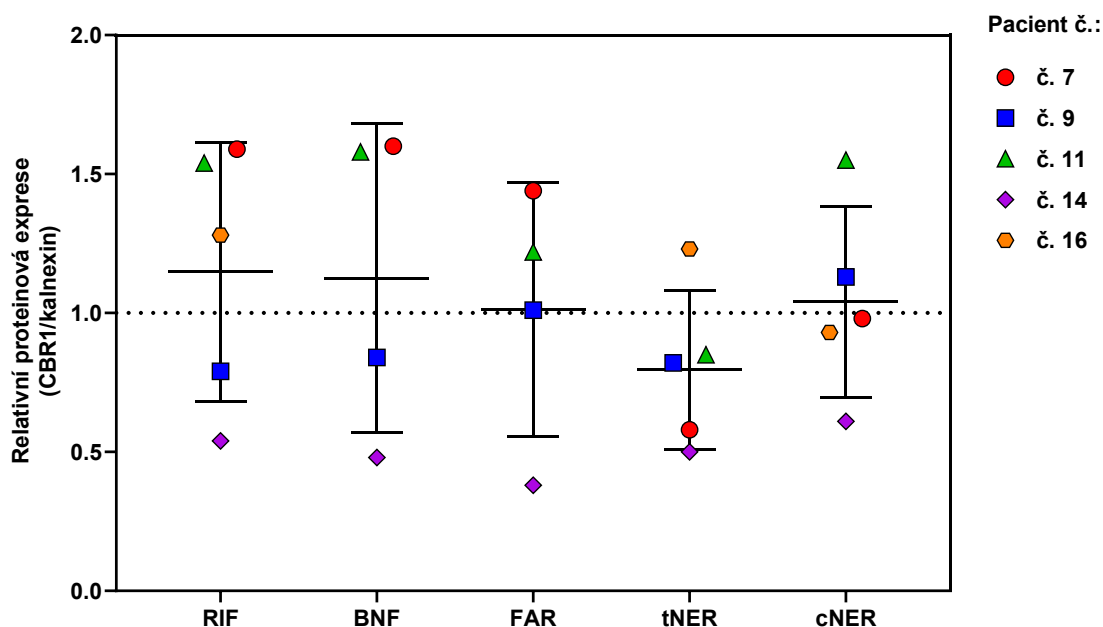
U pacienta č. 14 jsem zaznamenala signifikantní inhibiční účinek FAR a tNER na proteinovou expresi CBR1. V případě FAR se jednalo o snížení o 62,3 % oproti kontrole a látka tNER vykazovala snížení exprese proteinu enzymu CBR1 o 49,6 % v porovnání s kontrolou. U tohoto pacienta měl významný inhibiční efekt i BNF. V případě RIF a cNER došlo rovněž ke snížení proteinové exprese CBR1, které však nebylo signifikantní.

U čtyř z pěti pacientů je patrný inhibiční účinek tNER, zatímco RIF, BNF a FAR vykazovaly mírný indukční účinek u pacientů č. 7 a č. 11. FAR zvýšil u pacienta č. 7 proteinovou expresi CBR1 o 44,1 % ve srovnání s kontrolou. U tohoto pacienta jsem pozorovala i nesignifikantní inhibiční efekt tNER (snížení o 42,0 % ve srovnání s kontrolou). U pacienta č. 11 se projevoval indukční vliv cNER na expresi CBR1, kde ale také nešlo o signifikantní zvýšení (o 55,0 % oproti kontrole).

Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na proteinovou expresi CBR1 měřenou u všech pacientů je uveden na Obrázku 17.



Obrázek 16 Vliv vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CBR1. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μM a 30 μM (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze dvou měření spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



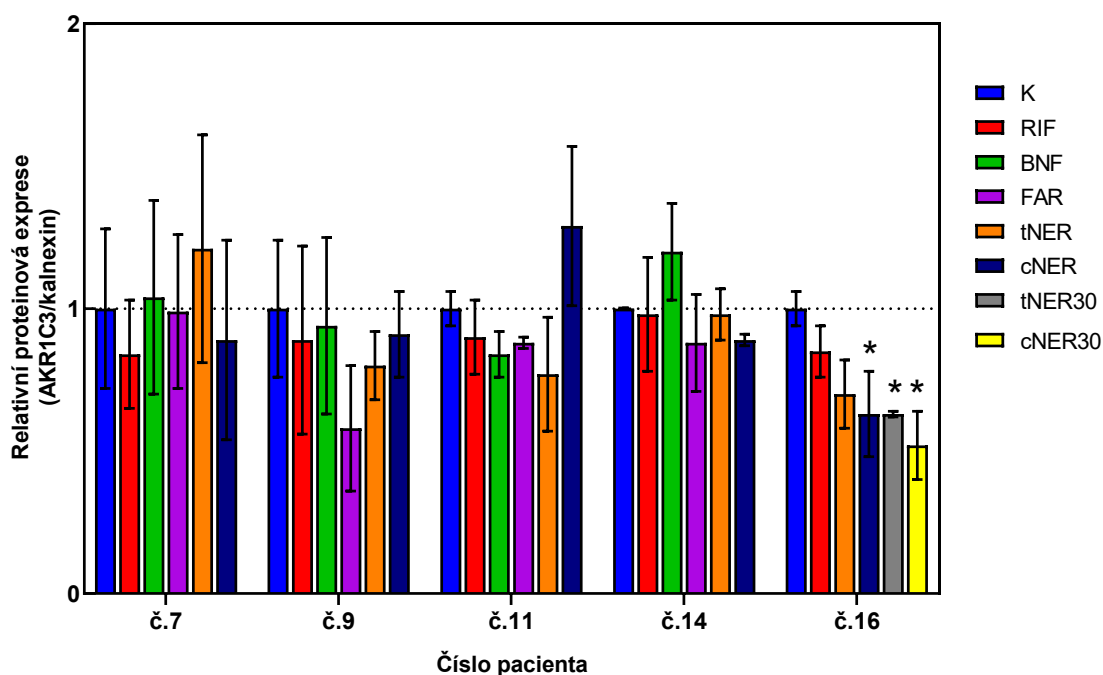
Obrázek 17 Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CBR1 v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

5.1.4 Vliv cNER, tNER a FAR na proteinovou expresi enzymu AKR1C3

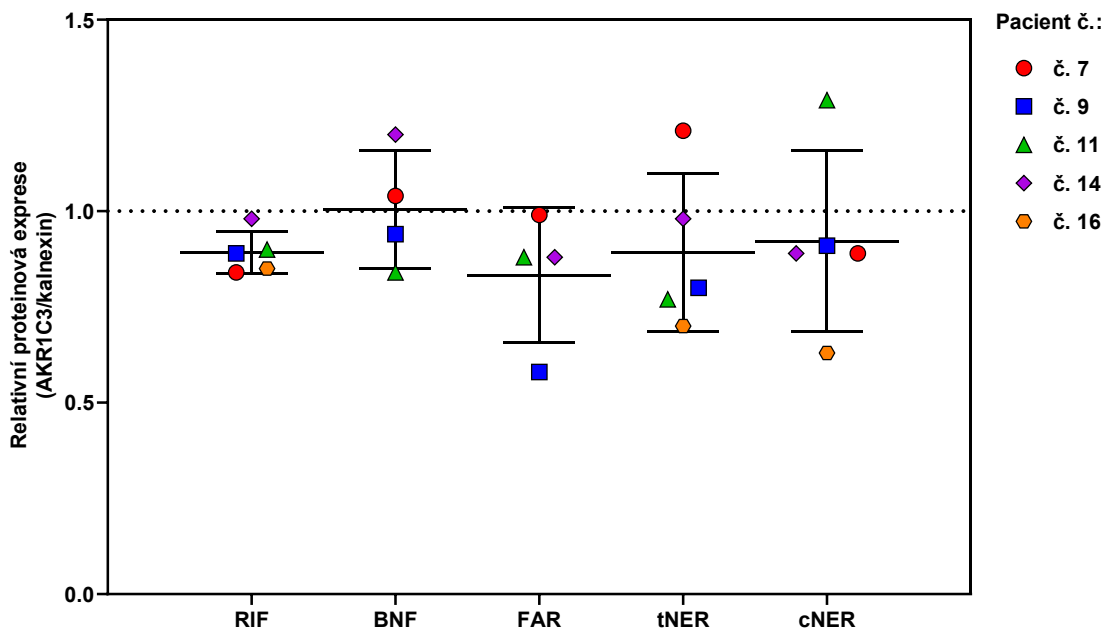
Graf vyobrazující výslednou proteinovou expresi AKR1C3 u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 18.

Na proteinovou expresi enzymu AKR1C3 měl statisticky významný vliv cNER, cNER30 a tNER30 v jaterních řezech získaných z pacienta č. 16, kde došlo ke snížení exprese o 36,6 %, o 48,23 % a o 36,6 % v porovnání s kontrolou. V grafech lze nalézt mírný inhibiční účinek FAR, který se projevil u tří ze čtyř pacientů, u kterých byl FAR použit. U pacienta č. 9 jsem pozorovala snížení proteinové exprese AKR1C3 vlivem FAR o 41,56 %, které ale nebylo signifikantní. Rovněž u cNER a tNER je tento trend patrný u čtyř resp. tří pacientů.

K dispozici je také i souhrnný graf, kde lze vidět účinek studovaných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu AKR1C3 u všech pacientů (Obrázek 19).



Obrázek 18 Vliv vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi biotransformačního enzymu AKR1C3. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μM a 30 μM (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze dvou měření spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 19 Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu AKR1C3 v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

5.2 MODULAČNÍ ÚČINEK CIS-NEROLIDOLU, TRANS-NEROLIDOLU A FARNESOLU NA GENOVOU EXPRESI VYBRANÝCH ENZYMŮ 1. FÁZE BIOTRANSFORMACE

Real-time PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR) jsem použila jako metodu pro zjištění modulačního účinku vybraných acyklických seskviterpenů na expresi mRNA šesti enzymů 1. fáze biotransformace u pěti pacientů. Jednalo se o čtyři isoformy cytochromu P450 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C a CYP3A4), karbonylreduktasu 1 (CBR1) a aldo-ketoreduktasu 1C (AKR1C). Mezi studované seskviterpeny patřily **cis-nerolidol (cNER)**, **trans-nerolidol (tNER)** a **farnesol (FAR)**. Jako pozitivní kontroly jsem použila známé induktory CYP3A4 respektive CYP1A2 **rifampicin (RIF)** a **β -naftoflavon (BNF)**.

Inkubace jaterních řezů s jednotlivými látkami o koncentraci 10 μM probíhala při teplotě 37°C po dobu 24 hodin. Výjimkou byl pacient č. 16, kde kromě 10 μM koncentrace u tNER a cNER byla zkoumána i koncentrace 30 μM (tNER30 a cNER30). Jako pozitivní kontroly byly použity RIF a BNF.

V programu „Quant Studio 6“ jsem v naměřených datech zkontrolovala průběhy **křivky tání a amplifikačních (fluorescenčních) křivek**. Pouze data ze vzorků, které splnily následující kritéria, byla považována za validní a byla vyhodnocena.

U křivky tání jsem kontrolovala přítomnost pouze jednoho píku u vzorků a ověřovala, zda se v NTC kontrole, kde jsou jen primery a voda, netvoří žádné produkty. Přítomnost produktů v NTC kontrole znamená, že vznikají primer-dimery. Jejich vznik by se projevil v NTC kontrole tvorbou nespecifického produktu s odlišnou teplotou tání. Pokud vznikají v NTC kontrole specifické produkty, pak se jedná o kontaminaci NTC kontroly.

Z amplifikační křivky popisující průběh PCR reakce (závislost fluorescence na počtu cyklů) jsem získala hodnotu C_t . Tento parametr značí cyklus, ve kterém došlo k protnutí meze detekce. S touto hodnotou jsem pak dále pracovala. Všimla jsem si také tvaru křivky (hyperbola) jednotlivých vzorků. I zde jsem sledovala, zda nedošlo k vytvoření produktu v NTC kontrole. Minimální povolený rozdíl mezi C_t hodnotou NTC kontroly a C_t hodnotami vzorků byl 5 cyklů (Beránek 2016). Standardní počet cyklů, který proběhl během PCR, byl 40.

Pro stanovení exprese jednotlivých genů bylo potřeba určit i expresi referenčního genu sloužícího jako vnitřní kontrola. Expresi referenčních genů není ovlivněna vnějšími faktory, takže porovnáním exprese referenčního genu a cílového genu jsem získala hodnoty relativní kvantifikace mRNA. Na základě experimentů provedených Veronikou Trnčákovou jsem jako referenční gen použila geometrický průměr glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasy (GAPDH) a podjednotky A sukcinátdehydrogenasy (SDHA) (Trnčáková 2018). Rovněž jsem ověřila, že studované látky neovlivňují expresi zvolených referenčních genů.

Analýzu výsledků jsem provedla pomocí metody „comparative C_t “. Nejprve jsem si vypočítala průměr všech získaných C_t hodnot (i referenčního genu) a dosadila je do rovnice $2^{(-\Delta C_t)}$, kde ΔC_t značí rozdíl mezi průměrnou C_t hodnotou vzorku a průměrnou C_t hodnotou referenčního genu. Následně jsem míře genové exprese v kontrolním vzorku (vzorek, který nebyl ovlivněn látkou) přiřadila hodnotu 1,0 a k ní vztahovala hodnoty exprese u ovlivněných vzorků. Poté jsem vypočítala jejich průměr a směrodatnou odchylku, které vycházely z hodnot pocházejících z jaterních řezů (jednoho pacienta reprezentovaly tři jaterní řezy, které jsem měřila v duplikátech).

Statistické zhodnocení významnosti jsem provedla pomocí statistického testu **one-way ANOVA** s post-hoc Dunnettovým testem, ve kterém byly ovlivněné vzorky porovnávány s kontrolou.

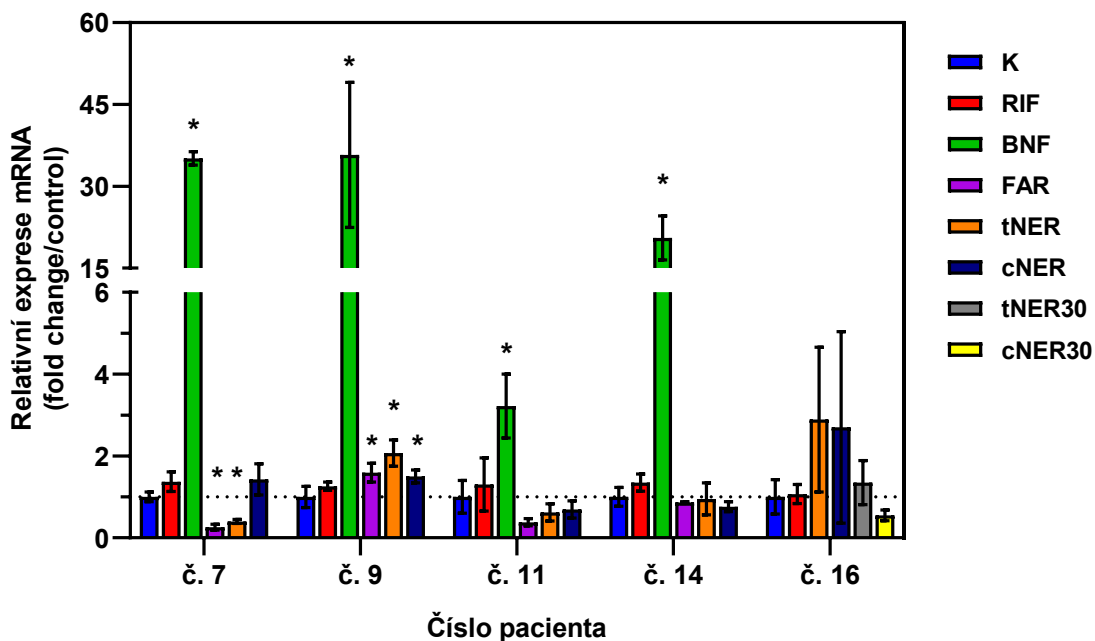
5.2.1 Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu CYP1A2

Graf vyobrazující výslednou genovou expresi CYP1A2 u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 20.

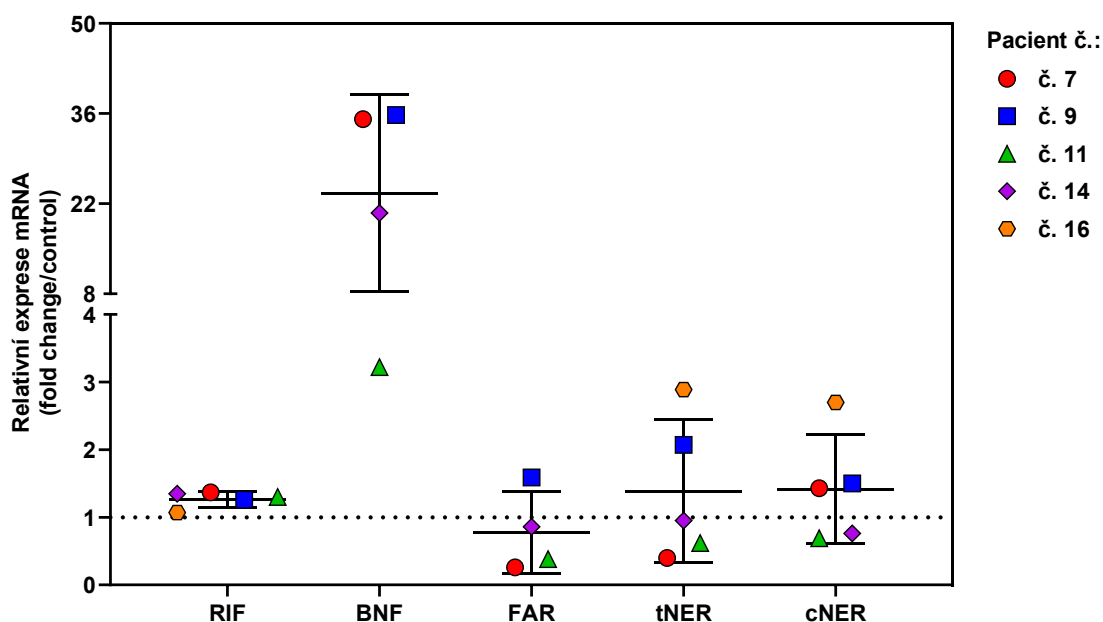
U pacienta č. 7 způsobily signifikantní změnu genové exprese enzymu CYP1A2 dva seskviterpeny – tNER způsobil inhibici exprese o 59,5 % oproti kontrole a FAR dokonce snížení exprese o 74,4 %. Všechny studované látky (FAR, tNER a cNER) významně ovlivňovaly genovou expresi CYP1A2 u člověka č.9. FAR způsobil indukci exprese o 58,9 % v porovnání s kontrolou, tNER ji zvýšil 2,1x a cNER o 49,7 %. U pacienta č. 16 se exprese daného genu vlivem látek tNER a cNER zvýšila, ale není statisticky významná (v případě tNER šlo o zvýšení 2,9x a cNER 2,7x). Stejně je tomu tak u pacienta č. 11, kde exprese CYP1A2 vykazuje nesignifikantní změnu vlivem FAR – snížení exprese o 61,7 % v porovnání s kontrolou.

V případě určování genové exprese enzymu CYP1A2 lze pozorovat enormní nárůst exprese vlivem BNF, který je viditelný ve všech vzorcích, ve kterých byl BNF přítomen. Největší indukci exprese způsobil u pacienta č. 9 (zvýšení 35,76x). BNF je známým induktorem CYP1A1/2 a můžeme tedy říci, že model jaterních řezů je funkční, protože vlivem BNF v nich došlo k výrazné indukci CYP1A2. Míra indukce se však mezi jednotlivými pacienty lišila.

Souhrnný graf, kde lze vidět účinek studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP1A2 u všech pacientů, je vyobrazen na Obrázku 21.



Obrázek 20 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CYP1A2. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μM a 30 μM (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze tří biologických replikátů spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 21 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP1A2 v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

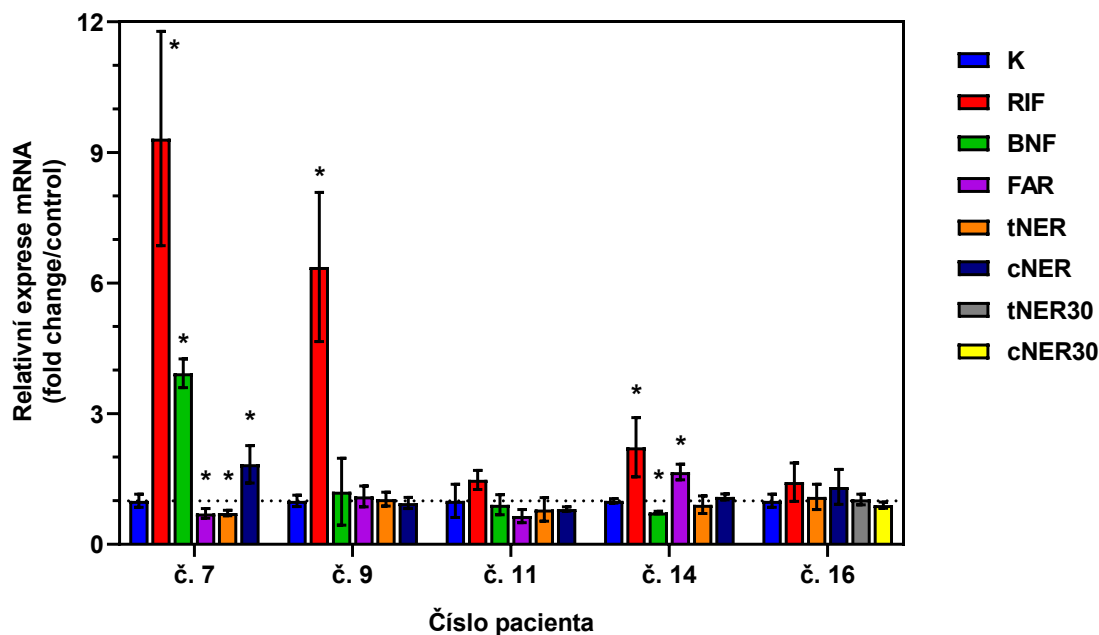
5.2.2 Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu CYP2B6

Graf vyobrazující výslednou genovou expresi CYP2B6 u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 22.

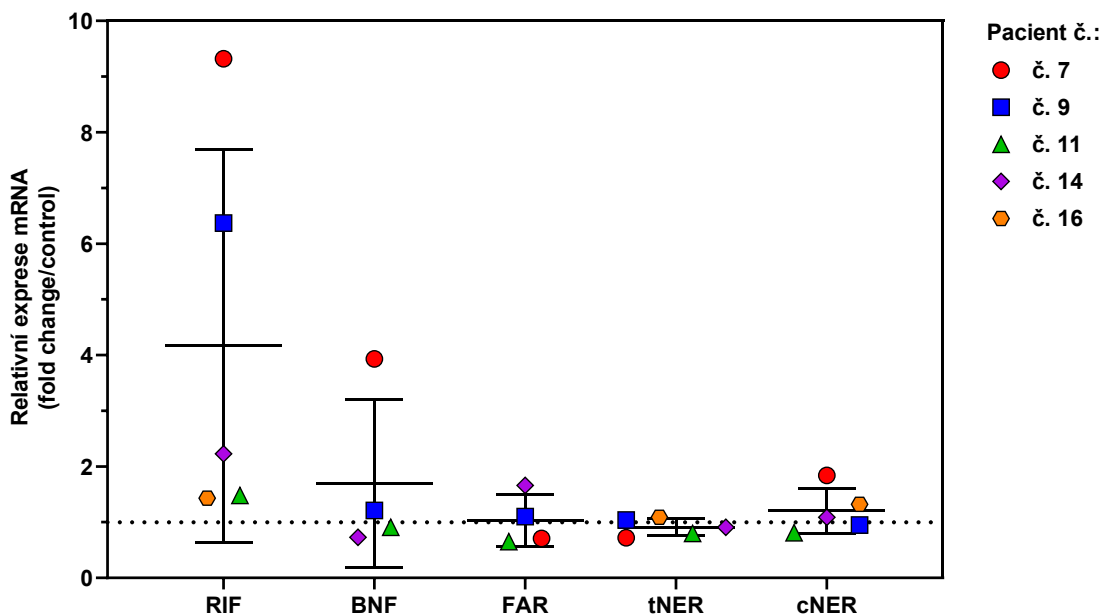
Statisticky nejvýznamnější změna nastala vlivem cNER u pacienta č. 7, kdy došlo ke zvýšení exprese enzymu CYP2B6 o 84,4 % v porovnání s kontrolou. U tohoto pacienta došlo i k dalším signifikantním změnám. Podíl na tom mají i zbývající seskviterpeny – FAR a tNER snížily expresi enzymu CYP2B6 o 29,2 % respektive o 28,1 % oproti kontrole. FAR byl i dalším důvodem změny genové exprese u pacienta č. 14. Jeho indukční vliv vedl k zvýšení exprese enzymu CYP2B6 o 66,0 % v porovnání s kontrolou.

Působení RIF vedlo k signifikantnímu nárůstu genové exprese u tří pacientů – u pacienta č. 7 (9,3x oproti kontrole), u pacienta č. 9 (6,4x oproti kontrole) a u pacienta č. 14 (2,2x oproti kontrole). BNF také způsobil signifikantní změny v expresi CYP2B6. Podílel se na zvýšení exprese 3,9x (pacient č.7) i na snížení exprese CYP2B6 o 27 % v porovnání s kontrolou (pacient č.14).

K dispozici je také i souhrnný graf, kde lze vidět účinek studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP2B6 u všech pacientů (Obrázek 23).



Obrázek 22 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CYP2B6. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μ M a 30 μ M (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze tří biologických replikátů spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 23 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP2B6 v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

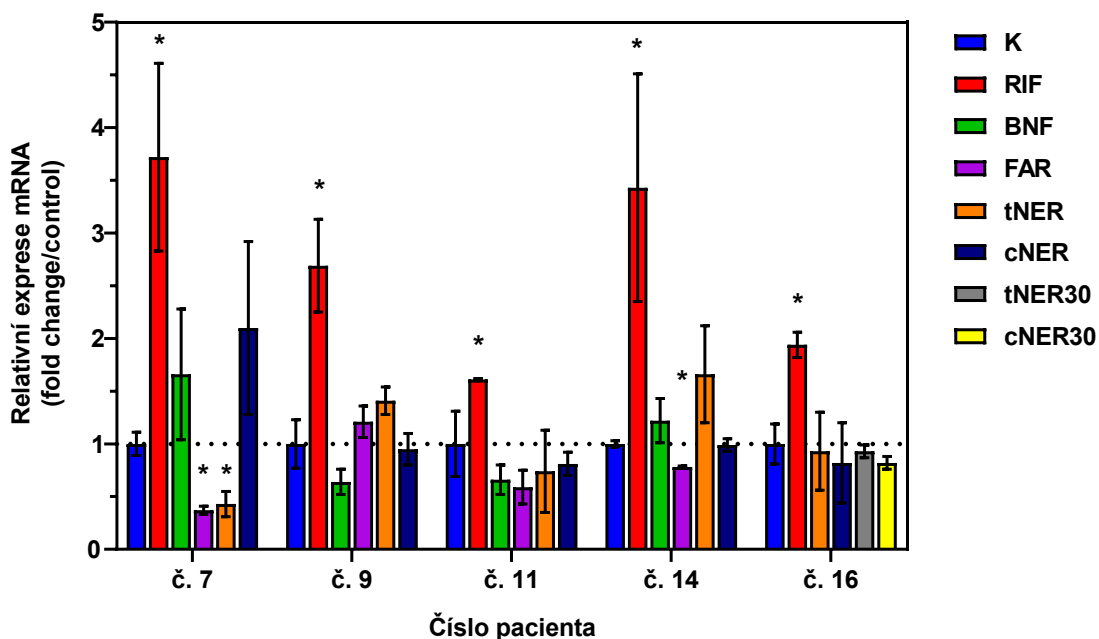
5.2.3 Vliv cNER, tNER, FAR na genovou expresi enzymu CYP2C

Primer použitý v tomto případě byl navržen tak, aby se vázal na sekvence všech čtyř isoformů lidského CYP2C (tj. 2C8, 2C9, 2C18 a 2C19). Graf vyobrazující výslednou genovou expresi CYP2C u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 24.

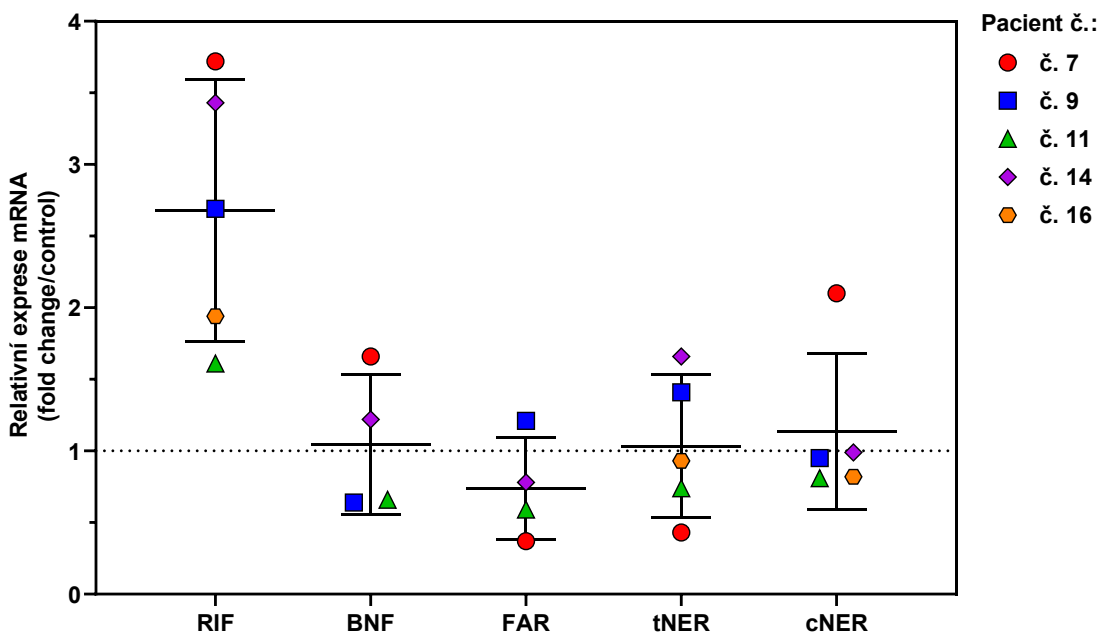
Ze studovaných seskviterpenů nejčastěji významně ovlivňoval vzorky FAR, a to u dvou pacientů. U pacienta č. 7 způsobil snížení genové exprese o 63,4 % oproti kontrole a u pacienta č. 14 snížení o 22,0 %. Signifikantní změna exprese nastala vlivem tNER u pacienta č. 7 (snížení o 56,9 % v porovnání s kontrolou). U pacienta č. 7 se exprese daného genu vlivem látky cNER zvýšila, ale tato změna není statisticky významná (zvýšení 2,1x). Účinek tNER u pacienta č. 14 ovlivnil genovou expresi enzymu CYP2C, což způsobilo zvýšení exprese o 65,5 % oproti kontrole. V tomto případě se taky nejedná o statisticky významnou změnu.

RIF a jeho indukční účinek způsobil statisticky významný nárůst genové exprese enzymu CYP2C u všech pacientů. U pacienta č. 7 způsobil zvýšení exprese 3,7x oproti kontrole. U dalších pacientů to bylo o něco méně – 3,4x (pacient č. 14), 2,7x (pacient č. 9), zvýšení exprese o 95,0 % oproti kontrole (pacient č. 16) a zvýšení exprese o 60,7 % (pacient č. 11).

Souhrnný graf, kde lze vidět účinek studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP2C u všech pacientů, je vyobrazen na Obrázku 25.



Obrázek 24 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CYP2C. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μM a 30 μM (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze tří biologických replikátů spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 25 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP2C v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

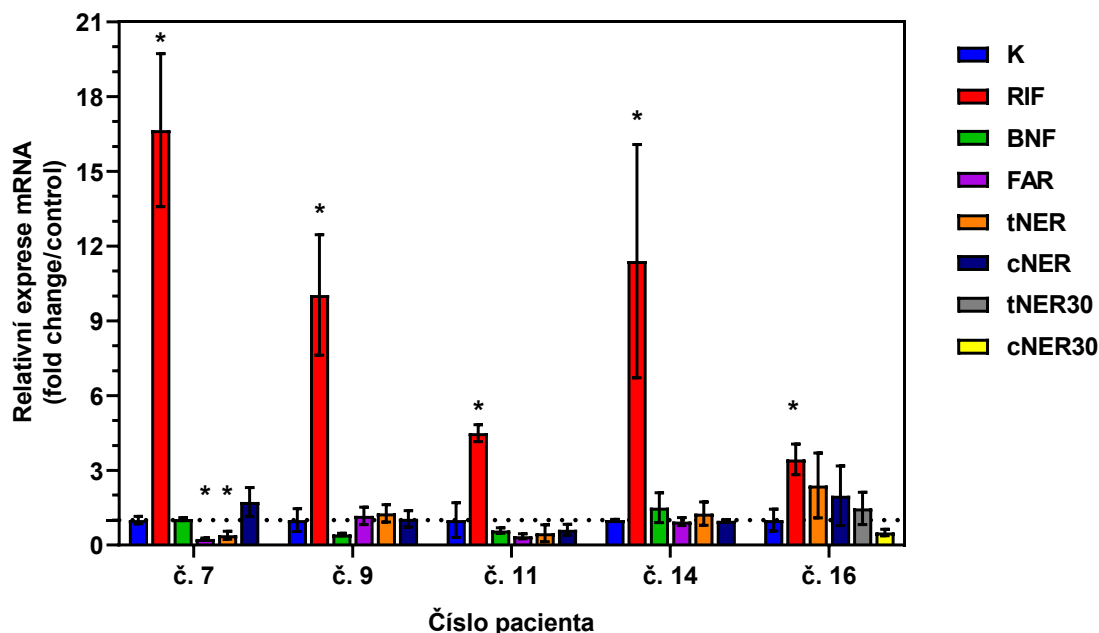
5.2.4 Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu CYP3A4

Graf vyobrazující výslednou genovou expresi CYP3A4 u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 26.

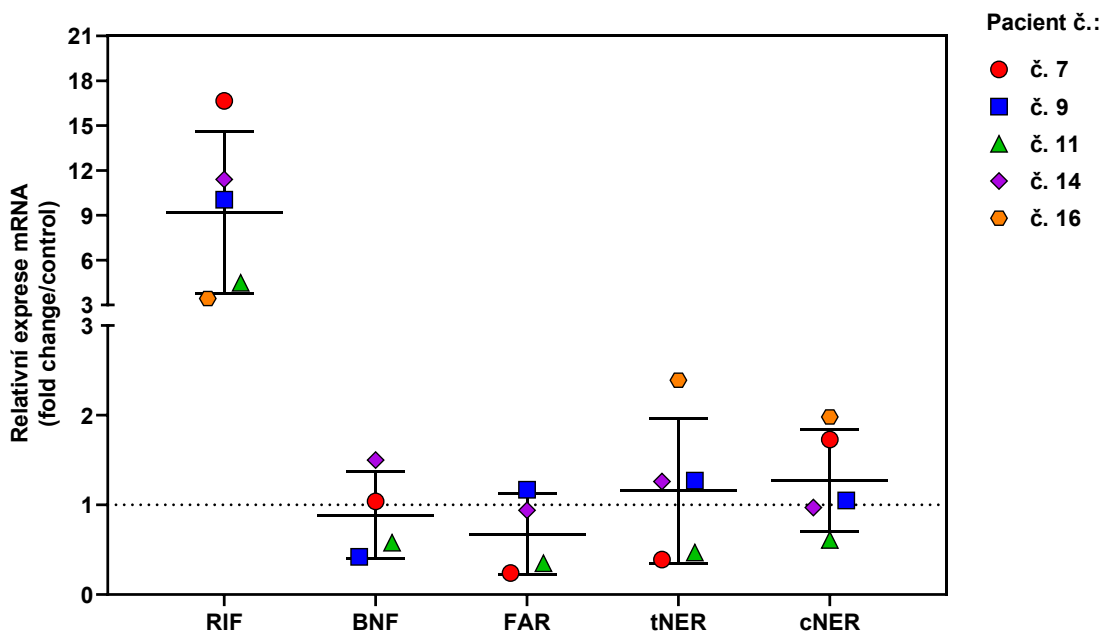
Jelikož je RIF významným a silným induktorem enzymu CYP3A4, projevila se tato skutečnost ve výsledcích. U všech pacientů způsobil RIF signifikantní nárůst genové exprese CYP3A4, nejvíce u pacienta č. 7 (16,7x), dále u pacienta č. 14 (11,4x), pacienta č. 9 (10,0x), pacienta č. 11 (4,5x) a u pacienta č. 16 (3,4x). I zde, podobně jako v případě CYP1A2, byly pozorovány rozdíly v míře indukce u jednotlivých pacientů.

U pacienta č. 7 také došlo k statisticky významné změně díky dvěma látkám (FAR a tNER). Oba seskviterpeny způsobilý snížení genové exprese enzymu CYP3A4 v porovnání s kontrolou (FAR snížil expresi o 76,3 % a tNER o 60,8 %). Ve výsledném grafu jsou také vidět další změny, které ale nejsou statisticky významné. Patří mezi ně indukční vliv cNER u pacienta č. 7 (zvýšení exprese CYP3A4 o 72,5 % oproti kontrole) a č. 16 (zvýšení genové exprese dokonce o 97,6 %). U pacienta č. 16 je nesignifikantní i vliv tNER, kde došlo ke zvýšení exprese CYP3A4 2,4x. Zajímavým výsledkem je porovnání vlivu 10 μ M a 30 μ M cNER a tNER u tohoto pacienta. U obou seskviterpenů byla silnější indukce CYP3A4 pozorována při použití nižší koncentrace látky. Třetí seskviterpen FAR způsobil u pacienta č. 11 inhibici genové exprese o 65,3 % v porovnání s kontrolou.

K dispozici je také i souhrnný graf, kde lze vidět účinek studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP3A4 u všech pacientů (Obrázek 27).



Obrázek 26 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CYP3A4. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μ M a 30 μ M (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze tří biologických replikátů spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 27 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP3A4 v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

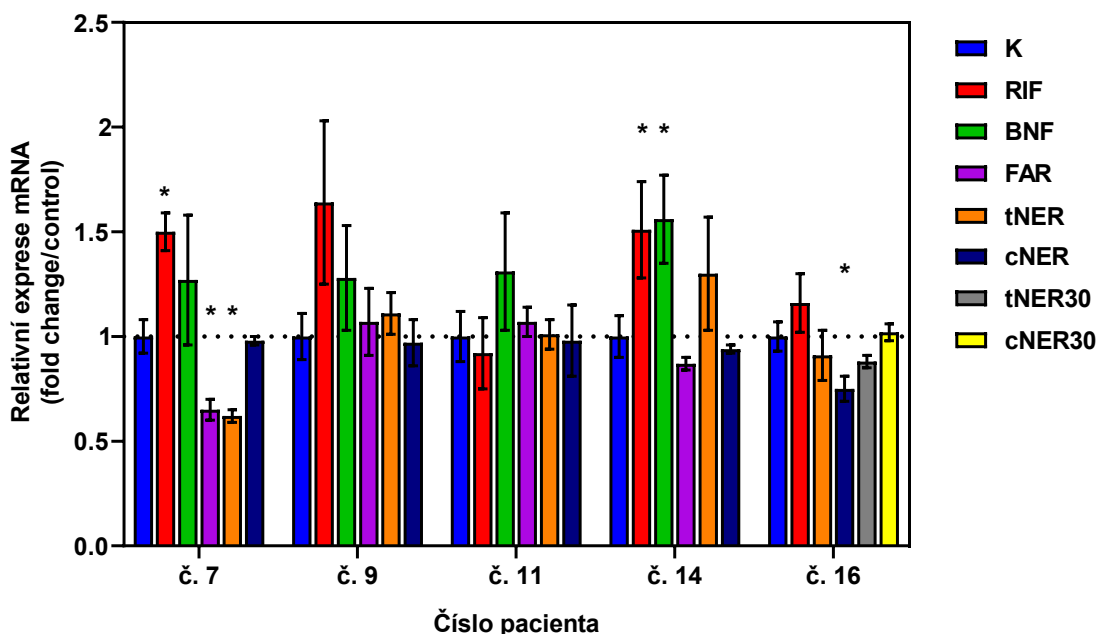
5.2.5 Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu CBR1

Graf vyobrazující výslednou genovou expresi CBR1 u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 28.

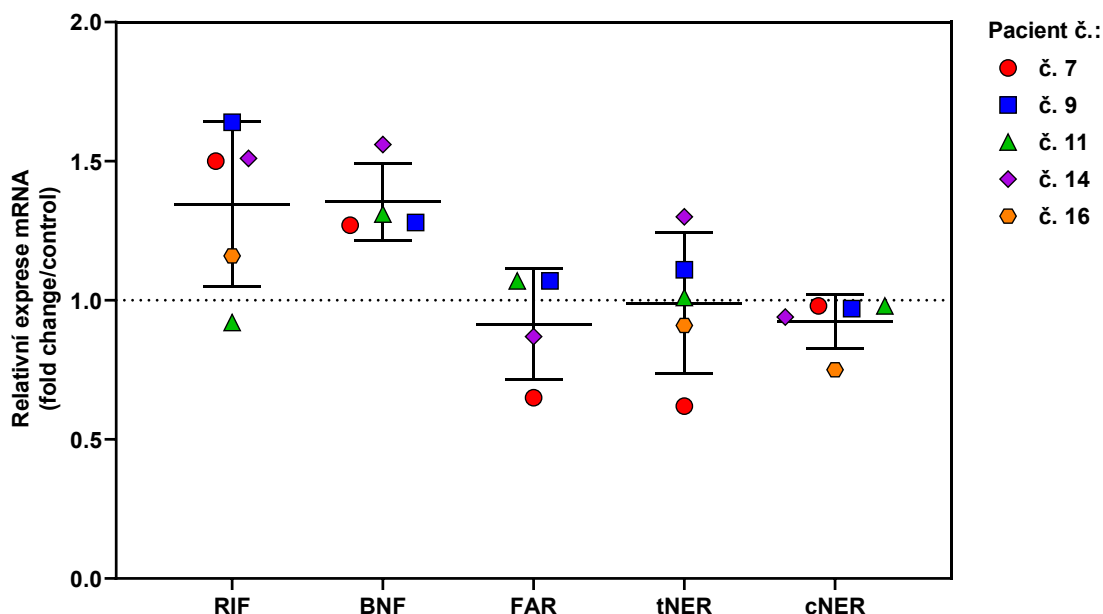
U pacienta č. 7 ovlivňovaly dva seskviterpeny (FAR a tNER) statisticky významně genovou expresi enzymu CBR1. FAR způsobil snížení exprese o 34,9 % a látka tNER pokles o 38,3 % v porovnání s kontrolou. Signifikantní snížení genové exprese CBR1 o 24,5 % oproti kontrole u pacienta č. 16 způsobila látka cNER.

Účinek RIF vedl ke zvýšení exprese u dvou pacientů (pacienta č. 7 a č. 14). U druhého jmenovaného způsobil indukci genové exprese CBR1 o více než polovinu (konkrétně o 51,2 % oproti kontrole) a u pacienta č. 7 zvýšil expresi o 50,3 %. Také v případě pacienta č. 9 jsem zaznamenala určitý nárůst exprese (o 64,0 %), který ale nebyl statistický významný. Vzorek patřící pacientovi č. 14, který byl ovlivněn BNF, vykazoval také signifikantní zvýšení genové exprese v porovnání s kontrolou (o 56,1 %).

Souhrnný graf, kde lze vidět účinek studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CBR1 u všech pacientů, je vyobrazen na Obrázku 29.



Obrázek 28 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CBR1. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μ M a 30 μ M (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze tří biologických replikátů spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 29 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CB1 v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

5.2.6 Vliv cNER, tNER a FAR na genovou expresi enzymu AKR1C

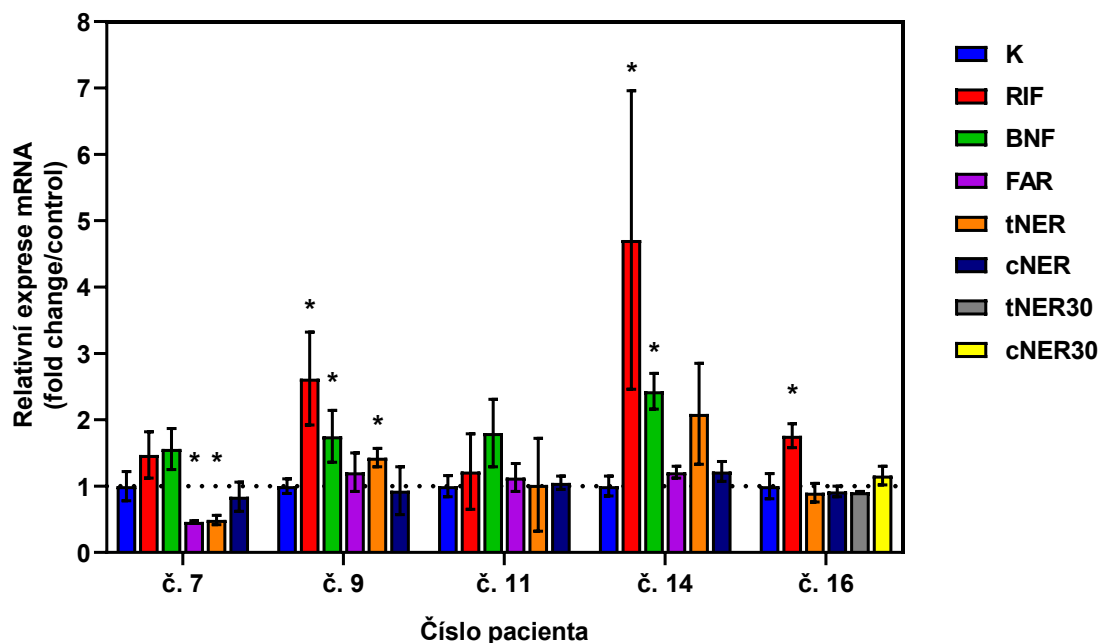
Primer pro qPCR byl navržený tak, aby byl schopen zachytit všechny čtyři isoformy lidské AKR1C (tj. 1C1, 1C2, 1C3 a 1C4). Graf vyobrazující výslednou genovou expresi AKR1C u všech pacientů, jejichž vzorky byly ovlivněny studovanými seskviterpeny, je na Obrázku 30.

Seskviterpenem s největším účinkem byl tNER, který způsobil změnu exprese enzymu AKR1C u tří pacientů. U pacienta č. 7 ovlivnil expresi tak, že způsobil signifikantní snížení o 50,7 % v porovnání s kontrolou, ale u pacienta č. 9 šlo o signifikantní zvýšení genové exprese enzymu AKR1C o 43,23 % oproti kontrole. V případě pacienta č. 14 se exprese daného genu vlivem tNER sice zvýšila (2,1x), ale tato změna není statisticky významná. Kromě inhibičního efektu tNER na genovou expresi se u pacienta č. 7 uplatnil i vliv FAR, a to tím, že ji snížil o 54,0 % v porovnání s kontrolou.

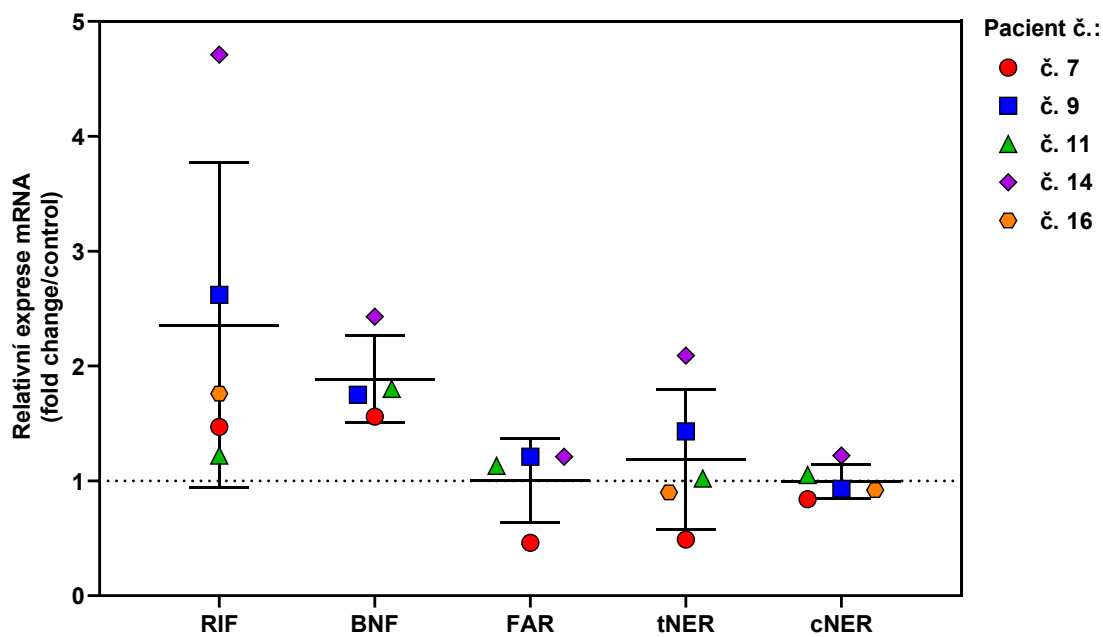
I v tomto případě RIF a BNF ovlivňovaly genovou expresi AKR1C v jednotlivých vzorcích. U pacientů č. 9, č. 14 a č. 16 se jedná o statisticky významný indukční vliv RIF. Nejvíce ovlivňoval expresi AKR1C u pacienta č. 14 (zvýšení 4,7x), dále pacienta č. 9 (zvýšení 2,6x) a následně pacienta č. 16 (zvýšení exprese o 76,0 % v porovnání

s kontrolou). Nárůst exprese vlivem BNF jsem zaznamenala i u pacienta č. 9 (o 75,2 % oproti kontrole) a u pacienta č. 14 (zvýšení 2,4x).

K dispozici je také i souhrnný graf, kde lze vidět účinek studovaných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu AKR1C u všech pacientů (Obrázek 31).



Obrázek 30 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu AKR1C. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami o koncentraci 10 μM a 30 μM (jen cNER30 a tNER30) při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec v grafu reprezentuje průměr ze tří biologických replikátů spolu s vyobrazením směrodatné odchylky (SD). * signifikantně se liší od kontroly (one-way ANOVA s post-hoc Dunnettovým testem, $p < 0,05$).



Obrázek 31 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μM koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu AKR1C1 v lidských jaterních řezech. Vodorovná přerušovaná linie představuje kontrolu.

6. DISKUZE

Přírodní alternativy výživy, ale i léčiv jsou v současnosti nesmírně populární. Častou složkou právě těchto výrobků jsou seskviterpeny. Přírodní látky vykazující částečně protizánětlivé, antiparazitické a antikancerogenní účinky. Nutno ale říci, že ne všechny seskviterpeny působí na zdraví blahodárně. Existují totiž poznatky o vážných toxicitách a vedlejších účincích, kterým by se měla věnovat dostatečná pozornost. Seskviterpeny jsou považovány za pravděpodobné modulátory (inhibitory a/nebo induktory) biotransformačních enzymů, ale tyto poznatky jsou značně limitovány (Bártíková a kol. 2014).

Několik studií ukázalo, že některé seskviterpeny (např. zederon, germakron) působí hepatotoxicky, a to díky vzniku reaktivních metabolitů, zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku a narušením antioxidantní obrany (Zárybnický a kol. 2018). V 10 μ M koncentraci zederon a germakron zároveň mírně inhibují aktivity některých isoform CYP (např. CYP2B6 a CYP3A4) v lidských jaterních mikrosomech. Kromě této skutečnosti ale oba seskviterpeny hodně indukují expresi mRNA CYP2B6 a CYP3A4, ale ne CYP1A2 v lidských primárních hepatocytech (Pimkaew a kol. 2013).

In vitro studie věnující se potenciálnímu inhibičnímu účinku seskviterpenů cNER, tNER a FAR na redukční a konjugační enzymy v lidských a potkaních jaterních subcelulárních frakcích neprokázala významný inhibiční vliv na aktivity AKR1A1, AKR1C, CBR1, UDP-glukuronosyltransferasy či glutathion-S-transferasy, nicméně byl pozorován inhibiční potenciál seskviterpenů vůči aktivitě enzymů z podrodiny CYP1A, CYP2B a CYP3A. Acyklické seskviterpeny tedy mohou ovlivnit biotransformaci současně podávaných léčiv a dalších xenobiotik (Špičáková a kol. 2017).

V nádorových buňkách HepG2/C3A vykazoval cNER, na rozdíl od tNER a ekvimolární směsi obou isomerů, antiproliferativní vlastnosti. Navíc ovlivnil cNER expresi genů kódujících některé isoformy CYP. Došlo ke snížení exprese mRNA CYP2D6 a CYP3A4 a naopak zvýšení exprese mRNA CYP1A2 a CYP2C19. U těchto buněk se rozvíjí stres endoplasmatického retikula, a to zřejmě v důsledku extenzivní oxidace cNER enzymy CYP1A2 a CYP2C19 v membráně endoplasmatického retikula (Biazi a kol. 2017).

In vivo studie na myších pozorovala účinek *per os* podávaných seskviterpenů β -karyofylenu a tNER na dvanáct enzymů metabolizujících xenobiotika v játrech a tenkém střevě. Vliv tNER signifikantně zvýšil aktivitu CYP2B, CYP3A a CYP2C (játra i tenké střevo), AKR1C, CBR1/3 a sulfotrasferasy (játra), zatímco aktivita NADPH-chinonoxidoreduktasy byla po 24-h expozici signifikantně snížena. Tento seskviterpen významně zvýšil expresi mRNA CYP2B (játra i tenké střevo), CYP3A11 a CYP3A25 (játra) a CYP2C29 (tenké střevo) po 24 hodinách od podání (Lněničková a kol. 2017).

Antigenotoxický účinek FAR byl hodnocen v *in vivo* studii provedené na myších, kterým byl *per os* podáván polyaromatický uhlovodík benzo[a]pyren. Podání benzo[a]pyrenu způsobilo zvýšení obsahu celkového CYP v játrech, který byl snížen působením FAR. Benzo[a]pyren rovněž vyvolal snížení obsahu glutathionu a aktivity glutathion-S-transferasy a chinonoxidoreduktasy. Všechny tyto parametry byly působením FAR signifikantně zvýšeny. Samotný FAR žádný ze sledovaných parametrů neovlivňoval (Jahangir a Sultana 2008).

Vzhledem k tomu, že vlivu **acyklických seskviterpenů FAR, tNER a cNER** na proteinovou expresi a expresi mRNA biotransformačních enzymů nebyla dosud věnována příliš velká pozornost, jsem se ve své diplomové práci věnovala modulačnímu účinku těchto látek na vybrané enzymy 1. fáze biotransformace (**CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4, CBR1 a AKR1C3**) v lidských jaterních řezech pocházejících od **pěti pacientů**. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 μ M (u pacienta č. 16 cNER a tNER i v koncentraci 30 μ M) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Studovala jsem vliv těchto látek na proteinovou expresi a expresi mRNA výše zmíněných enzymů. K tomuto účelu jsem použila polyakrylamidovou gelovou elektroforézu za denaturujících podmínek s následným Western blotem (určení proteinové exprese) a RT-qPCR (stanovení relativní exprese mRNA).

Pro účely pozitivní kontroly jsem v experimentech použila známé induktory CYP3A4 resp. CYP1A1/2 antibiotikum rifampicin (RIF) v koncentraci 10 μ M, kterým jsem ovlivnila všech pět patientských vzorků, a látku β -naftoflavon (BNF, 10 μ M), kterou jsem použila u čtyř patientských vzorků.

V mé diplomové práci acyklické seskviterpeny inhibovaly **proteinovou expresi** některých enzymů. Seskviterpenem s největším účinkem byl FAR, který způsobil snížení proteinové exprese CBR1 o 62,3 % v porovnání s kontrolou (pacient č. 14). FAR způsobil

snížení proteinové exprese CYP2C u všech čtyř patientských vzorků, i když tento účinek nebyl statisticky významný. U tohoto pacienta č. 14 rovněž došlo k inhibici exprese CBR1 o 49,6 % vlivem látky tNER. Exprese enzymu AKR1C3 byla významně inhibována cNER v závislosti na použité koncentraci (cNER 10 μ M - snížení o 36,6 % oproti kontrole; cNER 30 μ M - pokles o 48,3 %). Podobně tomu bylo i u seskviterpenu tNER, který v koncentraci 30 μ M signifikantně ovlivňoval expresi AKR1C3 snížením o 36,6 % v porovnání s kontrolou. V 10 μ M koncentraci sice také došlo k inhibici exprese tohoto enzymu o 29,6 %, tato změna ale nebyla statisticky významná.

Druhou experimentální metodou, kterou jsem využila v této diplomové práci, bylo stanovení **relativní exprese mRNA** vybraných enzymů. Vlivem dvou seskviterpenů (FAR a tNER) došlo k signifikantním změnám genové exprese všech studovaných enzymů v některých vzorcích. K nejvýznamnějším změnám došlo u pacienta č. 7, kde FAR a tNER signifikantně snížily expresi mRNA u všech sledovaných enzymů. K největšímu snížení exprese došlo v případě CYP3A4, kde jsem našla 76,3% resp. 60,8% inhibici vlivem FAR resp. tNER. Naproti tomu cNER zvýšil u tohoto pacienta expresi mRNA CYP2B6 o 84,4 %. Kromě uvedených inhibičních účinků došlo vlivem FAR i ke zvýšení genové exprese CYP1A2 (pacient č. 9 – o 58,9 % v porovnání s kontrolou) a CYP2B6 (pacient č. 14 – zvýšení exprese o 66,0 % oproti kontrole), zatímco tNER způsobil nárůst genové exprese CYP1A2 (pacient č. 9 – zvýšení 2,1x) a AKR1C3 (pacient č. 9 – o 43,3 % v porovnání s kontrolou). **Právě indukce CYP1A2 *trans*-nerolidolem u pacienta č. 9 by mohla mít největší biologický význam ze všech pozorovaných účinků.**

Mechanismus, při kterém se realizuje transkripční regulace prostřednictvím nukleárních receptorů, je klíčový pro genovou regulaci enzymů 1. a 2. fáze biotransformace. Pojem nukleární receptor označuje transkripční faktor (protein), který po navázání ligandu v cytoplasmě aktivuje transkripční kaskádu dějů spouštějící expresi cílových genů v jádře. Mezi transkripční faktory patří receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR), pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR) a glukokortikoidní receptor (GR), které regulují řadu genů kódujících enzymy 1. a 2. fáze biotransformace, např. isoformu CYP2B6 či z hlediska metabolismu léčiv nejdůležitější isoformu CYP3A4. PXR reguluje také CYP1A2 (Gerbal-Chaloin a kol. 2001; Skálová a kol. 2013). GR, PXR a/nebo CAR se podílejí na regulaci bazální i xenobiotiky-

indukované exprese genů pro isoformy CYP2C, protože jejich exprese je zvýšena stejnými induktory jako CYP3A4 a CYP2B6 (Gerbal-Chaloin a kol. 2001).

Ve své práci jsem používala jako **pozitivní kontroly induktory CYP1A1/2 β -naftoflavon a CYP3A4 rifampicin** (Meunier a kol. 2000). RIF patří mezi ligandy PXR a výrazně indukuje enzym CYP3A4. Díky své interindividuální variabilitě, vycházející z výrazné indukovatelnosti a citlivosti k inhibičnímu působení složek potravy, vykazuje enzym CYP3A4 výkyvy v aktivitě, které mohou zapříčinit selhání léčby a výskyt vedlejších účinků (Skálová a kol. 2013). Hladina CYP3A4 se zvyšuje např. i po podání barbiturátů, některých steroidů (dexametazon, DEX), extraktu z třezalky tečkované a dalších (Kousalová 2003; Timsit a Negishi 2007).

Nejsilnějšími induktory CYP3A4 jsou látky DEX a RIF, přičemž záleží na koncentraci použitých látek a délce expozice (Meunier a kol. 2000). Li a kol. (1995) popsali indukci metabolismu lidokainu prostřednictvím CYP3A4 v závislosti na koncentraci RIF (v rozmezí 0,1 – 50 μ M) v primárních kulturách lidských hepatocytů.

Bylo zjištěno, že antiepileptikum fenobarbital (PB) a další barbituráty vykazují podobné indukční vlastnosti jako RIF a DEX, a to je aktivace transkripce genů CYP2A, CYP2B, CYP2C a CYP3A. Nejúčinněji indukují RIF a DEX podrodinu CYP3A, méně potom podrodiny CYP2C a CYP2B (Waxman a Azaroff 1992). Tvrzení, že RIF, DEX a PB zvyšují expresi mRNA a proteinů CYP2C je zmíněno v studii popsané Handschinem a Meyerem (2003). Na transkripční regulaci genů kódujících CYP2C8 a CYP2C9 se zřejmě podílí tři nukleární receptory (GR, PXR a/nebo CAR), jak bylo zjištěno v primárních kulturách lidských hepatocytů inkubovaných s RIF, DEX a PB (Gerbal-Chaloin a kol. 2001).

Ve svých výsledcích jsem pozorovala výrazné zvýšení exprese mRNA CYP3A4 vlivem RIF ve všech vzorcích, nejvíce u pacienta č. 7 (16,7x) a nejméně u pacienta č. 16 (3,4x). Lze však pozorovat rozdíly v míře indukce u jednotlivých pacientů. Naproti tomu proteinová exprese tohoto enzymu nebyla RIF ovlivněna. Nejsilnější, pořád ale mírný, indukční účinek měl RIF u pacienta č. 16, kdy zvýšil proteinovou expresi o 45,7 % ve srovnání s kontrolou. Na tomto případě lze pěkně demonstrovat porovnání proteinové a genové exprese. V publikacích se uvádí, že tyto dvě úrovně spolu nemusí korelovat (Maier a kol. 2009). Fakt, že látka zvyšuje expresi mRNA, ještě neznamena, že se to promítne i do množství proteinu či jeho aktivity. Vytvořená mRNA totiž může být degradována ještě před překladem do proteinu (působení mikroRNA), nebo nemusí

k překlada do proteinu docházet ve sledovaném čase. Důvodem je přítomnost prodlevy mezi expresí mRNA a proteinu.

Výsledky mých experimentů v oblasti vlivu RIF na proteinovou expresi enzymu CYP2C nevykazovaly statisticky významnou změnu, na druhé straně účinek RIF na expresi mRNA podrodiny CYP2C byl u všech pěti pacientů značně signifikantní. Největší účinek měl RIF u pacienta č. 7, zde se zvýšila exprese 3,7x oproti kontrole, nejméně tomu bylo u pacienta č. 11, kde došlo ke zvýšení genové exprese CYP2C o 60,7 % (pozorovány rozdíly v míře indukce u jednotlivých pacientů). Porovnáním výsledků genové exprese CYP2C a CYP3A4 u všech pěti pacientů lze vidět, že indukční účinek RIF je značně větší u CYP3A4 (v rozmezí 16,7x – 3,4x) než u CYP2C (v rozmezí 3,7x – o 1,6x v porovnání s kontrolou). Výsledky mých a publikovaných studií se tedy shodují.

Vliv RIF na genovou expresi enzymu CYP2B6 způsobil signifikantní nárůst exprese mRNA u tří pacientů – nejvíce tomu bylo u pacienta č. 7 (9,3x), nejméně u pacienta č. 14 (2,2x), u dalších dvou pacientů došlo jen k nepatrnému zvýšení exprese.

Signifikantní změnu genové exprese přinesl i vliv RIF na další enzymy CBR1 (indukce u dvou pacientů) a AKR1C (indukce u tří pacientů). Význam CBR1 tkví v metabolismu endogenních zánětlivých mediátorů (prostaglandinů), xenobiotik a různých konvenčních léčiv (daunorubicin, doxorubicin, haloperidol). Navíc ztráta CBR1 by mohla vést k hromadění reaktivních aldehydů, vzniku oxidačního stresu (ochranná funkce), a tím k podpoření zánětlivých procesů (Selinger a kol. 2019). CBR1 inaktivuje vysoce reaktivní lipidové aldehydy jako např. akrolein, který je schopen modifikovat proteiny a produkovat při tom poškození DNA v buňkách (Yun a kol. 2018). Kromě významné role AKR1C v metabolismu androgenů a estrogenů, se tyto enzymy zapojují i do deaktivace protinádorového léčiva doxorubicinu a potenciálního cytostatika oracinu (Skálová a kol. 2013).

Isoformy CYP1A1/2, u kterých jsem stanovovala vliv studovaných seskviterpenů pouze na genovou expresi, jsou regulovány přes receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR). Jejich typickými ligandy jsou některé dioxiny, methylcholanthren nebo i β -naftoflavon. Klinicky významnou inhibici CYP1A2 způsobuje antidepressivum fluvoxamin a antibiotika erytromycin, klaritromycin a ciprofloxacin. Indukce CYP1A1 a 1A2 je velmi nežádoucí kvůli toxikačnímu účinku těchto enzymů, protože jejich působením dochází k např. k aktivaci prokarcinogenů na karcinogeny (Meunier a kol. 2000; Skálová a kol. 2013).

V případě určování genové exprese enzymu CYP1A2 jsem zaznamenala enormní nárůst exprese vlivem BNF, který byl viditelný (a signifikantní) ve všech jaterních vzorcích, ve kterých byl BNF přítomen (čtyři). Největší indukci exprese způsobil u pacienta č. 9 (zvýšení 35,8x), naopak nejméně ovlivnil expresi u pacienta č. 11 (zvýšení 3,2x). Mohu tedy říci, že model jaterních řezů je funkční, protože vlivem BNF v nich došlo k výrazné indukci CYP1A2. I zde, podobně jako v případě CYP3A4, se míra indukce mezi jednotlivými pacienty lišila.

Zachytila jsem i vliv BNF na expresi dalších enzymů. Expresi mRNA byla mírně v případě CBR1 a AKR1C indukována u všech pacientů (u jednoho resp. dvou signifikantně), zatímco v případě CYP2B6 byla u jednoho pacienta indukována a u jednoho inhibována. BNF významně inhiboval proteinovou expresi CBR1 u jednoho pacienta. Výsledky lze okomentovat tak, že u pacienta č. 14 byla vlivem BNF ovlivněna jak proteinová, tak genová exprese enzymu CBR1 (v prvním případě došlo k inhibici, v druhém k indukci).

Při **hodnocení** výsledků je třeba brát v potaz, že na metabolismus xenobiotik má vliv mnoho faktorů interindividuálních i intraindividuálních. Mezi interindividuální faktory patří živočišný druh, genetické faktory nebo pohlaví. Zároveň tyto faktory definují rozdíly v biotransformaci cizorodých látek u různých jednotlivců, během života jednotlivce však zůstávají neměnné. Intraindividuální faktory, které reprezentuje např. věk, těhotenství, onemocnění či inhibice/indukce enzymů, způsobují změny v biotransformaci xenobiotik již během života jednotlivce (Skálová a kol. 2013).

Kvůli genetickému polymorfismu v genetické výbavě pro určité enzymy dochází k relativní variabilitě v metabolismu xenobiotik u jednotlivců téhož druhu i pohlaví. Tyto rozdíly (jak kvalitativní, tak kvantitativní) může ovlivňovat výživa, patologické stavy či medikace. Rozdílnost v metabolismu léčiv je proto častou příčinou selhání léčby, popř. výskytu nežádoucích reakcí na podání léčiva. Příkladem enzymu vykazujícího polymorfismus je CYP2C9, který se klinicky projevuje např. krvácením po aplikaci warfarinu (Skálová a kol. 2013; Zanger a Schwab 2013).

Právě **interindividuální variabilita mezi jednotlivými pacienty** je nejspíše důvodem rozdílů účinků testovaných seskviterpenů na proteinovou a genovou expresi jednotlivých enzymů 1. fáze biotransformace. Celkově lze dosažené výsledky shrnout tak, že je málo pravděpodobné, že by tyto acyklické seskviterpeny v koncentracích běžně dostupných v potravě významně ovlivňovaly biotransformaci současně podaných léčiv.

7. ZÁVĚR

Výsledky dosažené v experimentální části mé diplomové práce lze shrnout následovně:

- Nejprve jsem z pěti patientských vzorků jaterní tkáně připravila ultratenké řezy o tloušťce 150-180 μm , které jsem po preinkubaci inkubovala v přítomnosti tří vybraných acyklických seskviterpenů (cNER, tNER, FAR) v koncentraci 10 a 30 μM (jen jeden pacient) nebo DMSO (kontrola) při 37 °C v atmosféře s 95 % O_2 a 5 % CO_2 po dobu 24 hodin.
- Pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy za denaturujících podmínek s následným Western blotem jsem sledovala vliv tří vybraných acyklických seskviterpenů (cNER, tNER, FAR) na **proteinovou expresi** dvou isoform cytochromu P450 (CYP2C, CYP3A4), karbonylreduktasy 1 (CBR1) a aldo-ketoreduktasy 1C3 (AKR1C3) v lidských jaterních řezech. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 μM (u pacienta č. 16 cNER a tNER i v koncentraci 30 μM) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Všechny tři seskviterpeny inhibovaly proteinovou expresi některých enzymů. FAR a tNER způsobily významné snížení exprese CBR1 u pacienta č. 14. Také exprese AKR1C3 byla signifikantně snížena vlivem cNER v závislosti na použité koncentraci (10 i 30 μM) u pacienta č. 16, kde i tNER v 30 μM koncentraci inhiboval expresi tohoto enzymu.
- Pomocí RT-qPCR jsem pozorovala vliv tří acyklických seskviterpenů (cNER, tNER, FAR) na **relativní expresi mRNA** čtyř isoform cytochromu P450, a to CYP1A2, CYP2B6, CYP2C a CYP3A4, dále karbonylreduktasy 1 (CBR1) a aldo-ketoreduktasy 1C (AKR1C) v lidských jaterních řezech. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 μM (u pacienta č. 16 cNER a tNER i v koncentraci 30 μM) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Vlivem FAR a tNER došlo k signifikantním změnám genové exprese všech studovaných enzymů v některých vzorcích. K nejvýznamnějším změnám došlo u pacienta č. 7, kde FAR a tNER signifikantně snížily expresi mRNA u všech sledovaných enzymů, naproti tomu cNER signifikantně zvýšil u toho pacienta expresi jen CYP2B6. Kromě těchto inhibičních účinků došlo vlivem FAR i ke zvýšení genové exprese CYP1A2 (pacient č. 9) a CYP2B6 (pacient č. 14), zatímco tNER způsobil nárůst genové exprese CYP1A2 a AKR1C (oba u pacienta č. 9).

8. POUŽITÉ ZKRATKY

A	absorbance
AA	akrylamid
Acetoacyl-CoA	acetoacylkoenzym A
Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
AGS	buňky lidského karcinomu žaludku, „human gastric carcinoma cells“
AKR	aldo-ketoreduktasa
ALT	alaninaminotransferasa
ALP	alkalická fosfatasa
APS	persíran amonný
AST	aspartátaminotransferasa
BCA	kyselina bicinchoninová
bisAA	bis-akrylamid
BNF	β -naftoflavon
BSA	hovězí sérový albumin
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CBR	karbonylreduktasa
cDNA	komplementární deoxyribonukleasa
cNER	<i>cis</i> -nerolidol
CNS	centrální nervová soustava
Ct	threshold cycle
CYP	cytochrom P450
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
DEPC	diethylpyrokarbonát
DEX	dexametazon
DMSO	dimethylsulfoxid
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAsa	deoxyribonukleasa
dNTPs	deoxynukleotidy
DMAPP	dimethylallyl-difosfát

DTT	dithiotreitol
dTTP	deoxythymidintrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová kyselina
F	forward
FAD	flavinadenindinukleotid
FAR	farnesol
FMN	flavinmononukleotid
FN HK	Fakultní nemocnice v Hradci Králové
FPP	farnesyl-difosfát
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GMT	γ -glutamyltransferasa
GR	glukokortikoidní receptor
GSH	glutathion
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HepG2/C3A	buňky lidského hepatocelulárního karcinomu
HRP	křenová peroxidasa
IPP	isopentenyl-difosfát
KAL, K	kalnexin
KBH	Krebsův-Henseleitův pufr
MDS	myelodysplastický syndrom
MM	mastermix
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mikroRNA	mikro ribonukleová kyselina
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NER	nerolidol
NSAID	nesteroidní antiflogistika
NTC	no template control
p.a.	pro analýzu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fenobarbital
PBS	fosfátový pufr, „phosphate Buffered Saline“

PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
PPI	inhibitor protonové pumpy
PXR	pregnanový X receptor
PCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce
PCTS,PLCS	ultratenké tkáňové řezy, „precision cut tissue slices“
qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase
R	reverse
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RNasa	ribonukleasa
rpm	otáčky za minutu
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptasa, reverzní transkripce
RTG	rentgen
RT-qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí
SD	směrodatná odchylka
SDHA	podjednotka A sukcinátdehydrogenasy
SDR	dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem
SDR21C1	karbonyreduktasa 1
SDS	dodecylsírán sodný
TBST	pufrovaný solný roztok „Tris – buffered saline“ + Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
tNER	<i>trans</i> -nerolidol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UV/VIS	ultrafialové/viditelné
UW	University of Wisconsin
v/v	objem/objem

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled terpenů (převzato a změněno ze Singh a Sharma 2015; McMurry 2007)	10
Tabulka 2 Doplnující informace o vybraných pacientech	30
Tabulka 3 Složení KBH pufru	31
Tabulka 4 Příprava média William's E s glutaMAXem	31
Tabulka 5 Zásobní lyzační pufr	33
Tabulka 6 Zásobní vzorkový pufr (4xSDS).....	33
Tabulka 7 Pipetovací schéma pro kalibrační přímku.....	34
Tabulka 8 Celkové pipetovací schéma aplikované na mikrotitrační destičku.....	35
Tabulka 9 Složení separačního gelu	37
Tabulka 10 Složení zaostřovacího gelu	38
Tabulka 11 Složení mastermixu RT+	48
Tabulka 12 Použité primery.....	48
Tabulka 13 Složení obou SYBR Green I mastermixů (MM) pro qPCR	49
Tabulka 14 Pipetovací schéma jamek pro cílový gen (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4, CBR1 nebo AKR1C).....	49
Tabulka 15 Pipetovací schéma jamek pro referenční gen (GAPDH:SDHA).....	49
Tabulka 16 Vypočítané hodnoty denzit jednotlivých proužků pro kalnexin a CYP2C u pacienta č. 9	52
Tabulka 17 Průměr, směrodatná odchylka a výsledná relativní proteinová exprese enzymu CYP2C v jaterním řezu, který byl ovlivněn FAR (pacient č. 9).....	53

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Vzorec isoprenu a naznačení isoprenového pravidla (převzato z McMurry 2007).....	9
Obrázek 2 Dvě možné cesty biosyntézy isopentenyl-difosfátu (IPP) (přezato z McMurry 2007).....	10
Obrázek 3 Mevalonátová dráha (převzato a upraveno z McMurry 2007).....	11
Obrázek 4 Vzorec farnesolu (převzato ze Špičáková a kol. 2017).....	13
Obrázek 5 Vzorec trans- a cis-nerolidolu (převzato ze Špičáková a kol. 2017).....	14
Obrázek 6 Katalytický cyklus cytochromu P450 (převzato z Linhart a kol. 2012).....	17
Obrázek 7 Prostorové uspořádání (α/β) ₈ -soudkového motivu v rodině AKR (převzato z https://www.med.upenn.edu/akr/akr_graphic.html)	22
Obrázek 8 Příprava ultratenkých jaterních řezů (převzato a upraveno z Palma a kol. 2018)	25
Obrázek 9 Naznačení pozic pro rozstříhání membrán na proužky.....	42
Obrázek 10 Ukázka blotů pro kalnexin u pacienta č. 9	52
Obrázek 11 Ukázka blotů pro CYP2C u pacienta č. 9.....	52
Obrázek 12 Vliv vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP2C	54
Obrázek 13 Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP2C v lidských jaterních řezech .	55
Obrázek 14 Vliv vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP3A4.....	56
Obrázek 15 Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CYP3A4 v lidských jaterních řezech.	56
Obrázek 16 Vliv vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CBR1.....	58
Obrázek 17 Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu CBR1 v lidských jaterních řezech....	58
Obrázek 18 Vliv vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi biotransformačního enzymu AKR1C3.....	59

Obrázek 19 Souhrnný graf účinku vybraných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na proteinovou expresi biotransformačního enzymu AKR1C3 v lidských jaterních řezech	60
Obrázek 20 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CYP1A2.....	63
Obrázek 21 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP1A2 v lidských jaterních řezech	63
Obrázek 22 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CYP2B6	65
Obrázek 23 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP2B6 v lidských jaterních řezech	65
Obrázek 24 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CYP2C	67
Obrázek 25 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP2C v lidských jaterních řezech	67
Obrázek 26 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CYP3A4.....	69
Obrázek 27 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CYP3A4 v lidských jaterních řezech	69
Obrázek 28 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu CBR1.....	70
Obrázek 29 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu CBR1 v lidských jaterních řezech	71
Obrázek 30 Vliv vybraných seskviterpenů na genovou expresi biotransformačního enzymu AKR1C.....	72
Obrázek 31 Souhrnný graf účinku studovaných seskviterpenů v 10 μ M koncentraci na relativní expresi mRNA biotransformačního enzymu AKR1C v lidských jaterních řezech	73

11. POUŽITÁ LITERATURA

ABOULAILA, Mahmoud, Thillaiampalam SIVAKUMAR, Naoaki YOKOYAMA a Ikuo IGARASHI. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of Babesia parasites. *Parasitology International*. 2010, 59(2), 278-282. DOI: 10.1016/j.parint.2010.02.006. ISSN 13835769.

AL-TUBULY, Abdulhamid A. SDS-PAGE and Western Blotting. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*. New Jersey: Humana Press, 2000, 391-405. DOI: 10.1385/1-59259-076-4:391. ISBN 1-59259-076-4.

AMBROŽ, Martin, Iva BOUŠOVÁ, Adam SKARKA, Veronika HANUŠOVÁ, Věra KRÁLOVÁ, Petra MATOUŠKOVÁ, Barbora SZOTÁKOVÁ a Lenka SKÁLOVÁ. The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. *Molecules*. 2015, 20(8), 15343-15358. DOI: 10.3390/molecules200815343. ISSN 1420-3049.

AMBROŽ, Martin, Veronika HANUŠOVÁ, Adam SKARKA, Iva BOUŠOVÁ, Věra KRÁLOVÁ, Lenka LANGHASOVÁ a Lenka SKÁLOVÁ. Essential Oil from *Myrica rubra* Leaves Potentiated Antiproliferative and Prooxidative Effect of Doxorubicin and its Accumulation in Intestinal Cancer Cells. *Planta Medica*. 2016, 82(01/02), 89-96. DOI: 10.1055/s-0035-1558083. ISSN 0032-0943.

AMBROŽ, Martin, Petra MATOUŠKOVÁ, Adam SKARKA, Martina ZAJDLOVÁ, Kateřina ŽÁKOVÁ a Lenka SKÁLOVÁ. The Effects of Selected Sesquiterpenes from *Myrica rubra* Essential Oil on the Efficacy of Doxorubicin in Sensitive and Resistant Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2017, 22(6). DOI: 10.3390/molecules22061021. ISSN 1420-3049.

BACKMAN, Janne T., Carl KYRKLUND, Mikko NEUVONEN a Pertti J. NEUVONEN. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002, 72(6), 685-691. DOI: 10.1067/mcp.2002.128469. ISSN 00099236.

BÁRTÍKOVÁ, Hana, Veronika HANUŠOVÁ, Lenka SKÁLOVÁ, Martin AMBROŽ a Iva BOUŠOVÁ. Antioxidant, Pro-Oxidant and Other Biological Activities of Sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014, 14(22), 2478-2494. DOI: 10.2174/1568026614666141203120833. ISSN 15680266

BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetiky pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.

BIAZI, Bruna Isabela, Thalita Alves ZANETTI, Adrivanio BARANOSKI, Amanda Cristina CORVELONI a Mário Sérgio MANTOVANI. *Cis-Nerolidol Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Extensive CYP2C19 and CYP1A2 Oxidation*. 2017, 121(4), 334-341. DOI: 10.1111/bcpt.12772. ISSN 17427835.

BREMER, Sebastian C. B., Lars REINHARDT, Michael SOBOTTA, Marie C. HASSELLUHN, Thomas LORF, Volker ELLENRIEDER a Harald SCHWÖRER. Pantoprazole Does not Affect Serum Trough Levels of Tacrolimus and Everolimus in Liver Transplant Recipients. *Frontiers in Medicine*. 2018, 5. DOI: 10.3389/fmed.2018.00320. ISSN 2296-858X.

CIOMBOR, Kristen K. a Laura W. GOFF. Current Therapy and Future Directions in Biliary Tract Malignancies. *Current Treatment Options in Oncology*. 2013, 14(3), 337-349. DOI: 10.1007/s11864-013-0237-5. ISSN 1527-2729.

DELOZIER, T. C., G. E. KISSLING, S. J. COULTER, et al. Detection of Human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007, 35(4), 682-688. DOI: 10.1124/dmd.106.012823. ISSN 0090-9556.

GARCÍA-DESCALZO, Laura, Eva GARCÍA-LÓPEZ, Alberto ALCÁZAR, Fernando BAQUERO a Cristina CID. Gel Electrophoresis of Proteins. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech, 2012, 2012-04-04, 58-68. DOI: 10.5772/37514. ISBN 978-953-51-0458-2.

GERBAL-CHALOIN, Sabine, Jean-Marc PASCUSI, Lydiane PICHARD-GARCIA, Martine DAUJAT, Felix WAECHTER, Jean-Michel FABRE, Nicolas CARRERE a Patrick MAUREL. Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metabolism and Disposition*. 2001, 29(3), 242-251.

DE GRAAF, Inge A M, Peter OLINGA, Marina H DE JAGER, Marjolijn T MEREMA, Ruben DE KANTER, Esther G VAN DE KERKHOF a Geny M M GROOTHUIS. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature Protocols*. 2010, 5(9), 1540-1551. DOI: 10.1038/nprot.2010.111. ISSN 1754-2189.

HADDAD, Fadia a Kenneth M. BALDWIN. Reverse Transcription of the Ribonucleic Acid: The First Step in RT-PCR Assay. *RT-PCR Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, 2010-2-10, , 261-270. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-60761-629-0_17. ISBN 978-1-60761-628-3.

HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2. rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT v Praze, 2012. ISBN 9788070806395.

HANDSCHIN, Christoph a Urs A. MEYER. Induction of Drug Metabolism: The Role of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2003, 55(4), 649-673. DOI: 10.1124/pr.55.4.2. ISSN 0031-6997.

HANUŠOVÁ, Veronika, Kateřina CALTOVÁ, Hana SVOBODOVÁ, et al. *The effects of β -caryophyllene oxide and trans -nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice*. 2017, 95, 828-836. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.008. ISSN 07533322.

HE, W.Z., G.F. GUO, C.X. YIN, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase level is a novel adverse prognostic indicator in human metastatic colorectal cancer. *Colorectal Disease*. 2013, 15(8), e443-e452. DOI: 10.1111/codi.12258. ISSN 14628910.

HUANG, Min, Jin-Jian LU, Ming-Qing HUANG, Jiao-Lin BAO, Xiu-Ping CHEN a Yi-Tao WANG. Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2012, 21(12), 1801-1818. DOI: 10.1517/13543784.2012.727395. ISSN 1354-3784.

CHAN, Weng-Keong, Loh TAN, Kok-Gan CHAN, Learn-Han LEE a Bey-Hing GOH. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. *Molecules*. 2016, 21(5).

CHANG, Theodore S., Hsueh-Kung LIN, Kyle A. ROGERS, Lacy S. BRAME, Matthew M. YEH, Qing YANG a Kar-Ming FUNG. Expression of aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) in neuroendocrine tumors & adenocarcinomas of pancreas, gastrointestinal tract, and lung. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2013, 6(11), 2419-2429.

CHENG, A.-X.; Lou, Y.-G.; Mao, Y.-B.; Lu, S.; Wang, L.-J.; Chen, X.-Y. Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *J. Integr. Plant Biol.*, 2007, 49(2), 179-186.

CHOMCZYNSKI, Piotr a Nicoletta SACCHI. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*. 2006, 1(2), 581-585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83. ISSN 1754-2189.

JAHANGIR, Tamanna a Sarwat SULTANA. Benzo(a)pyrene-induced genotoxicity: Attenuation by farnesol in a mouse model. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2008, 23(6), 888-894. DOI: 10.1080/14756360701448768. ISSN 1475-6366.

JAVED, Hayate, Sheikh AZIMULLAH, Salema B. ABUL KHAIR, Shreesh OJHA a M. Emdadul HAQUE. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. *BMC Neuroscience*. 2016, 17(1). DOI: 10.1186/s12868-016-0293-4. ISSN 1471-2202.

JIN, Yi a Trevor M. PENNING. Aldo-Keto Reductases and Bioactivation/Detoxication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007, 47(1), 263-292. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105337. ISSN 0362-1642.

JUNG, Young, Sun HWANG, Gautam SETHI, Lu FAN, Frank ARFUSO a Kwang AHN. Potential Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Properties of Farnesol. *Molecules*. 2018, 23(11). DOI: 10.3390/molecules23112827. ISSN 1420-3049.

KEIRA, Toru, Yoshiharu AIZAWA, Hitomi KARUBE, Masato NIITUYA, Satoshi SHINOHARA, Akihumi KUWASHIMA, Hisashi HARADA a Tsutomu TAKATA. Adverse Effects of Colophony. *INDUSTRIAL HEALTH*. 1997, 35(1), 1-7. DOI: 10.2486/indhealth.35.1. ISSN 0019-8366.

KLEIN, Kathrin a Ulrich M. **ZANGER**. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the “Missing Heritability” Problem. *Frontiers in Genetics*. 2013, 4. DOI: 10.3389/fgene.2013.00012. ISSN 1664-8021.

KODÍČEK, Milan, Olga **VALENTOVÁ** a Radovan **HYNEK**. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018, s. 153. ISBN 978-80-7592-013-3.

KOMOROSKI, B. J., Shimin **ZHANG**, Hongbo **CAI**, et al. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004, 32(5), 512-518. DOI: 10.1124/dmd.32.5.512. ISSN 0090-9556.

KOUSALOVÁ, Lucie, Jana **BARANOVÁ** a Pavel **ANZENBACHER**. Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 - Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003, 17(3), 151-157.

LAPCZYNSKI, Aurelia A., Sneha P. **BHATIA**, Charlene S. **LETIZIA** a Anne Marie **API**. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46(11), S247-S250. DOI: 10.1016/j.fct.2008.06.063. ISSN 02786915.

LEE, Tae Kyoung, Dahae **LEE**, Seoung Rak **LEE**, Yoon-Joo **KO**, Ki **SUNG KANG**, Sang Jeon **CHUNG** a Ki Hyun **KIM**. Sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria* rhizomes and their cytotoxicity against human gastric cancer AGS cells. *Bioorganic Chemistry*. 2019, 87, 117-122. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.03.015. ISSN 00452068.

LI, Albert P., Asenath **RASMUSSEN**, Lilly **XU** a Donald **KAMINSKI**. Rifampicin Induction of Lidocaine Metabolism in Cultured Human Hepatocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1995, 274(2), 673-677.

LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Praha: Vydavatelství VŠCHT v Praze, 2012. ISBN 9788070808061.

LIU, Jiayu, Ping **HE**, Limin **LIN**, Yining **ZHAO**, Wentong **DENG**, Hejiazi **DING**, Qing **LI** a Zhong **WANG**. Characterization of a highly specific monoclonal antibody against human aldo-keto reductase AKR1C3. *Steroids*. 2019, 143, 73-79. DOI: 10.1016/j.steroids.2019.01.001. ISSN 0039128X.

LNĚNIČKOVÁ, Kateřina, Hana **SVOBODOVÁ**, Lenka **SKÁLOVÁ**, Martin **AMBROŽ**, Filip **NOVÁK** a Petra **MATOUŠKOVÁ**. The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on xenobiotic-metabolizing enzymes in mice in vivo. *Xenobiotica*. 2017, 48(11), 1089-1097. DOI: 10.1080/00498254.2017.1398359. ISSN 0049-8254.

MAHMOOD, Tahrin a Ping-Chang **YANG**. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012, 4(9). DOI: 10.4103/1947-2714.100998. ISSN 1947-2714.

MAIER, Tobias, Marc **GÜELL** a Luis **SERRANO**. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*. 2009, 583(24), 3966-3973. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.10.036. ISSN 00145793.

MARSCH, Glenn A., Benjamin T. **CARLSON** a F. Peter **GUENGERICH**. 7,8-benzoflavone binding to human cytochrome P450 3A4 reveals complex fluorescence quenching, suggesting binding at multiple protein sites. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2017, 36(4), 841-860. DOI: 10.1080/07391102.2017.1301270. ISSN 0739-1102.

MCMURRY, John. *Organická chemie*. Brno: VUTIUM, 2007, s. 1035-1045. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.

MEUNIER, Viviane, Martin **BOURRIE**, B. **JULIAN**, E. **MARTI**, F. **GUILLOU**, Yves **BERGER** a Gérard **FABRE**. Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica*. 2000, 30(6), 589-607. DOI: 10.1080/004982500406426. ISSN 0049-8254.

NELSON, David, Darryl **ZELDIN**, Susan **HOFFMAN**, Lois **MALTAIS**, Hester **WAIN** a Daniel **NEBERT**. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 2004, 14(1), 1-18. ISSN 0960-314X.

NGUYEN, Linh Thuy, Zuzana MYSLIVEČKOVÁ, Barbora SZOTÁKOVÁ, et al. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver in vitro. *Chemico-Biological Interactions*. 2017, 278, 123-128. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.10.021. ISSN 00092797.

NOLAN, Tania, Rebecca E. HANDS a Stephen A. BUSTIN. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. 2006, 1(3), 1559-1582. DOI: 10.1038/nprot.2006.236. ISSN 1754-2189.

OLINGA, Peter a Detlef SCHUPPAN. Precision-cut liver slices: A tool to model the liver ex vivo. *Journal of Hepatology*. 2013, 58(6), 1252-1253. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.01.009. ISSN 01688278.

PALMA, Elena, Ewald Jan DOORNEBAL a Shilpa CHOKSHI. Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepatology International*. 2018, 13(1), 51-57. DOI: 10.1007/s12072-018-9913-7. ISSN 1936-0533.

PENNING, Trevor M. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*. 2015, 234, 236-246. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.09.024. ISSN 00092797.

PERLÍK, František a Ondřej SLANAŘ. Farmakogenetika metabolismu léčiv – z výzkumu do klinické praxe. *Remedia*. 2015, 25(3), 226-230.

PIMKAEW, Prapapan, Jenni KÜBLBECK, Aleksanteri PETSALO, et al. Interactions of sesquiterpenes zederone and germacrone with the human cytochrome P450 system. *Toxicology in Vitro*. 2013, 27(6), 2005-2012. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.07.004. ISSN 08872333.

REUBEN, Adrian. Hy's law. *Hepatology*. 2004, 39(2), 574-578. DOI: 10.1002/hep.20081. ISSN 0270-9139.

SAITO, Mitsuo, Mutsuko HIRATA-KOIZUMI, Mariko MATSUMOTO, Tsutomu URANO a Ryuichi HASEGAWA. Undesirable Effects of Citrus Juice on the Pharmacokinetics of Drugs. *Drug Safety*. 2005, 28(8), 677-694. DOI: 10.2165/00002018-200528080-00003. ISSN 0114-5916.

SAITO, Alexandre Y., Adriana A. MARIN RODRIGUEZ, Danielle S. MENCHACA VEGA, Rodrigo A.C. SUSSMANN, Emília A. KIMURA a Alejandro M. KATZIN. Antimalarial activity of the terpene nerolidol. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016, 48(6), 641-646. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.017. ISSN 09248579.

SELIGER, Jan Moritz, Hans-Jörg MARTIN, Edmund MASER a Jan HINTZPETER. Potent inhibition of human carbonyl reductase 1 (CBR1) by the prenylated chalconoid xanthohumol and its related prenylflavonoids isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. *Chemico-Biological Interactions*. 2019. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.02.031. ISSN 00092797.

SETTIVARI, Raja S., J.C. ROWLANDS, D.M. WILSON, S.M. ARNOLD a P.J. SPENCER. Application of Evolving Computational and Biological Platforms for Chemical Safety Assessment. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. Elsevier, 2017, 843-873. DOI: 10.1016/B978-0-12-803620-4.00032-3. ISBN 9780128036204.

SCHILLER, Carol a David SCHILLER. *The Aromatherapy Encyclopedia: A Concise Guide to Over 385 Plant Oils*. Laguna Beach: Basic Health Publications, 2008. ISBN 978-1-59120-228-8.

SCHMITTGEN, Thomas D. a Kenneth J. LIVAK. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 2008, 3(6), 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73. ISSN 1754-2189.

SILVA, Marcos, George OLIVEIRA, Rusbene DE CARVALHO, Damião DE SOUSA, Rivelilson FREITAS, Pedro PINTO a Josué MORAES. Antischistosomal Activity of the Terpene Nerolidol. *Molecules*. 2014, 19(3), 3793-3803. DOI: 10.3390/molecules19033793. ISSN 1420-3049.

SINGH, Anita, Om a Tej K BHAT. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. *Journal of Clinical Toxicology*. 2011, 04(01). DOI: 10.4172/2161-0495.S4-001. ISSN 21610495.

SINGH, Bharat a Ram A. SHARMA. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*. 2015, 5(2), 129-151. DOI: 10.1007/s13205-014-0220-2. ISSN 2190-572X.

SKÁLOVÁ, Lenka, Iva **BOUŠOVÁ** a kol. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 9788024619170.

STEPHENSON, Frank H. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*. 2. vyd. Academic Press, 2010. ISBN 978-0-12-375690-9.

ŠPIČÁKOVÁ, Alena, Barbora **SZOTÁKOVÁ**, Diana **DIMUNOVÁ**, et al. Nerolidol and Farnesol Inhibit Some Cytochrome P450 Activities but Did Not Affect Other Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rat and Human Hepatic Subcellular Fractions. *Molecules*. 2017, 22(4). DOI: 10.3390/molecules22040509. ISSN 1420-3049.

ŠPILKOVÁ, Hana, Eva **NOVOSADOVÁ** a Kateřina **ZIGMUNDOVÁ**. Terpeny. In: *ELUC: elektronická učebnice* [online]. Olomouc: Střední škola zdravotnická, 2015 [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2493>

TAN, Siun Chee a Beow Chin **YIAP**. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, 2009, 1-10. DOI: 10.1155/2009/574398. ISSN 1110-7243.

TAYLOR, Sean C. a Anton **POSCH**. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*. 2014, 2014, 1-8. DOI: 10.1155/2014/361590. ISSN 2314-6133.

TIMSIT, Yoav E. a Masahiko **NEGISHI**. CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors. *Steroids*. 2007, 72(3), 231-246. DOI: 10.1016/j.steroids.2006.12.006. ISSN 0039128X.

TOWBIN, Harry, Theophil **STAEHELIN** a Julian **GORDON**. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 1979, 76(9), 4350-4.

TRNČÁKOVÁ, Veronika. *Modulační účinek humulenu, karyofylenu a karyofylenoxidu na vybrané biotransformační enzymy v lidských jaterních buňkách*. Hradec Králové, 2018, 84 s. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Katedra biochemických věd.

WANG, Hongbing a Leslie TOMPKINS. CYP2B6: New Insights into a Historically Overlooked Cytochrome P450 Isozyme. *Current Drug Metabolism*. 2008, 9(7), 598-610. DOI: 10.2174/138920008785821710. ISSN 13892002.

WAXMAN, David J. a Lenore AZAROFF. Phenobarbital induction of cytochrome P - 450 gene expression. *Biochemical Journal*. 1992, 281(3), 577-592. DOI: 10.1042/bj2810577. ISSN 0264-6021.

DE WILDT, Saskia N., Gregory L. KEARNS, J Steven LEEDER a John N. VAN DEN ANKER. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clinical Pharmacokinetics*. 1999, 37(6), 485-505. DOI: 10.2165/00003088-199937060-00004. ISSN 0312-5963.

WILLIAMS, Cheryll J. *Medicinal Plants in Australia Volume 2: Gums, Resins, Tannin and Essential Oils*. Sydney: Rosenberg Publishing, 2011. ISBN 978-1877058943.

YUN, Miyong, Ae Jin CHOI, Young Chan LEE, Munkyoo KONG, Ji-Youn SUNG, Sung Soo KIM a Young-Gyu EUN. *Carbonyl reductase 1 is a new target to improve the effect of radiotherapy on head and neck squamous cell carcinoma*. 2018, 37(1). DOI: 10.1186/s13046-018-0942-9. ISSN 1756-9966.

ZANGER, Ulrich M. a Matthias SCHWAB. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013, 138(1), 103-141. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007. ISSN 01637258.

ZÁRYBNICKÝ, Tomáš, Iva BOUŠOVÁ, Martin AMBROŽ a Lenka SKÁLOVÁ. Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Archives of Toxicology*. 2018, 92(1), 1-13. DOI: 10.1007/s00204-017-2062-2. ISSN 0340-5761.

ZIMMERMANN, Martina, Sorin ARMEANU, Irina SMIRNOW, et al. Human precision-cut liver tumor slices as a tumor patient-individual predictive test system for oncolytic measles vaccine viruses. *International Journal of Oncology*. 2009, 34(5), 1247-1256. DOI: 10.3892/ijo_00000253. ISSN 10196439.