

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**ÚČINEK THUJONU A PIPERITONU NA EXPRESI
BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ V JATERNÍCH ŘEZECH**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Lenka Štětková

Prohlášení:

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

V Hradci Králové

.....

Lenka Štětková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady a připomínky při řešení této diplomové práce. Moje poděkování patří také hlavně PharmDr. Martinovi Ambrožovi, Ph.D. za velikou pomoc při realizaci experimentální části a za vstřícný a laskavý přístup. Také děkuji všem pracovníkům Katedry biochemických věd za příjemné pracovní prostředí.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Lenka Štětková

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: Účinek thujonu a piperitonu na expresi biotransformačních enzymů v jaterních řezech

Monoterpeny jsou přírodní látky, které jsou široce rozšířené v silicích celé řady druhů rostlin. Thujon a piperiton jsou obsaženy v některých druzích rostlin a mohou být součástí potravinových doplňků a jiných rostlinných přípravků nebo potravin, kde slouží jako dochucovadla.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak thujon a piperiton ovlivňují expresi vybraných biotransformačních enzymů z nadrodiny cytochromů P450, sulfotransferas a UDP-glukuronosyltransferas. Pro měření byly použity ultratenké jaterní řezy získané z jater 3 lidských dárců. Řezy byly inkubovány s thujonem nebo piperitonem v koncentracích 10 μM a 50 μM po dobu 24 hodin. Po inkubaci bylo kvantifikováno množství mRNA a proteinů vybraných enzymů.

Získané výsledky vykazovaly značnou interindividuální variabilitu. Exprese CYP1A2 na úrovni mRNA byla signifikantně zvýšena po ovlivnění řezů thujonem (50 μM) a piperitonem (10 μM i 50 μM), avšak pouze u jednoho dárce. Účinkem piperitonu (50 μM) byla zvýšena mRNA pro UGT1A9 rovněž pouze u jednoho dárce. Zvýšení množství mRNA pro CYP3A4 vlivem piperitonu (50 μM) i thujonu (50 μM) bylo také zaznamenáno jen u jednoho pacienta. Ke statisticky významnému snížení v množství proteinu CYP3A4 vlivem thujonu také došlo pouze u jednoho pacienta ze tří.

Vzhledem k tomu, že změny v expresích vybraných enzymů vlivem thujonu a piperitonu byly většinou malé nebo žádné, je vznik klinicky významných interakcí na podkladě indukce či inhibice biotransformačních enzymů nepravděpodobný.

ABSTRACT

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

Candidate: Lenka Štětková

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of thujone and piperitone on the expression of biotransformation enzymes in liver slices

Monoterpenes are natural substances that are widely distributed in the essential oils of many plant species. Thujone and piperitone are found in certain plant species that can be part of dietary supplements, herbal preparations or used in foods as flavourings.

The aim of this diploma thesis was to find out how thujone and piperitone affect the expression of selected biotransformation enzymes from the cytochrome P450 superfamily, the sulfotransferase and the UDP-glucuronosyltransferase superfamilies. Precision-cut liver slices obtained from the livers of 3 human donors were used for these experiments. Slices were incubated with thujone or piperitone for 24 hours at 10 μM and 50 μM concentrations. After incubation, the amount of mRNA and protein was quantified.

The obtained results showed considerable interindividual variability. CYP1A2 gene expression was significantly increased in one donor sample after incubation with thujone (50 μM) and piperitone (10 μM , 50 μM). Piperitone (50 μM) increased the amount of mRNA of UGT1A9 in one patient sample. Increased amount of CYP3A4 mRNA was observed after treatment with piperitone (50 μM) and thujone (50 μM) also only in one patient sample.

Statistically significant decrease in CYP3A4 protein level caused by thujone was observed in 1 patient out of 3.

Due to the fact that the changes in expression of selected enzymes were mostly small or non-existent, the occurrence of clinically significant interactions due to induction or inhibition of biotransformation enzymes is unlikely.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1. Terpeny.....	10
2.1.1. Monoterpeny.....	11
2.1.1.1. Piperiton.....	12
2.1.1.2. Thujon.....	13
2.2. Biotransformace xenobiotik.....	15
2.2.1. Enzymy 1.fáze biotransformace.....	16
2.2.1.1. Cytochromy P450.....	16
2.2.1.1.1. CYP3A4.....	17
2.2.1.1.2. CYP1A2.....	18
2.2.2. Enzymy 2.fáze biotransformace.....	19
2.2.2.1. UDP-glukuronosyltransferasy.....	20
2.2.2.1.1. UGT1A6.....	20
2.2.2.1.2. UGT1A9.....	21
2.2.2.2. Sulfottransferasy.....	21
2.2.2.2.1. SULT1A.....	22
2.2.3. Regulace biotransformačních enzymů.....	23
2.2.3.1. Indukce.....	23
2.2.3.2. Inhibice.....	24
2.3. In vitro jaterní modely pro studium exprese biotransformačních enzymů.....	25
2.3.1. Jaterní řezy.....	25
2.3.2. Suspenze primárních hepatocytů.....	28
2.3.3. Kultury hepatocytů.....	28
2.3.3.1. 2D modely.....	28
2.3.3.1.1. Monovrstva.....	28

2.3.3.1.2. Sandwichové kultury	30
2.3.3.2. 3D modely	30
2.3.3.2.1. Sféroidy.....	30
2.3.3.2.2. Scaffold-based techniky	32
2.3.3.3. Kokultivace	32
2.3.4. Linie imortalizovaných hepatocytů	32
3. CÍL PRÁCE.....	35
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1. Materiál.....	36
4.1.1. Biologický materiál	36
4.1.2. Chemikálie	36
4.1.3. Přístroje	38
4.2. Jaterní řezy	38
4.2.1. Příprava zásobního Krebs-Henseleitova pufru.....	38
4.2.2. Příprava pracovního Krebs-Henseleitova pufru.....	39
4.2.3. Příprava kultivačního média.....	39
4.2.4. Příprava roztoků thujonu a piperitonu.....	39
4.2.5. Příprava řezů ze vzorků lidských jater	40
4.3. Kvantitativní PCR v reálném čase	40
4.3.1. Izolace RNA TRIzolom.....	40
4.3.2. Měření čistoty a koncentrace RNA.....	41
4.3.3. Ošetření vzorků DNAsou.....	41
4.3.4. Reverzní transkripce	42
4.3.5. Kvantitativní RT-PCR v reálném čase	43
4.4. Kvantifikace vybraných proteinů	45
4.4.1. Příprava vzorků	45
4.4.2. Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu	48

4.4.2.1.	Příprava roztoků	48
4.4.2.2.	Příprava gelů	49
4.4.2.3.	Průběh elektroforézy	50
4.4.2.4.	Western blot a chemiluminiscenční detekce proteinů	50
4.4.2.4.2.	Western blot	51
4.4.2.4.3.	Detekce proteinů.....	52
4.5.	Zpracování dat	53
5.	VÝSLEDKY	54
5.1.	Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA vybraných biotransformačních enzymů.....	54
5.1.1.	Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA pro UGT1A6.....	54
5.1.2.	Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA pro UGT1A9.....	55
5.1.3.	Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA pro SULT1A	56
5.1.4.	Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA pro CYP1A2	57
5.1.5.	Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA pro CYP3A4	58
5.2.	Vliv thujonu a piperitonu na množství proteinu vybraných biotransformačních enzymů.....	59
5.2.1.	Vliv thujonu na množství proteinu CYP1A2	60
5.2.2.	Vliv piperitonu na množství proteinu CYP1A2.....	61
5.2.3.	Vliv thujonu na množství proteinu CYP3A4	62
5.2.4.	Vliv piperitonu na množství proteinu CYP3A4.....	62
6.	DISKUZE	64
7.	ZÁVĚR.....	67
8.	SEZNAM ZKRATEK	68
9.	LITERATURA	70

1. ÚVOD

Monoterpeny jsou sekundární metabolity rostlin, ve kterých se vyskytují zejména jako složky silic. Thujon je obsažen v silicích rodů *Salvia*, *Artemisia*, *Tanacetum*, *Thuja*, *Achillea* a další (Németh a Nguyen, 2020). Rostliny obsahující thujon se někdy přidávají do potravin jako aromata a dochucovadla a thujon je také známou přísadou absintu. Obsah thujonu je zde však evropskými předpisy regulován. Piperiton, obsažený například v rodu *Mentha*, *Achillea*, *Eucalyptus*, *Rosmarinus* nebo *Cymbopogon*, se rovněž používá jako dochucovadlo (Burbott a kol. 1983, Yener a kol. 2020). Rostliny obsahující tyto monoterpeny mohou být také součástí nejrůznějších potravinových doplňků. Rostlinné doplňky stravy a další přípravky jsou nyní velmi populární a bývají někdy mylně vnímány jako zcela bezpečné. Problémem je často neznalost přesného obsahu konkrétních rostlinných látek v přípravku, užívání několika přípravků najednou, nedodržování dávkování či objednávání neproověřených přípravků na internetu bez známého složení.

Jedním z důvodů pro studium účinku přírodních látek na enzymy metabolizující léčiva je odhalení potenciálního rizika pro vznik lékových interakcí. Indukce či inhibice enzymů metabolizujících léčiva může mít řadu nežádoucích důsledků např. selhání léčby nebo zvýšené riziko toxicity. Znalosti o účinku terpenů na expresi enzymů metabolizujících léčiva jsou stále značně omezené.

V mojí diplomové práci jsem zjišťovala vliv monoterpenů piperitonu a thujonu na množství mRNA cytochromů P450 (CYP3A4, CYP1A2), UDP-glukuronosyltransferas (UGT1A6, UGT1A9) a sulfotransferasy (SULT1A) s využitím kvantitativní real-time PCR a na množství proteinu CYP3A4 a CYP1A2 za použití Western blotu. Použitým modelem pro experimenty byly lidské ultratenké jaterní řezy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Terpeny

Terpeny jsou nejrozsáhlejší skupinou sekundárních metabolitů rostlin. Jejich společným strukturním znakem je uhlovodíková kostra vzniklá spojením dvou a více isoprenových jednotek (Ashour a kol. 2010). Základním stavebním kamenem terpenů je tedy 2-methylbuta-1,3-dien, neboli isopren a jsou proto také označovány jako isoprenoidy. Podle počtu isoprenových jednotek ve struktuře se terpeny rozlišují na podskupiny, jak zobrazuje tabulka 1 (Ludwiczuk a kol. 2017).

Tabulka 1. Klasifikace terpenů

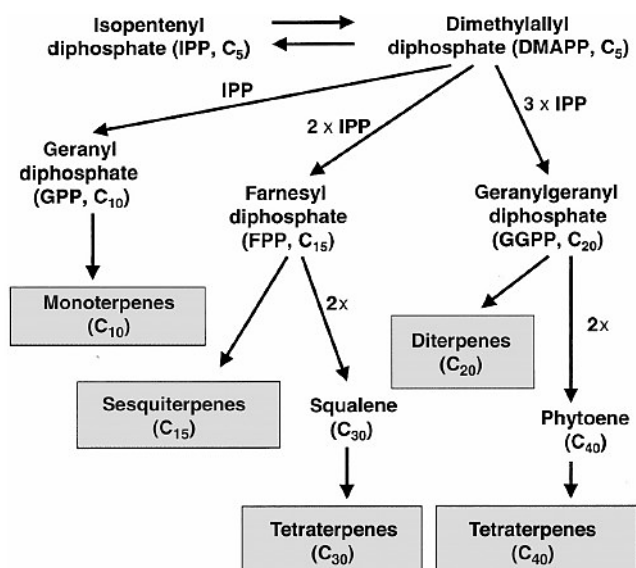
	počet isoprenových jednotek	počet atomů uhlíku
hemiterpeny	1	5
monoterpeny	2	10
seskviterpeny	3	15
diterpeny	4	20
sesterterpeny	5	25
triterpeny	6	30
tetraterpeny	8	40
polyterpeny	>9	>40

V přírodě se nejčastěji vyskytují jako alkoholy, glykosidy, ethery, aldehydy, ketony, nebo karboxylové kyseliny a jejich estery (Breitmaier 2006).

V rostlinách se syntetizují terpeny mevalonátovou cestou v cytosolu nebo cestou 2-methyl-D-erythritol-4-fosfátu (MEP) v plastidech. MEP cestou se tvoří z větší části hemiterpeny, monoterpeny, diterpeny a tetraterpeny. Mevalonátovou cestou vznikají hlavně triterpeny a seskviterpeny. V obou případech ovšem existují výjimky (Ludwiczuk a kol. 2017, Philips a Concepción 2010).

Prvním krokem biosyntézy terpenů je tvorba pětiuhlíkaté molekuly isopentenylidifosfátu (IPP) nebo jeho isomeru dimethylallyldifosfátu (DMAPP), který vzniká působením IPP-isomerasy. Na počátku biosyntézy IPP MEP cestou stojí pyruvát a glyceraldehydfosfát. Mevalonátová cesta začíná kondenzací 3 molekul acetylkoenzymu A za vzniku hydroxymethylglutaryl-CoA a jeho následnou redukcí na kyselinu mevalonovou. Kyselina mevalonová podléhá dalším reakcím, kterými je přeměněna na IPP (Ashour a kol. 2010).

Jako další krok následuje kondenzace molekul isopentenyldifosfátu a dimethylallyldifosfátu za vzniku desetiuhlíkatého geranyldifosfátu, farnesyldifosfátu s patnácti uhlíky nebo dvacetiuhlíkatého geranylgeranyldifosfátu (Obrázek 1).



Obrázek 1. Základní schéma biosyntézy terpenů u rostlin (převzato z Ashour a kol. 2010)

Význam terpenů v rostlinách spočívá v jejich funkci buď jako atraktantů pro opylovače nebo naopak rostlinu chrání před hmyzem a pozřením zvířaty (hořká chuť, toxicita). Dále mají u rostlin roli jako signální molekuly a regulátory růstu, a mohou zodpovídat i za vůni či chuť rostliny (Breitmaier 2006).

Řada terpenů našla využití v parfumerii a kosmetice, dále jako potravinářské aditivní látky nebo pesticidy. Mnoho terpenů má různorodé farmakologické účinky, řada z nich je součástí doplňků stravy nebo i léčivých přípravků a mnoho je ve fázi preklinických hodnocení. Například diterpenoidní látka paclitaxel je používána jako antineoplastikum pro terapii karcinomu ovaria nebo metastazujícího karcinomu prsu. Seskviterpen artemisinin se používá jako léčivo pro malárii (Wang a kol. 2005).

2.1.1. Monoterpeny

Monoterpeny jsou látky vycházející z desetiuhlíkatého prekurzoru geranyldifosfátu. Jde o látky těkavé povahy, často se vyskytující v čeledích *Pinaceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae* nebo *Apiaceae*. Jejich hlavním zdrojem jsou silice.

Podle struktury uhlíkatého skeletu mohou být rozříděny na acyklické (např. geraniol, myrcen), monocyklické (např. limonen, menthol), bicyklické (např. pinen, α -thujon) nebo nepravidelné (např. pyretriny).

V rostlinách bývají uloženy ve žláznatých trichomech nebo pryskyřičných kanálcích. U rostlin působí jako atraktanty k přilákání opylovačů nebo jako chemická ochrana proti hmyzu a býložravcům (Philips a Concepción, 2010).

Monoterpeny nachází své uplatnění v parfumerii, v potravinářství nebo jako rozpouštědla. Řada monoterpenů vykazuje biologickou aktivitu, především antioxidační, protizánětlivou, antimikrobní nebo antifungální. Jsou také studovány pro jejich schopnost inhibovat acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu a pro jejich potenciální protinádorovou aktivitu (Wojtunik-Kulesza a kol. 2019).

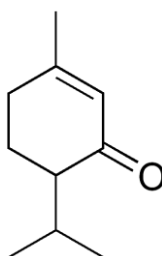
U *Origanum onites* a silice z *Artemisia campestris*, obsahujících monoterpeny jako je α -pinen, limonen, p-cymen nebo menthol, byly popsány hepatoprotektivní účinky. Na sedativních účincích druhu *Melissa officinalis* se rovněž podílí monoterpeny, například citronellal nebo geraniol acetát (Wojtunik-Kulesza a kol. 2019).

Dalším významným monoterpenem je mentol, který má chladivý efekt daný vazbou na melastatinový tranzientní receptorový potenciálový kanál 8 (TRPM8 receptor). Působí jako podpůrný prostředek při nachlazení a kašli, a je součástí mátové silice, která se využívá pro své karminativní účinky (Dvořáková a kol. 2011).

Pyretriny, monoterpenické estery, vykazují insekticidní vlastnosti. Ovlivňují sodíkové kanály nervových vláken a způsobují tak paralýzu a následnou smrt parazita. Syntetickým analogem je permetrin, který se používá u lidí lokálně pro léčbu svrabu a ve veterinární medicíně jako ektoparazitikum (Wang a kol. 2005).

2.1.1.1. Piperiton

Piperiton neboli 6-isopropyl-3-methyl-1-cyclohex-2-enon, je přírodní monoterpen charakteru ketonu. Jde o lipofilní a těkavou látku, rozpustnou v ethanolu a nerozpustnou ve vodě.



Obrázek 2. Piperiton

Piperiton je obsažen v silicích některých druhů rostlin rodu *Cymbopogon*, *Eucalyptus*, *Mentha* nebo například v několika dalších druzích z čeledi *Lamiaceae*

(Burbott a kol. 1983). Piperiton byl dále nalezen v extraktu z *Chrysactinia mexicana* (Delgado a Ríos, 1991) či v silicích některých druhů rodu *Achillea*, například *A. vermicularis*, *A. biebersteni* a *A. sintenisii* a dále například v *Rosmarinus officinalis* (Yener a kol. 2020).

Silice z *Cymbopogon schoenanthus*, která obsahuje jako jednu z hlavních složek piperiton, a samotný piperiton, byly studovány pro svůj toxický vliv na dospělé a vývojová stadia škůdce *Callosobruchus maculatus* (zrnokaz skvrnitý). Samotný piperiton se ukázal jako účinnější než silice, vykazoval silnější ovicidní aktivitu, inhiboval vývoj larev a jejich penetraci v rostlinných semenech a působil toxičtěji i na dospělá stadia (Ketoh a kol. 2006). Piperiton izolovaný ze silice *Artemisia judaica* vykazoval též insekticidní aktivitu, a to proti larvám *Spodoptera littoralis* (Abdelgaleil a kol. 2007).

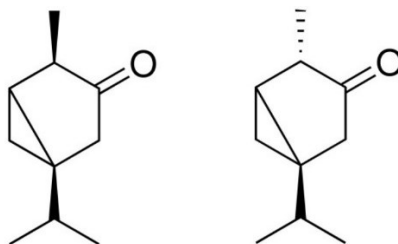
U piperitonu byla popsána i antifungální aktivita. Piperiton inhiboval růst *Penicillium citrinum* a *Mucora rouxii* (Saleh a kol. 2006), dále vykazoval střední aktivitu proti kandidám a střední až vysokou aktivitu proti některým houbám patogenním pro rostliny, např. *Pythium debaryanum* (Abdelgaleil a kol. 2007, Irají a kol. 2020).

Shahveverdi a kol. (2004) popsali schopnost silice z *Mentha longifolia* var. *chlorodictya* zvyšovat antibakteriální aktivitu nitrofurantoinu proti zástupcům *Enterobacteriaceae* rezistentním na nitrofurantoin. Aktivní komponentou této silice je právě piperiton.

Jde o aromatickou látku – používá se v potravinářství jako dochucovadlo (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1334/2008).

2.1.1.2. Thujon

Thujon je přírodní sloučenina s ketonickou funkční skupinou, chemickým názvem 4-methyl-1-propan-2-ylbicyklo[3.1.0]hexan-3-on. Jedná se o monoterpen charakteru bezbarvého oleje. V přírodě se nachází v silicích rostlin jako variabilní směs (-)- α -thujonu a (+)- β -thujonu, jejich vzájemný poměr se u různých rostlinných druhů liší (Williams a kol. 2016).



Obrázek 3. α -thujon a β -thujon (zleva)

Thujon je složkou silice u druhů *Salvia officinalis*, *Tanacetum vulgare*, *Thuja occidentalis* a *Artemisia absinthium*. Může být detekován i v dalších druzích, například *Salvia fruticosa*, *S. triloba*, *Artemisia pontica*, *A. arborescens*, dále ho lze nalézt ve stopových množstvích u některých druhů máty a u některých zástupců rodu *Achillea* nebo *Juniperus* (Németh a Nguyen, 2020).

Thujon je přírodní neurotoxin, působí jako blokátor GABA_A-receptoru. Blokádou GABA_A receptoru zabrání vstupu chloridových iontů do buňky, a tedy dosažení inhibičního postsynaptického potenciálu. Výsledkem intoxikace jsou křečovitě záchvaty. α -thujon je asi dvakrát silnější blokátor GABA_A-receptoru než β -thujon. Méně toxické jsou jeho metabolity (Höld a kol. 2000).

Přídavek thujonu v čisté formě do potravin a jídel je zakázán, povoleno je ale přidání rostlin obsahujících thujon. EMA omezuje příjem thujonu v preparátech z listů *Salvia officinalis* a *Artemisia absinthium* na 6 mg/den po dobu maximálně 2 týdnů. Limit thujonu pro alkoholické nápoje je 10 mg/kg, pro alkoholické nápoje z druhů *Artemisia* je 35 mg/kg, a pro nealkoholické nápoje z *Artemisia sp.* je limit thujonu 0,5 mg/kg (EMA 2012, EMA 2016, EMA 2020).

Při *in vitro* experimentech na lidských jaterních mikrosomech byly jako hlavní izoformy cytochromů P450 uplatňující se při metabolismu α -thujonu identifikovány CYP2A6 a CYP2B6, méně pak CYP3A4. Nejvíce zastoupené metabolity α -thujonu byly 4-hydroxy- α -thujon a 7-hydroxy- α -thujon. Hlavním metabolitem β -thujonu byl obdobně 4-hydroxy- β -thujon a 7-hydroxy- β -thujon (Höld a kol. 2001, Abass a kol. 2010).

Schopnost α -thujonu inhibovat aktivity hlavních lidských cytochromů P450 byla zkoumána na lidských mikrozomech. α -thujon inhiboval CYP2A6 s hodnotou $IC_{50} = 15,4 \mu M$ a CYP2B6 s $IC_{50} = 17,5 \mu M$ (Abass a kol. 2010).

Thujon byl studován pro jeho potenciální antikancerogenní účinky. Studie účinků thujonu na nádorové buňky glioblastoma multiforme ukázala, že thujon má potenciál snižovat novotvorbu cév v nádoru s snižuje expresi vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), přičemž směs α/β -thujonu měla silnější účinky než samotný α -thujon. Thujon také snižoval proliferaci a viabilitu buněk glioblastoma multiforme *in vitro*. Na potkaních modelech *in vivo* bylo po podání α,β -thujonu pozorováno zmenšení velikosti tumoru (Torres a kol. 2016). Pudelek a kol. (2019) popsali cytostatický a cytotoxický efekt α -thujonu o koncentracích v rozmezí 660 μM – 3,2 mM na buňky glioblastoma multiforme spolu se zvýšenou produkcí ROS v buňkách glioblastoma multiforme.

Antikancerogenní vlastnosti α,β -thujonu byly studovány i na buňkách ES2 a OV90 ovariálního karcinomu. α,β -thujon v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ zastavil růst nádorových buněk a v koncentracích 100-300 $\mu\text{g/ml}$ snižoval viabilitu buněk. Popsán byl také synergistický antikancerogenní účinek kombinace α,β -thujonu a cisplatin, kdy thujon senzitivizoval buňky ovariálního karcinomu vůči cisplatině (Lee a kol. 2020).

Byly popsány také antimikrobní, antifungální, anthelmintické a insekticidní vlastnosti thujonu a silic obsahujících thujon (Radulović a kol. 2017, Németh a Nguyen 2020).

2.2. Biotransformace xenobiotik

Xenobiotikum je pojem označující látku pro organismus cizí. Do organismu se xenobiotika dostávají zpravidla přes trávicí trakt, ale i přes kůži nebo vdechnutím. Mezi xenobiotika patří jak látky přírodního původu, například složky rostlinných silic, tak látky syntetické, kde hrají významnou roli zejména léčiva nebo kontaminanty prostředí a látky pocházející z průmyslu (Skálová a kol. 2017).

Při biotransformaci xenobiotika dochází k přeměně molekuly chemickou reakcí za účasti biotransformačních enzymů. Hlavním účelem této přeměny je usnadnění odstranění daného xenobiotika z těla. Výsledkem je většinou hydrofilnější molekula, která se snadněji vyloučí. Některá xenobiotika jsou sama o sobě dostatečně hydrofilní nebo ionizovatelná a vylučují se proto beze změny. Výjimečně může biotransformace xenobiotika vést ke vzniku metabolitu méně rozpustného ve vodě. Jako příklad lze uvést metylaci xenobiotik nebo acetylaci některých sulfonamidů, kdy dojde ke snížení jejich rozpustnosti v moči a ke vzniku krystalů (Timbrell a Marrs 2009).

Obvykle vznikají biotransformací neúčinné metabolity, ale existuje i řada případů, kdy biotransformačními reakcemi vzniknou produkty s vyšší biologickou aktivitou, například při přeměně kodeinu na morfin, nebo vzniknou produkty toxičtější, například když se ethylenglykol metabolizuje na glykolaldehyd a dále na kyselinu šťavelovou (Timbrell a Marrs 2009).

Místem s nejvyšším zastoupením biotransformačních enzymů jsou játra, ale biotransformační enzymy nalezneme i v gastrointestinálním traktu, ledvinách, mozku, plicích, kůži, kosterních svalech, placentě a dalších tkáních. V buňce jsou

biotransformační enzymy lokalizovány v endoplazmatickém retikulu, některé v cytosolu nebo mitochondriích (Švihovec a kol. 2018, Skálová a kol. 2017).

Proces biotransformace je ovlivněn mnoha faktory jako jsou například věk, pohlaví, genetická výbava, přítomná onemocnění nebo současně užívaná léčiva.

Biotransformaci je možné rozdělit na dvě fáze. V první fázi dochází k modifikaci xenobiotika zavedením nových funkčních skupin do molekuly. Ve druhé fázi je xenobiotikum konjugováno s endogenní sloučeninou (Skálová a kol. 2017, Timbrell a Marrs 2009).

2.2.1. Enzymy 1.fáze biotransformace

V první fázi biotransformace dochází zejména k reakcím oxidačním, dále k hydrolytickým reakcím, méně pak k redukčním reakcím či isomeracím. K oxidačním reakcím patří hydroxylace, oxidační deaminace, dealkylace, oxidace alkoholů a aldehydů nebo například dehalogenace. Redukci podléhají v první fázi biotransformace především nitrosloučeniny, azosloučeniny a xenobiotika obsahující karbonylovou skupinu.

Hlavními enzymy první fáze biotransformace jsou cytochromy P450, dále také flavinové monooxygenasy, alkoholdehydrogenasy a aldehyddehydrogenasy, monoaminoxidasy, xanthinoxidasy, aldehydoxidasy, peroxidasy, esterasy, epoxidhydrolasy, aldo-ketoreduktasy a další (Skálová a kol. 2017).

2.2.1.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou širokou skupinou enzymů, byly identifikovány nejen u člověka a u zvířat, ale i u rostlin, hub a bakterií. U člověka se vyskytují prakticky ve všech tkáních, s nejvyšším zastoupením v játrech, gastrointestinálním traktu a ledvinách. Dále je nalezneme například v mozku, plicích, kůži, močovém měchýři, vaječnicích, testes, placentě, nadledvinách nebo krevních destičkách. V lidské buňce jsou zakotveny v membráně hladkého endoplazmatického retikula a jsou lokalizovány i na vnitřní mitochondriální membráně.

CYP hrají klíčovou roli při detoxikaci látek v organismu. Kromě biotransformace xenobiotik se ale podílí i na metabolismu látek endogenních, například na metabolismu žlučových kyselin a cholesterolu, na biosyntéze vitamínu D₃ nebo steroidních hormonů (testosteron, kortizol, estrogen a další) (Shankar a Mehendale 2014, Manikandan a Nagini 2018).

Strukturně se jedná o hemoproteiny, protože ve své molekule obsahují hem, jakožto prostetickou skupinu. Hem je komplexní sloučenina skládající se z protoporfyrinového kruhu a centrálního atomu železa. Centrální atom železa je vázán celkem k šesti ligandům – ke čtyřem atomům dusíku protoporfyrinového kruhu, k thiolátovému anionu cysteinu a k molekule vody (Skálová a kol. 2017).

CYP patří do skupiny monooxygenas. Monooxygenasy využívají k oxidaci substrátu molekulový kyslík, kdy je jeden atom zabudován do substrátu a z druhého vzniká molekula vody. Katalytický cyklus začíná vazbou substrátu do aktivního místa enzymu. Odštěpí se voda vázaná koordinačně-kovalentní vazbou na atomu železa Fe^{3+} , kdy dojde k jeho přechodu do vysokospinového stavu. Následně je atom železa Fe^{3+} redukován transferem elektronu z NADPH za účasti NADPH-cytochrom P450 reduktasy. Následuje vazba molekuly kyslíku a vzniká komplex $Fe^{3+}-O_2^-$. Ten je redukován druhým elektronem z NADPH. Vzniklý intermediát pak reaguje s dvěma protony a výsledkem je molekula vody a hydroxylovaný produkt (Cook a kol. 2016, Manikandan a Nagini 2018).

CYP katalyzují řadu oxidačních a v určitých podmínkách i redukčních reakcí. Hlavní typy oxidačních reakcí katalyzovaných CYP jsou aromatická, alicyklická a alifatická hydroxylace, epoxidace, N-dealkylace, S-dealkylace, O-dealkylace, N- a S-oxidace, dehydrogenace, N-hydroxylace nebo oxidační deaminace (Timbrell a Marrs 2009).

Jejich exprese a aktivita je ovlivněna řadou faktorů, jako jsou věk, pohlaví, genetická výbava, vliv prostředí nebo patologické stavy, například zánět či nádorové onemocnění (Manikandan a Nagini 2018).

CYP podléhají i epigenetické regulaci mechanismy methylace DNA, modifikace histonů a pomocí mikroRNA. MikroRNA může ovlivňovat daný biotransformační enzym posttranskripčně a zároveň může jiná mikroRNA regulovat nukleární receptory podílející se na regulaci transkripce daného enzymu (například CYP3A4) (Skálová a kol. 2017).

2.2.1.1.1. CYP3A4

CYP3A4 je nejdůležitějším CYP u dospělých. Hraje zásadní roli v metabolismu více než 30 % všech xenobiotik. Široká paleta substrátů je pravděpodobně dána flexibilitou a velmi dobrou prostorovou přístupností aktivního místa enzymu. CYP3A4 je jedním z nejméně exprimovaných CYP v lidských játrech a je hlavním cytochromem exprimovaným v intestinálních enterocytech, a proto se významně podílí na first-pass

efektu perorálně podaných léčiv. Dále lze tuto izoformu nalézt například v ledvinách, plicích či mozku (Zanger a Schwab 2013, Nebert a Russell 2002).

Substráty CYP3A4 jsou z hlediska struktury velmi rozmanité. Mezi významné substráty CYP3A4 patří makrolidová antibiotika, benzodiazepiny, některá HIV antivirotika, cyklosporin, takrolimus, blokátory vápníkových kanálů, steroidy, některé statiny, propafenon, amiodaron, sildenafil, R-warfarin a mnohé další (Švihovec a kol. 2018).

V populaci je pozorována vysoká variabilita exprese a aktivity CYP3A4. Mnohonásobné rozdíly mezi jednotlivými pacienty nejsou vzácností. Jde o výsledek vlivů prostředí, genetiky, fyziologických a patofyziologických faktorů. Je to například věk, pohlaví nebo probíhající zánětlivá odpověď. Zčásti se na variabilitě podílí rovněž genetické polymorfismy, ale předpokládá se, že větší roli hraje snadná indukovatelnost a inhibice CYP3A4. Zásadní roli při indukcí CYP3A4 hrají jaderné receptory, a to pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), receptor pro vitamin D a nepřímo také glukokortikoidní receptor. Nejvýznamněji se na indukcí podílí PXR, protože je aktivován celou řadou exogenních i endogenních molekul. Aktivace jaderného receptoru po vazbě induktoru vede ke zvýšení transkripce genu pro CYP3A4 (Zhou 2008, Zanger a Schwab 2013, Skálová a kol. 2017).

Typickými induktory jsou karbamazepin, fenytoin, fenobarbital, rifampicin či přípravky z *Hypericum perforatum*.

Inhibitorů CYP3A4 je známa celá řada, například azolová antimykotika, amiodaron, klaritromycin, ritonavir, indinavir, verapamil, diltiazem nebo grapefruitová šťáva (Kousalová a kol. 2003).

2.2.1.1.2. CYP1A2

CYP1A2 řadíme spolu s CYP1A1 a CYP1B1 do rodiny CYP1. CYP1A2 se nachází výhradně v játrech. Podrodina CYP1A tvoří asi 15% z celkového obsahu CYP v lidských játrech (Gunes a Dahl 2008).

Preferenčně metabolizuje dusíkaté heterocykly a arylaminy. Hraje roli v metabolismu až 10 % klinicky používaných léčiv (Kwon a kol. 2021). Typickými příklady jsou: theofylin, klozapin, olanzapin, kofein, lidokain, tizanidin, triamteren, takrin, flutamid nebo propranolol (Tornio a Backman 2018, Kwon a kol. 2021, Zanger a Schwab 2013).

Z endogenních látek jsou CYP1A2 metabolizovány melatonin, estron, estradiol, uroporfyrinogen nebo bilirubin (Zhou a kol. 2009, Gunes a Dahl 2008).

U CYP1A2 byly pozorovány 40-130násobné interindividuální rozdíly v expresi a aktivitě enzymu. U lidí byly popsány 15-40násobné rozdíly v genové a proteinové expresi CYP1A2 (Zhou a kol. 2009). Vnějšími faktory majícími vliv na expresi CYP1A2 je například kouření, které je zdrojem polycyklických aromatických uhlovodíků. Tyto sloučeniny jsou ligandy AhR, jejich vazbou na tento receptor dochází k jeho aktivaci a následné indukci CYP1A2 (Gunes a Dahl 2008, Tornio a Backman 2018). Dalšími induktory CYP1A2 mohou být karbamazepin, barbituráty, omeprazol, polychlorované bifenylly, dioxiny nebo nelfinavir (Zanger a Schwab 2013).

Vnitřním faktorem významně se podílejícím na míře exprese a aktivitě CYP1A2 a jeho aktivitě je genetická výbava. U genu pro CYP1A2 bylo popsáno přes 40 jednonukleotidových polymorfismů, které mohou způsobit zvýšení nebo snížení katalytické aktivity. Varianta genu CYP1A2*1C vede ke snížené aktivitě a indukovatelnosti, zatímco varianta CYP1A2*1F k aktivitě a indukovatelnosti vyšší oproti variantě CYP1A2 bez mutací (Skálová a kol. 2017, Gunes a Dahl 2008).

Exprese CYP1A2 je ovlivněna také epigenetickými mechanismy (Kwon a kol. 2021).

CYP1A2 aktivuje prokarcinogeny, jako jsou heterocyklické aminy, arylaminy, polycyklické aromatické uhlovodíky nebo aflatoxin B1. Vzniklé reaktivní produkty se vážou na DNA a proteiny, což vede ke kancerogenezi a orgánové toxicitě. Například aflatoxin B1 je metabolizován CYP1A2 na aflatoxin B1-8,9-exo-epoxid, který představuje jedno z rizik pro rozvoj hepatocelulárního karcinomu (Zhou a kol. 2009, Skálová a kol. 2017).

2.2.2. Enzymy 2.fáze biotransformace

Druhá fáze biotransformace xenobiotik představuje krok, kdy probíhají konjugační reakce, kdy se xenobiotikum slučuje s endogenní sloučeninou. Vznikají takto produkty zpravidla hydrofilnější, které budou snáze vyloučeny z těla pryč. V této fázi dochází také k metabolické inaktivaci účinných látek. Mezi nejvýznamnější enzymy druhé fáze biotransformace patří UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, N-acetyltransferasy, glutathion-S-transferasy, methyltransferasy, acetyltransacetylasy a další (Jančová a kol. 2010).

2.2.2.1. UDP-glukuronosyltransferasy

UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) jsou jedny z nejdůležitějších enzymů druhé fáze biotransformace. Vyskytují se nejen u lidí, ale i u zvířat. Katalyzují konjugaci substrátu s kofaktorem, kterým je kyselina uridin-5-difosfo- α -D-glukuronová. Při glukuronidaci dochází k transferu kyseliny glukuronové z UDP-glukuronové kyseliny na funkční skupiny substrátů obsahující nukleofilní atom. Funkční skupiny podléhající glukuronidaci jsou například alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aminy, amidy nebo thioly. Podle nukleofilní funkční skupiny substrátu pak vznikají O-, N-, S-, nebo C-glukuronidy, které jsou ve vodě více rozpustné.

Substráty UGT jsou strukturně rozmanité a jsou to jak látky exogenní, tak i endogenní. Z endogenních sloučenin to jsou bilirubin, steroidní hormony, žlučové kyseliny, thyroïdní hormony nebo vitaminy rozpustné v tucích. Pro většinu substrátů platí, že mohou být metabolizovány více než jednou izoformou UGT. Výjimkou může být například bilirubin, který je metabolizován výhradně UGT1A1 (Meech a kol. 2019, Kiang a kol. 2005). U člověka se UGT podílí na glukuronidaci 40-70 % klinicky používaných léčiv (Jančová a kol. 2010).

U savců dělíme UGT do čtyř rodin: UGT1, UGT2, UGT3, UGT8. Rodiny UGT1 a UGT2 metabolizují xenobiotika a endogenní sloučeniny za účasti UDP-glukuronové kyseliny na rozdíl od rodin UGT3 a UGT8, jejichž zástupci využívají v reakcích UDP-glukosu, UDP-xylosu, UDP-N-acetylglukosamin a UDP-galaktosu.

Indukce nebo represe genů pro UGT a konstitutivní hladiny UGT jsou ovlivňovány na několika úrovních. Při regulaci exprese UGT se uplatní aktivace nebo represe transkripce prostřednictvím transkripčních faktorů, epigenetické mechanismy a posttranslační modifikace.

Na indukci UGT se podílí ligandy jaderných receptorů CAR, PXR a AhR (Meech a kol. 2019, Skálová a kol. 2017).

2.2.2.1.1. UGT1A6

Izoforma UGT1A6 je široce exprimována v lidských tkáních, hlavním místem jsou játra, ale lze ji najít i v ledvinách, žaludku, tenkém střevě, tlustém střevě, průdušnici, mozku, nadledvinách, močovém měchýři nebo plicích.

Hlavními substráty jsou molekuly xenobiotik charakteru arylaminů, fenolů, nebo dusíkatých heterocyklů. Jako příklady klinicky používaných léčiv metabolizovaných UGT1A6 lze uvést paracetamol, kyselinu acetylsalicylovou nebo kyselinu valproovou.

Významným selektivním endogenním substrátem UGT1A6 je serotonin. Zde hraje významnou roli exprese UGT1A6 v mozku a gastrointestinálním traktu (Meech a kol. 2019).

Byly popsány interindividuální rozdíly v míře glukuronidace substrátů UGT1A6 a v expresi UGT1A6 v játrech. Gen pro UGT1A6 je polymorfní. Ukázalo se, že nejčastější polymorfismy (S7A, T181A, R184S) stojí pouze částečně za interindividuální variabilitou v glukuronidaci substrátů UGT1A6 a svou roli hrají tedy i další vnější a vnitřní faktory, například hormony nebo léčiva (Bock a kol. 2005, Krishnaswamy a kol. 2005).

UGT1A6 je inducibilní. Exprese UGT1A6 může být zvýšena aktivací PXR, CAR, AhR, receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomu α (PPAR α) nebo transkripčním faktorem NRF2. Induktory jsou ligandy těchto receptorů, například karbamazepin nebo fenytoin (Bock a kol. 2005).

2.2.2.1.2. UGT1A9

Izoforma UGT1A9 je jednou z nejdůležitějších UDP-glukuronosyltransferas, která hraje významnou roli při first-pass metabolismu léčiv, snižuje expozici karcinogenů a toxinů. Nejvíce zastoupenou ji najdeme v játrech, méně poté v gastrointestinálním traktu, ledvinách nebo močovém měchýři.

UGT1A9 se podílí na konjugaci thyroïdních hormonů, kyseliny retinové, 4-hydroxyestradiolu nebo flavonoidů (Meech a kol. 2019, Jančová a kol. 2010).

Léčiva, která jsou substráty UGT1A9 jsou například morfin, fenofibrát, paracetamol, R-oxazepam, propofol, sorafenib nebo kyselina mykofenolová (Meech a kol. 2019, Kiang a kol. 2005).

UGT1A9 je indukován agonisty AhR, například polyaromatickými uhlovodíky. dále agonisty PPAR α a na regulaci exprese UGT1A9 se podílí i například transkripční faktor NRF2.

Gen pro UGT1A9 je polymorfní. Studie naznačují, že genetický polymorfismus UGT1A9 má vliv na plazmatické hladiny kyseliny mykofenolové (Thijs a kol. 2016).

2.2.2.2. Sulfotransferasy

Enzymy katalyzující sulfonaci, konjugační reakci druhé fáze biotransformace, se nazývají sulfotransferasy (SULT). Při sulfonaci dochází k připojení sulfonové skupiny (SO_3^-) k atomu kyslíku, dusíku nebo síry substrátu. Zdrojem sulfonové skupiny

je kofaktor 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (Skálová a kol. 2017, James a Ambadapadi 2013).

Podle buněčné lokalizace rozeznáváme dvě skupiny SULT – cytosolické a membránové. Membránové SULT jsou lokalizovány v membráně Golgiho aparátu a sulfonují endogenní lipidy, glykosaminoglykany, peptidy a proteiny. Cytosolické inaktivují xenobiotika a menší endogenní molekuly, například steroidní nebo thyroïdní hormony, katecholaminy, dopamin, retinol. Méně často může docházet naopak k metabolické aktivaci. Příkladem jsou proléčiva minoxidil a triamteren, jejichž aktivní forma vzniká sulfonací. Dále mohou SULT hrát roli při aktivaci prokarcinogenů a promutagenů. Ze vzniklého sulfokonjugátu je v dalším kroku sulfátový anion odštěpen za vzniku karbokationtu, který se může vázat na DNA nebo RNA (Jančová a kol. 2010, Wang a James 2006).

SULT se třídí do rodin a podrodin, podobně jako CYP a UGT. K nejvýznamnějším rodinám SULT u lidí patří SULT1 a SULT2. Enzymy rodiny SULT1 metabolizují především látky charakteru fenolů. SULT1B1 je důležitým enzymem v metabolismu thyroïdních hormonů, SULT1E1 se účastní inaktivace estrogenů (Skálová a kol. 2017, Jančová a kol. 2010).

Jaderné receptory podílející se na regulaci exprese sulfotransferas jsou: PPAR- α , PPAR- γ , CAR, PXR, VDR (receptor vitamínu D), LXR (liver X receptor), GR (glukokortikoidní receptor), AhR, FXR (farnesoid X receptor), ROR (retinoid-related orphan receptor). Regulace genové exprese SULT přes nukleární receptory je druhově a tkáňově specifická (Y.Xie a W.Xie 2020, Duffel 2018). Tak například bylo zjištěno, že PPAR- α reguluje transkripci genů pro SULT2A1 v lidských primárních hepatocytech, ale ne v potkaních. Aktivace PXR ovlivňuje expresi lidské SULT1E1, nebo například VDR ovlivňuje expresi SULT2A u člověka, potkana i myši (Runge-Morris a kol. 2013, Duffel 2018).

2.2.2.2.1. SULT1A

Nejvíce zastoupenou izoformou v lidských játrech je SULT1A1. Vyznačuje se relativně širokou substrátovou selektivitou, typickými substráty pro rodinu SULT1A jsou fenoly.

SULT1A1 je exprimována i ve střevě, ledvinách, plicích, kůži, mozku a krevních destičkách (James a Ambadapadi 2013, Hempel a kol. 2007).

Mezi substráty SULT1A1 patří monocyklické fenoly, naftol, benzylalkoholy, aromatické aminy nebo hydroxylaminy. Jako konkrétní příklad lze uvést paracetamol, minoxidil či dopamin (Hempel a kol. 2007).

Gen pro SULT1A1 je polymorfní. Nejčastějším SNP je tranzice guaninu za adenin (nukleotid 638) vedoucí k substituci ²¹³argininu za ²¹³histidin. Výsledkem je izoforma SULT1A1*2, která vykazuje nižší enzymatickou aktivitu a nižší termostabilitu. U bělochů se tato forma vyskytuje s frekvencí asi 25,4-36,5 % (Daniels a Kadlubar 2014, Jančová a kol. 2010).

Studie popisují inhibiční vliv na aktivitu SULT1A1 u některých přírodních látek (kurkumin, kvercetin), u grapefruitového džusu, černého a zeleného čaje nebo NSA (nimesulid, piroxikam, meclofenamát) (Jančová a kol. 2010, James a Ambadapadi 2013).

2.2.3. Regulace biotransformačních enzymů

2.2.3.1. Indukce

Při indukci dochází ke zvýšení transkripce cílových genů jako výsledek působení induktorů. Zvýšení transkripce znamená zvýšení syntézy mRNA a následné zvýšení syntézy daného proteinu. Na rozdíl od aktivace či inhibice, která nastává krátce při přímé interakci aktivátoru nebo inhibitoru s enzymem, trvá proces indukce déle a rychlost indukce je limitována rychlostí transkripce a rychlostí syntézy daného enzymu. Může tedy trvat až několik dní, než se ustálí nová hladina indukovaného enzymu (Fretland a Monshouwer 2010).

Hlavním mechanismem indukce biotransformačních enzymů je indukce prostřednictvím jaderných receptorů. Jaderné receptory jsou transkripční faktory a mohou se lišit mechanismem účinku. Jaderné receptory se mohou nacházet v cytosolu vázané s heat-shock proteiny (HSP). Po vazbě ligandu (např. steroidní hormon) se komplex s HSP disociuje a nově vzniklý komplex s ligandem putuje do jádra, kde se váže na specifický responzivní element v promotorové oblasti daného genu. K jadernému receptoru se následně váží koaktivátory a je aktivována transkripce. Nebo mohou být jaderné receptory lokalizovány v jádře, kde jsou navázané na DNA v komplexu s korepresory. Vazbou ligandu na receptor dojde k uvolnění korepresorů a naopak k vazbě koaktivátorů, což umožní transkripci genu (Weikum a kol. 2018).

Nejdůležitější jaderné receptory podílející se na regulaci biotransformačních enzymů jsou: PXR, CAR, a AhR (Skálová a kol. 2017).

Další a méně časté mechanismy zahrnují stabilizaci mRNA, post-translační stabilizaci enzymu, snížení degradace enzymu, nebo zvýšení výkonosti translace (Park a kol. 1993, Fretland a Monshouwer 2010).

Enzymová indukce může vést ke snížení koncentrace léčiva v krvi, pokud je léčivo substrátem daného enzymu nebo může vést ke zvýšeným hladinám toxického metabolitu v krvi včetně zvýšené aktivaci prokarcinogenů (Skálová a kol. 2017).

2.2.3.2. Inhibice

Inhibice biotransformačních enzymů probíhá na úrovni enzymu vazbou inhibitoru. Může ovšem také docházet k inhibici exprese enzymu, například ovlivněním jaderného receptoru řídicího transkripci genu pro daný enzym.

Inhibitor je molekula snižující katalytickou aktivitu enzymu. Nespecifické inhibitory jsou například těžké kovy, vážící se na thiolové skupiny cysteinových zbytků jakéhokoliv enzymu. Specifické inhibitory inhibují jen některé enzymy. Ke změnám v aktivitě enzymu dochází krátce po navázání inhibitoru.

Vazba inhibitoru na enzym může být reverzibilní nebo ireverzibilní. Při ireverzibilní inhibici se molekula inhibitoru váže na enzym zpravidla kovalentní vazbou. Tato modifikace struktury je nevratná (Skálová a kol. 2017).

Reverzibilní inhibitory snižují aktivitu enzymu jen dočasně. Vazba inhibitoru není kovalentní a inhibitor může z vazby disociovat.

Při kompetitivní inhibici se substrát i inhibitor váží na aktivní místo o které kompetují. Inhibitor je strukturně podobný substrátu. Rozsah inhibice závisí na koncentraci inhibitoru a substrátu. Nekompetitivní inhibice popisuje situaci, kdy se inhibitor váže na jiné než aktivní místo (tzv. alosterické místo), čímž dojde ke změně konformace molekuly enzymu a tím snížení katalytické aktivity. Při akompetitivní inhibici se inhibitor váže až na vzniklý komplex enzym-substrát a následně mění konformaci enzymu (Ledvina a kol. 2009).

Inhibice biotransformačních enzymů je častou příčinou lékových interakcí. Inhibice enzymu inaktivujícího dané léčivo vede ke zvýšení jeho plazmatických hladin, což může vést k projevům toxicity. Na druhou stranu inhibicí enzymu nutného k aktivaci proléčiva může docházet k nedostatečné přeměně na aktivní metabolit, a tedy nedostatečnému účinku. Inhibici enzymu lze ale využít i ke prospěchu – silný inhibitor

CYP3A4 ritonavir se podává společně s antiretrovirotikem lopinavirem. Ritonavir zde zvyšuje plazmatické hladiny lopinaviru (Švihovec a kol. 2018).

2.3. In vitro jaterní modely pro studium exprese biotransformačních enzymů

2.3.1. Jaterní řezy

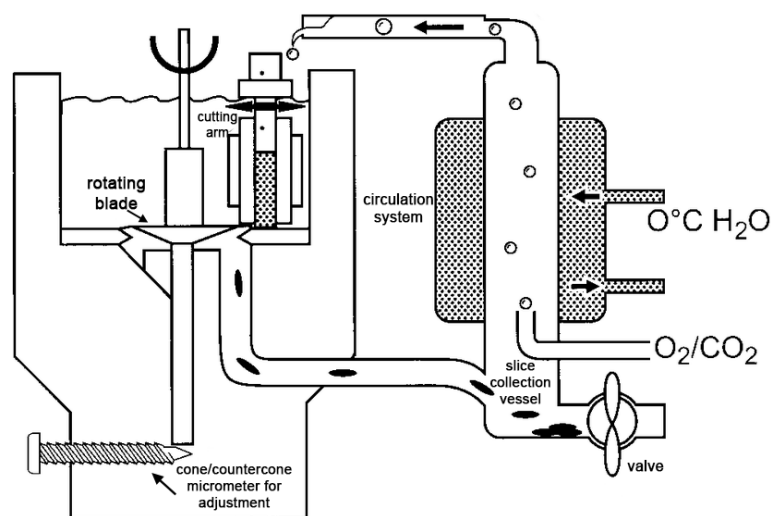
Jaterní řezy (precision-cut liver slices) představují třírozměrný *in-vitro* model charakterizovaný v první řadě zachováním mikroarchitektury jater. Prakticky se jedná o velmi tenký plátek získaný přímo řezem z jaterní tkáně. To znamená, že v modelu jsou zachovány všechny typy buněk, jejich vzájemné interakce a interakce s mezibuněčnou matrix. Kromě hepatocytů to jsou Kupfferovy buňky, Itóovy buňky, endotelové buňky, buňky epitelu žlučových kanálků, fibroblasty, buňky imunitního systému a jaterní kmenové buňky. Hepatocyty v řezech si zachovávají mezibuněčné kontakty, orientaci apikální a sinusoidální membrány a zónově specifickou aktivitu CYP enzymů. Mezi další výhody patří dobrá reprodukovatelnost, relativně menší finanční náročnost, možnost použití metody pro patologicky změněné tkáně a pro více typů tkání, jako je například střeva, mozek, ledvina či plíce (Soldatow a kol. 2013, Graaf a kol. 2010, Graaf a kol. 2007).

Jaterní řezy poprvé použil pro *in-vitro* experimenty Otto Warburg v roce 1923 a H.A. Krebs v roce 1933. Tyto řezy byly připraveny manuálně, což vedlo k výrazné limitaci připraveného množství a kvalitě řezů. Špatná reprodukovatelnost a životnost byly důvodem k odklonu od jejich používání. Obrat nastal až v roce 1980, kdy byl představen Krumdieckův kráječ (Graaf a kol. 2007).

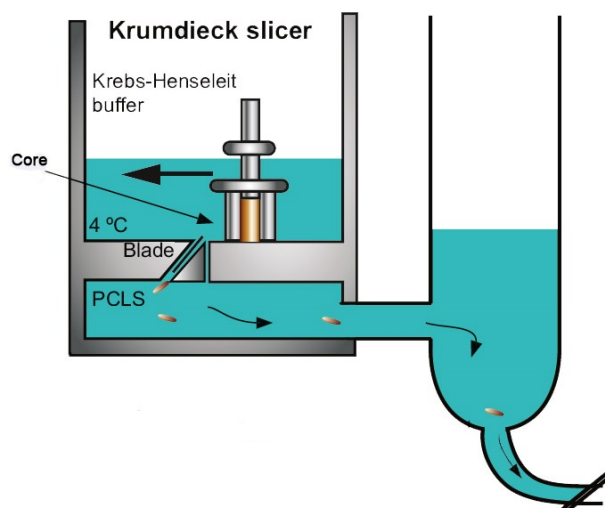
Příprava řezů začíná hned po získání čerstvé jaterní tkáně, může se jednat o tkáň transplantovaných pacientů nebo pacientů po částečné hepatektomii. Pro zbavení se krve a snížení ischemického poškození tkáně je potřeba tkáň propláchnout ledovým konzervačním roztokem (např. roztok UW, Euro-Collins). Tkáň je vždy udržována na ledu, ponořena v konzervačním roztoku (Graaf a kol. 2007, Graaf a kol. 2010).

Z tkáně jsou vyříznuta válcovitá jádra pomocí vykrajovacího nástroje, která jsou následně vložena do krájče.

Používají se hlavně dva druhy kráječů: Krumdieckův kráječ a Brendel-Vitron kráječ. Pro úplnost lze zmínit relativně nový mikrotom Leica VT1200 S (Graaf a kol. 2010). Krumdieckův kráječ je plně automatický, tkáň je krájena oscilující žiletkou. Kráječ je naplněn studeným okysličeným pufrem. Kráječ Brendel-Vitron je poloautomatický – kompartiment s tkání je přes rotující čepel pohybován ručně. Cirkulující pufr uvnitř kráječe je oxygenován 95% O₂/5% CO₂ (Lake a Price, 2012). Při porovnávání řezů z obou kráječů nebyly zjištěny významné rozdíly ve viabilitě či parametrech metabolismu xenobiotik včetně hladin cytochromů P450 (Price a kol. 1998).



Obrázek 4. Brendel-Vitron kráječ (převzato a upraveno z Hays a kol. 2003)



Obrázek 5. Krumdieckův kráječ (převzato z Olinga a Schuppan 2013)

Tloušťka řezů je nastavitelná, za ideální tloušťku řezů se považuje 100-250 μm. U příliš tlustých řezů hrozí nedostatečné zásobení vnitřních vrstev buněk nutrienty

a kyslíkem, u příliš tenkých řezů je moc vysoký podíl buněk poškozených řezem (Lerche-Langrand a Toutain 2000, Graaf a kol. 2007).

Základní typy kultivačních systémů pro řezy jsou DOC systém (dynamic organ culture system), submerzní kultivační systém (submersion culture system) a perfuzní kultivační systém. Submerzní kultivační systém představují nejčastěji 6-jamkové nebo 12-jamkové destičky, nebo baňky, kde jsou řezy celé ponořeny v médiu. Destičky či baňky s médiem musí být protřepávány, proto jsou obvykle umístěny na třepače. Uchovávají jsou v inkubátoru pod atmosférou optimálně 95% O₂/5% CO₂. V případě DOC systémů jsou řezy střídavě vystavovány médiu a plynné fázi. Řezy jsou umístěny na síťce ve válečkovém insertu vloženém v otáčející se vialce s médiem a malými otvory ve víčku umožňujícími výměnu plynů. V perfuzním inkubačním systému jsou řezy shora a zespodu vystaveny proudícímu médiu (Fisher a Vickers 2012, Graaf a kol. 2007).

Doba kultivace řezů je vzhledem k životnosti obvykle maximálně 72 hodin. Změny v kultivačních systémech a obohacení média dalšími suplementy ale byly schopny prodloužit dobu až na 7-15 dní (Dewyse a kol. 2021).

Během kultivace dochází ke snížení metabolické kapacity řezů, metabolismus je narušen asi po 24 hodinách kultivace. Aktivita a exprese CYP450 postupem času klesá. Enzymy 2. fáze biotransformace, produkce albuminu a glukoneogeneze zůstávají stabilní po dobu 20-96 hodin kultivace (Godoy a kol. 2013, Graaf a kol. 2007, Soldatow a kol. 2013).

Kromě poklesu biotransformačních enzymů je další limitací například komerční nedostupnost. Vzhledem k charakteru přípravy a kultivačních systémů není tato metoda zcela vhodná pro testování velkých množství vzorků a rozsáhlé screeningy (Graaf a kol. 2007, Palma a kol. 2018).

Jaterní řezy se uplatňují při studiu metabolických profilů a rychlostí metabolismu xenobiotik a endogenních látek, při studiích enzymové indukce a inhibice nebo regulace metabolických enzymů.

Další uplatnění nachází jaterní řezy při studiu mechanismů hepatotoxicity léčiv a její predikci. Představují vhodný model pro studium jaterního poškození, například alkoholického poškození jater (ALD). V řezech po expozici alkoholu došlo k indukci steatózy a oxidativního stresu. Zvětšené mitochondrie jakožto klasický znak ALD byly v řezech pozorovatelné. Možná je také indukce a studium mechanismů jaterní fibrózy a účinků antifibrotických léčiv. Řezy získané z jater pacientů s hepatocelulárním karcinomem mohou sloužit jako model pro preklinické testování protinádorových léčiv.

Řezy infikované virem hepatitidy C se ukázaly jako slibný model pro zkoumání mechanismů infekce, replikace, životního cyklu viru a účinnosti antivirotik (Palma a kol. 2018, Graaf a kol. 2010).

2.3.2. Suspenze primárních hepatocytů

Suspenze primárních hepatocytů představuje jednoduchý a relativně snadno dostupný *in-vitro* jaterní model. Skládá se z čerstvě izolovaných hepatocytů a média (například suplementované William's E médium).

Při izolaci primárních hepatocytů se kousky tkáně nejprve promývají perfuzním roztokem s kyselinou ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)tetraoctovou (EGTA). EGTA chelatuje vápenaté ionty. Deplece vápníku způsobí zeslabení mezibuněčných spojů nebo jejich úplnou ztrátu. Následuje perfuze vzorku médiem s kolagenasou. Kolagenasa způsobí digesci extracelulární matrix tkáně, což vede k uvolnění hepatocytů do suspenze (Godoy a kol. 2013).

Hlavní nevýhodou suspenze primárních hepatocytů je krátká životnost. Buňky začnou odumírat už 4 hodiny po izolaci. Dalšími nevýhodami jsou ztráta mezibuněčných interakcí, interakcí hepatocytů s matrix, ztráta polaritity buněk (Soldatow a kol. 2013).

Výhodami jsou naopak nižší cena, snazší zacházení, možnost testování velkého množství vzorků, možnost kryoprezervace (Elaut a kol. 2005). Richer a kol. (2006) ve své studii zjistili, že genová exprese hepatocytů krátce po izolaci je velmi podobná té u jater *in vivo*.

Suspenze primárních hepatocytů se hodí například pro studie toxických účinků xenobiotik po krátkodobé jednorázové expozici včetně inhibice enzymů, pro základní charakteristiku metabolismu testovaných látek – identifikace hlavních metabolitů nebo odhad clearance (Andria a kol. 2010, Elaut a kol. 2005).

2.3.3. Kultury hepatocytů

2.3.3.1. 2D modely

2.3.3.1.1. Monovrstva

Hepatocyty v monovrstvě představují tradiční a jednoduchý jaterní *in-vitro* model, dlouho považovaný za „zlatý standard“. Prakticky jde o vrstvu buněk adherovanou na rigidní substrát na dně jamek plastové destičky. Jamky jsou nejčastěji

potázeny kolagenem. Kolagen zlepšuje adhezi buněk, prodlužuje jejich přežití a zčásti pomáhá udržet diferencovaný fenotyp. Dalšími alternativami jsou například laminin, fibronectin, kombinace fibronectinu+kolagenu I, nebo Matrigel, který je produkovaný buňkami myšního sarkomu a je složen z proteinů extracelulární matrix (např. laminin, kolagen IV, eutektin) a růstových faktorů. Pomáhá buňkám zaujmout tvar podobný jako *in-vivo* a částečně předchází dediferenciaci (Vilas-Boas a kol. 2019, Ruoff a kol. 2020).

Ke kultivaci se používají hepatocyty izolované hlavně metodou dvojstupňové kolagenázové perfuze. Získaná suspenze hepatocytů se naředí kultivačním médiem na požadovanou koncentraci hepatocytů.

Ve statické kultuře je obvykle nutné měnit médium každý den, na rozdíl od perfúzní kultury, kde tok média nad monovrstvou zajišťuje lepší dostupnost kyslíku a odvod odpadních metabolitů (Vilas-Boas a kol. 2019, LeCluyse 2001).

Hepatocyty kultivované v monovrstvě si po určitou dobu udržují syntézu plazmatických proteinů a žlučových kyselin, metabolismus cukrů, syntézu a ukládání glykogenu, expresi biotransformačních enzymů s možností jejich indukce či inhibice (Gómez-Lechón a kol. 2014).

Hlavní limitací je dediferenciace buněk a s ní související pokles funkcí hepatocytů. Dediferenciace nastává zhruba po 24-72 hodinách kultivace. Dochází ke změnám v morfologii buněk, změnám v expresi a aktivitě jaterních transportérů, dále dochází ke snížení exprese biotransformačních enzymů nebo například k poklesu syntézy plazmatických proteinů (Soldatow a kol. 2013, Ramboer a kol. 2013). Mezi opatření ke zpomalení tohoto procesu patří vhodná suplementace kultivačního média (např. glukokortikoidy, insulin, DMSO). Dalším řešením je kokultivace s dalšími buňkami nebo využití sandwichové kultury (Fraczek a kol. 2013, Vilas-Boas a kol. 2019, Soldatow a kol. 2013).

Nevýhodou tohoto modelu je také ztráta polarita hepatocytů a absence dalších jaterních buněk (Gómez-Lechón a kol. 2014).

Hepatocyty v monovrstvě se využívají k charakterizaci profilu metabolitů potenciálních léčiv, hepatotoxicity, ke studiím indukce či inhibice biotransformačních enzymů. Jsou vhodné taky pro zkoumání interindividuálních i mezidruhových rozdílů v metabolismu (Soldatow a kol. 2013, Gómez-Lechón a kol. 2014).

2.3.3.1.2. Sandwichové kultury

V sandwichové kultuře jsou hepatocyty v jamkách umístěny mezi dvěma vrstvami složenými z komponent extracelulární matrix. Nejčastěji to je kolagen I nebo Matrigel (Gómez-Lechón a kol. 2014). Gómez-Lechón a kol. (2014) řadí sandwichové kultury k 2D systémům, jiní autoři je klasifikují jako 3D kultury, například Burkhardt a kol (2014).

Na rozdíl od monovrstvy, kde jsou hepatocyty značně zploštělé, si hepatocyty v sandwichové kultuře zachovávají polyedrický tvar, jejich morfologie proto více připomíná hepatocyty *in vivo*. U hepatocytů v sandwichové kultuře dochází k obnově polarizace, mezibuněčných kontaktů a formaci nové sítě žlučových kapilár. V porovnání s monovrstvou se sandwichové kultury vyznačují taky prodloužením viability, zlepšenou sekrecí albuminu a lepší expresí biotransformačních enzymů (Godoy a kol. 2013, Fraczek a kol. 2013).

Expres CYP je stabilnější než u monovrstvy a změny aktivity enzymu v čase závisí na konkrétní izoformě. Aktivita UGT klesá od 4. dne kultivace, aktivita SULT je zvýšena do 7. dne kultivace a poté klesá. Obecně platí, že aktivity enzymů v čase kultivace postupně klesají, stejně tak aktivita membránových transportních proteinů (De Bruyn a kol. 2013).

I přesto, že je nástup dediferenciace opožděn, dediferenciace stále představuje hlavní limitaci.

Význam tohoto modelu spočívá v jeho využití při studiu hepatobiliárního transportu léčiv a předpovědi hepatobiliární clearance díky zachované síti žlučových kapilár. Dále může být využit pro studium jaterních transportérů, pro studium hepatotoxicity léčiv, lékových interakcí, enzymové indukce a inhibice a zkoumání mechanismů lékového poškození jater zejména u léčiv způsobujících cholestázu (Gómez-Lechón a kol. 2014, De Bruyn a kol. 2013).

2.3.3.2. 3D modely

2.3.3.2.1. Sféroidy

Sféroidy jsou mnohobuněčné agregáty sférického tvaru. Využívají schopnosti suspendovaných hepatocytů se znovu uspořádat do 3D struktury v případě zamezení adherence k substrátu. Hepatocyty ve sféroidech jsou polygonální, s definovanými

apikálními a bazolaterálními membránami. Ideální průměr sféroidu je 200-300 μm , u větších by mohlo hrozit vzniknutí nekrózy uprostřed sféroidu (Gómez-Lechón a kol. 2014, Godoy a kol. 2013).

Sféroidy jsou cenným *in-vitro* modelem pro svou všestrannost a schopnost udržet si fenotyp, viabilitu, funkce a tvar v průběhu kultivace, která se pohybuje v řádu týdnů. Sféroidy mají funkční žlučové kanálky a hepatocyty si produkují vlastní extracelulární matrix. Ukázalo se, že oproti 2D modelům si zachovávají expresi a aktivitu biotransformačních enzymů po delší dobu, mají lepší funkčnost mezibuněčných kontaktů a mají i vyšší citlivost vůči xenobiotikům. Další výhodou je i příznivá cena a to, že nejsou nutná složitá technická zařízení. Komplikací je nesnadné zacházení se samotnými sféroidy (Bell a kol. 2016, Mizoi a kol. 2020).

Pro sféroidy je možné použít primární lidské hepatocyty, buněčné linie HepG2, HepaRG, C3A, Huh-7 nebo z hepatocyty odvozené od kmenových buněk. Nejblíže se játrům *in-vivo* podobají sféroidy z primárních lidských hepatocytů. Aktivity CYP1A2, CYP2C9, CYP2C8, CYP2D6, CYP3A4 jsou u nich vyšší a stabilnější než v 2D kultuře (Bell a kol. 2016, Vorrink a kol. 2017).

Pro přípravu sféroidů se mohou použít speciální nízkoadherentní destičky, kde je povrch jamek potažený hydrofilním polymerem. Dalším možným způsobem je metoda visící kapky, kdy se pro formaci sféroidu využije rozhraní voda-vzduch a gravitace. Původně metoda zahrnovala pipetování kapek na víko Petriho misky, v současnosti jsou komerčně dostupné speciální destičky, u kterých je možná i výměna média. Méně rozšířená je formace sféroidů za použití magnetického pole. Buňky se smíchají s hydrogelem obsahujícím nanočástice s oxidem železa. Nanočástice jsou adsorbovány na membránu nebo pohlceny buňkou. Vnější magnet nad jamkou pak drží buňky u sebe (Zhang a kol. 2020).

Sféroidy se ukazují jako vhodný model pro predikci hepatotoxicity léčiv, a to zejména po dlouhodobé nebo opakované expozici. Dále se mohou využít pro definici farmakokinetických parametrů, pro identifikaci metabolitů léčiv, pro studie indukce, inhibice a aktivity biotransformačních enzymů. U sféroidů je možná indukce steatózy, cholestázy, a je možné navodit inzulinovou rezistenci, můžou tedy sloužit například jako model nealkoholového postižení jater při steatóze. Sféroidy byly použity i jako modely pro screening antivirotik a pro studium virové hepatitidy C, B nebo jaterní fáze malárie a i pro studium efektů infekce SARS-2-COV (Ingelman-Sundberg a Lauschke 2021, Mizoi a kol. 2020).

2.3.3.2.2. Scaffold-based techniky

Scaffold-based techniky jsou založeny na použití trojrozměrných matic (skeletů), které tvoří pomocné lešení pro hepatocyty. Využití skeletu umožní buňkám zaujmout 3D uspořádání a tím obnovit mezibuněčné kontakty, žlučové kanálky nebo polarizaci buněk. Výsledkem je také zvýšená syntéza albuminu a aktivita enzymů nebo zpomalení dediferenciace.

Skelet může být na bázi přírodních materiálů, materiálů odvozených od přírodních molekul nebo na bázi syntetické. Přírodní materiály jsou biokompatibilní a blíže napodobují interakce mezi buňkou a matrix jako v játrech. Nevýhodou může být jejich variabilita ve složení, nepřesně definované složení nebo nižší stabilita. Mezi používané syntetické molekuly patří například polystyren, kyselina polyglykolová a kyselina polymléčná nebo jejich kopolymer.

Jako příklady modelů lze uvést například porézní matrix na bázi alginátu, propletená mikro- a nanovlákná mezi kterými jsou kultivovány hepatocyty, mikromřížky, nebo porézní polymerní skelety vzniklé přelitím roztoku polymeru přes formu obsahující porogenní částice s následným odpařením rozpouštědla a rozpuštěním porogenních částic. K moderní a rozvíjející se metodě patří také využití 3D tisku pro získání navrženého skeletu (Godoy a kol. 2013, Burkhardt a kol. 2014).

2.3.3.3. Kokultivace

Při kokultivaci se společně kultivují dva nebo více typů buněk. S hepatocyty se mohou kultivovat non-parenchymální buňky, například Kupfferovy buňky, Itoovy buňky nebo sinusoidální endotelové buňky. Další možností je využití buněk nepocházejících z jater, jako jsou fibroblasty nebo epitelální buňky jiných tkání. Uplatní se kultivace jak ve 3D, tak i ve 2D uspořádání, častými modely jsou sféroidy či sandwichové uspořádání.

Kokultivace vede k obnově heterotypických mezibuněčných kontaktů. Výsledkem je delší udržení diferencovaného fenotypu, prodloužené přežití buněk, bližší podobnost k morfologii *in vivo*, stabilnější exprese CYP a enzymů 2. fáze biotransformace a zvýšená produkce albuminu či ury (Bhatia a kol. 1999, Fraczek a kol. 2013, Gómez-Lechón a kol. 2014).

2.3.4. Linie imortalizovaných hepatocytů

Linie imortalizovaných hepatocytů nachází uplatnění jako alternativa primárních hepatocytů. Oproti primárním hepatocytům je jejich hlavní výhodou neomezená

životnost, stabilita fenotypu a původ od jednoho dárce. Jsou snadno komerčně dostupné. Mohou být kultivovány ve 2D i 3D kulturách včetně kokultivace (Godoy a kol. 2013).

2.3.4.1. HepG2

HepG2 je vysoce proliferativní buněčná linie pocházející z biopsie 15letého pacienta s hepatocelulárním karcinomem. Má zachovalou řadu jaterních funkcí – syntézu plazmatických bílkovin, syntézu glykogenu, žlučových kyselin a dále metabolismus triacylglycerolů nebo cholesterolu. Hlavní nevýhodou je velmi nízká až chybějící exprese lékových transportérů a biotransformačních enzymů, zejména CYP3A4, CYP2A6, CYP2C9. Pomocí genetického inženýrství byly za využití adenoviru, cytomegaloviru nebo viru vakcinie do buněk vpraveny geny kódující některé biotransformační enzymy.

Sféroidy připravené z těchto buněk vykazovaly oproti 2D uspořádání vyšší syntézu albuminu, urey, obnovu buněčné polarizace.

Kultury HepG2 buněk představují model využitelný pro studium metabolismu a hepatotoxicity potenciálních léčiv (Donato a kol. 2015, Kammerer 2021).

2.3.4.2. HepaRG

Buňky vycházejí z tumoru pacientky s hepatitidou C a hepatocelulárním karcinomem. Diferencované buňky vykazují relativně blízkou podobnost s lidskými primárními hepatocyty. To se týká jak exprese biotransformačních enzymů, tak jaderných receptorů a lékových transportérů. Výjimkou je exprese CYP2D6 a CYP2C9, která je snižena, protože dárkyně byla pomalým metabolizátorem.

Nevýhodou je nutnost časově náročného procesu diferenciaci.

Kultury z HepaRG buněk je možné využít pro studie metabolismu léčiv, testy toxicity nebo studie indukce CYP450. Sféroidy z HepaRG se ukázaly jako systém schopný predikce steatózy či cholestázy vyvolané hepatotoxickými látkami (Andersson a kol. 2012, Kammerer 2021).

2.3.4.3. C3A

Buněčná linie C3A je odvozena od HepG2 buněk. V kultuře je jejich proliferace částečně inhibována kontaktem s okolními buňkami, čímž se liší od jiných linií buněk odvozených od hepatokarcinomu. Buňky kultivované v monovrstvě vykazují metabolickou aktivitu většiny CYP, avšak tato aktivita je mnohem nižší než u primárních lidských hepatocytů.

C3A sféroidy si udržují v průběhu kultivace stabilní počet živých buněk a stabilní produkci albuminu a urey (Elkayam a kol. 2006, Zhang a kol. 2020). Gaskell a kol. (2016) ve své studii popsali sféroidy, které si zachovaly viabilitu a funkci po dobu minimálně 32 dní, měly funkční P-glykoprotein a MRP2 a vykazovaly vyšší citlivost vůči vybraným hepatotoxickým látkám než 2D kultury.

3. CÍL PRÁCE

Cílem mojí diplomové práce bylo zjistit vliv monoterpenů thujonu a piperitonu na expresi vybraných biotransformačních enzymů v jaterních řezech připravených z lidské tkáně.

- Připravit jaterní řezy ze vzorků lidských jater a inkubovat je 24 hodin s thujonem nebo piperitonem v koncentracích 10 μM a 50 μM .
- Stanovit množství mRNA CYP1A2, CYP3A4, SULT1A, UGT1A6 A UGT1A9 pomocí kvantitativní RT-PCR.
- Stanovit množství proteinu CYP1A2 a CYP3A4 ve vzorcích pomocí Western blotu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál

4.1.1. Biologický materiál

Biologickým materiálem byly vzorky lidských jater, které byly poskytnuty Fakultní nemocnicí v Hradci Králové se souhlasem Etické komise FNHK a informovaným souhlasem pacienta. Vzorky byly získány při resekci jater pro přítomné nádorové onemocnění. Informace o pacientech uvádí Tabulka 2. Kvůli nevyhovujícím výsledkům hodnocení integrity mRNA u pacienta 51, které bylo prováděno až zpětně, nebyly výsledky měření tohoto pacienta nakonec použity.

Tabulka 2. Informace o pacientech.

Číslo pacienta	Věk	Pohlaví	Diagnóza	Léčiva
48	72	žena	endokrinní tumor, metastáze jater, DM, hypertenze	metformin, glimepirid, ramipril
51	69	žena	metastáze kolorektálního karcinomu	amlodipin, bisoprolol, perindopril, FOLFOX/bevacizumab
58	42	muž	metastáze kolorektálního karcinomu	N/A
59	76	muž	metastáze kolorektálního karcinomu, hypertenze, hypotyreóza, FiS	N/A

4.1.2. Chemikálie

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) – Carl Roth
β-glycerolfosfát – Sigma-Aldrich

Akrylamid (AA) - Serva
Bicinchoninová kyselina (BCA) – Sigma-Aldrich
Bisakrylamid - Serva
Bromfenolová modř – Sigma-Aldrich
Diethylpyrokarbonát 0,1% (DEPC) – Sigma-Aldrich
Dihydrogenfosforečnan draselný – Penta
Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich
Dithiotreitol (DTT) – Sigma-Aldrich
Dodecylsírán sodný (SDS) – Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Sigma-Aldrich
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraoctová kyselina (EGTA)
Fluorid sodný – Sigma-Aldrich
Gentamycin – Sigma-Aldrich
Glycerol 85% - Dr.Kulich Pharma
Glycin – Sigma-Aldrich
Hexahydrát síranu hořečnatého – Sigma-Aldrich
Hydrogenuhlíčan sodný – Penta
Chlorid draselný – Penta
Chlorid vápenatý – Penta
Chloroform – Sigma-Aldrich
Isobutanol – Sigma-Aldrich
Isopropanol – Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková – Penta
Methanol – Penta
Peroxodisírán amonný (APS) – Sigma-Aldrich
Piperiton – Extrasynthese
Pyrofosfát sodný – Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED) – Sigma-Aldrich
Thujon – α -(-)-thujon, Extrasynthese
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) – Sigma-Aldrich
Triton x-100 – Sigma-Aldrich
Trizol reagent – Thermo Fisher Scientific
Tween 20 – Sigma-Aldrich
Vanadičnan sodný – Carl Roth

reverzní transkriptasa ProtoScript II – New England BioLabs
Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-ROX – Institute of Applied Biotechnologies

4.1.3. Přístroje

Analytické váhy Sartorius CP225D
Applied Biosystems QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System, Fisher Scientific
BioRad Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell
BioRad Trans-Blot Turbo Transfer Systém
Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos
IKA MS2 Minishaker
Krumdieck Tissue Slicer MD4000 (TSE Systems)
Laboratorní váhy Sartorius M-prove
Laminární box Aura Vertical S.D.4
Magnetická míchačka IKA Color Squid Hytrel HTR 8068
Mini centrifuga Sprout Heathrow Scientific
NanoDrop 2000 Thermo Scientific / ND 1000
PCR cyklér MJ Mini, BioRad
Spektrofotometr Tecan Infinite M200 Pro
Thermomixer Eppendorf Comfort
Uvitec Cambridge Alliance

4.2. Jaterní řezy

4.2.1. Příprava zásobního Krebs-Henseleitova pufru

Zásobní roztok pufru (10x koncentrovaný) byl připraven rozpuštěním složek dle Tabulky 3 v 0,5 l redestilované vody. Chlorid vápenatý byl přidán jako poslední až po rozpuštění ostatních složek.

Tabulka 3. Složení zásobního Krebs-Henseleitova pufru o objemu 0,5 l

	navážka (g)
KCl	1,87
NaCl	34,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,36
KH ₂ PO ₄	0,82
CaCl ₂	1,39

4.2.2. Příprava pracovního Krebs-Henseleitova pufru

Finální pracovní pufr byl připraven ze zásobního roztoku v den přípravy jaterních řezů podle Tabulky 4. Tento pufr byl poté probubláván pneumoxidem po dobu 1 h. Následně bylo pH pufru upraveno na 7,4 pomocí HCl.

Tabulka 4. Složení 1 litru pracovního Krebs-Henseleitova pufru.

10x koncentrovaný zásobní pufr	100 ml
NaHCO ₃	2,10 g
glukosa	4,95 g
HEPES	2,38 g
redestilovaná voda	doplnit do 1000 ml

4.2.3. Příprava kultivačního média

Médium pro preinkubaci bylo připraveno obohacením komerčně vyráběného média Williams' E GlutaMAX (ThermoFisher). K médiu bylo přidáno 25 mmol/l glukosy, aby výsledná koncentrace glukosy byla 36 mmol/l, a gentamycin tak, aby finální koncentrace gentamycinu v médiu byla 50 µg/ml. Roztok glukosy a gentamycin byly předem podrobeny bakteriální filtraci.

4.2.4. Příprava roztoků thujonu a piperitonu

Jaterní řezy byly inkubovány s monoterpeny piperitonem a thujonem v koncentraci 10 a 50 µM. Zásobní roztok (100 mM) monoterpeny byl zředěn DMSO a vzniklý roztok byl pak 1000x naředěn v kultivačním médiu.

Tabulka 5. Ředění roztoků monoterpenů

Výsledná koncentrace (µM)	10	50
Ředění zásobní roztok : DMSO	1:9	1:1
Ředění v médiu roztok : médium	1:999	1:999

4.2.5. Příprava řezů ze vzorků lidských jater

Pro přípravu jaterních řezů byl použit Krumdieckův kráječ – Model MD4000. Kráječ byl sestaven a naplněn vychlazeným Krebs-Henseleitovým pufrem. Kráječ byl připojen k vodní lázni o teplotě 4°C.

Získaný vzorek jater byl vložen do kádinky s Krebs-Henseleitovým pufrem a kádinka byla postavena na led. Manipulace s játry probíhala na Petriho misce na ledu. Z jaterní tkáně byly kovovým kráječem tvaru trubičky opatrně vyříznuty jednotlivé válečky o průměru základny 8 mm. Válečky by neměly obsahovat cévy a vazivo. Váleček byl vložen do otvoru v kráječi. Tloušťka řezu byla nastavena na 150 μm . Postupně vznikající řezy byly z kráječe odchyťávány do kádinky s pufrem a drženy na ledu.

Řezy byly průběžně kontrolovány, jestli se netrhají nebo nemají roztřepené okraje.

Ze získaných řezů byly vybrány ty celistvé, souměrné, bez cév či výrazného množství vaziva, a ty byly přeneseny do 12-jamkové kultivační destičky s 1100 μl obohaceného Wiliamsonova média (Wiliams' E+Glutamax obohacený o gentamycin a glukosu). Destičky se takto umístily na třepačku v inkubátoru a nechaly inkubovat 1h při 37° C, 85% O₂, 5% CO₂. Poté byly řezy přemístěny pomocí entomologické pinzety do nových 12-jamkových destiček s 1300 μl média s testovanou látkou a daly se inkubovat na 24 h. Řezy byly pro daný monoterpen o dané koncentraci vždy inkubovány v triplikátu. Kontrolní řezy inkubované bez monoterpeny byly rovněž v triplikátu.

Po inkubaci byla v řezech stanovena exprese vybraných enzymů.

4.3. Kvantitativní PCR v reálném čase

4.3.1. Izolace RNA TRIzolom

Ze vzorku jater každého pacienta bylo zpracováno vždy 15 jaterních řezů – kontrola, řezy ovlivněné piperitonem o koncentracích 10 a 50 μM , řezy ovlivněné thujonem o koncentracích 10 a 50 μM , a to vždy v triplikátech. Celý proces byl prováděn v PCR boxu, jehož plocha byla předem omyta detergentem, který ničí přítomné RNasy (RNaseZAP).

K jaterním řezům přeneseným do mikrozkušavek bylo pipetováno vždy 500 μl TRIzolu. Jedná se o kyselou směs fenolu s guanidin isothiokyanátem, umožňující denaturaci proteinů a separaci celkové RNA buněk od DNA a proteinů. Přidání chloroformu způsobí rozdělení systému na vodnou a organickou fázi. Kyselé pH způsobí přechod DNA do organické fáze a RNA do vodné fáze.

Jednotlivé vzorky byly v mikrozkušnicích homogenizovány pomocí homogenizační tyčinky, nechaly se stát 5 minut při pokojové teplotě a následně k nim bylo přidáno 100 μ l chloroformu, jakožto organické fáze. Asi na 15 sekund byly vzorky protřepávány v ruce. Po 3 minutách stání byly vzorky centrifugovány při 12 000 g, 4 °C po dobu 15 minut. Došlo tak k oddělení fází, kde horní vodná fáze obsahuje RNA, mezifáze a spodní organická fáze proteiny a DNA.

Horní fáze byla opatrně odebrána do nové mikrozkušnice a poté bylo přidáno 250 μ l isopropanolu, který zde slouží jako precipitační činidlo pro vysrážení RNA.

Po 10 minutách stání byly mikrozkušnice opět centrifugovány 10 minut při 12 000 g, 4° C. Supernatant byl odsán pipetou, k peletě RNA bylo přidáno 0,5 ml 75% ethanolu připraveného z DEPC vody a následně byly mikrozkušnice centrifugovány 5 minut při 7500 g.

Po odstranění supernatantu se peleta nechala usušit na volném vzduchu a pak se při důkladném promíchání rozpustila v 20-40 μ l DEPC vody dle velikosti pelety. Vzorky byly poté uloženy na led.

4.3.2. Měření čistoty a koncentrace RNA

Čistota a koncentrace RNA ve vzorcích byla měřena pomocí spektrofotometru NanoDrop. Nejprve byl podstavec na vzorek očištěn pipetováním 2 μ l redestilované vody a důkladně otřen.

V počítači byl otevřen příslušný program a zobrazena tabulka. Na začátku byl měřen slepý vzorek, kdy bylo na spodní hrot NanoDropu pipetováno 2 μ l vody. Stejným způsobem byly měřeny jednotlivé vzorky, které byly předem promíchány na třepače a pipetovány byly rovněž 2 μ l.

Pro zhodnocení čistoty vzorku sloužily dva údaje – kontaminace proteiny a kontaminace fenolem. Kontaminace proteiny byla určena jako poměr absorbancí DNA při vlnové délce 260 nm a proteinů při vlnové délce 280 nm. Tento poměr by měl být větší než 1,8. Kontaminace fenolem je dána poměrem absorbancí při vlnových délkách 260 a 230 nm, tato hodnota by se v ideálním případě měla blížit 2.

4.3.3. Ošetření vzorků DNAsou

Účelem tohoto kroku je zbavení se případné kontaminace vzorků genomovou DNA.

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky:

- *0,5M EDTA s pH 8,0*: 18,61g ethylendiamin-tetraacetátu bylo smícháno se zhruba 80 ml redestilované vody ošetřené diethylpyrokarbonátem. Postupně byl přidáván hydroxid sodný, dokud pH nedosáhlo 8,0. Po rozpuštění EDTA byl roztok doplněn vodou do 100 ml.
- *0,1M EDTA s pH 8,0*: Zásobní roztok 0,5M EDTA byl zředěn redestilovanou vodou v poměru 1:4.

Podle koncentrace RNA zjištěné v přechozím kroku, bylo pro jednotlivé vzorky vypočítáno, jaký objem vzorku obsahuje 10 µg RNA a kolik je k tomuto objemu potřeba přidat redestilované vody ošetřené DEPC 0,1%, aby výsledný objem této směsi byl 26 µl. Vypočítaná množství byla pipetována do mikrozkušavek a na závěr bylo do každé mikrozkušavky pipetováno 4 µl zředěné DNAsy, která byla naředěna pufrům (DNase buffer) v poměru 1:3. Celkový objem této směsi v mikrozkušavce byl tedy 30 µl.

Mikrozkušavky byly promíchány na vortexu a inkubovány za stálého třepání (500 rpm) při 37 °C po dobu 25 minut v přístroji Thermomixer Eppendorf Comfort.

Poté bylo do každé mikrozkušavky pipetováno 1,5 µl 0,1M EDTA. Další inkubace probíhala 10 minut při teplotě 75 °C, kdy byla DNasa denaturována. Nakonec byly vzorky doplněny 18,5 µl DEPC vody. Celková koncentrace RNA ve vzorcích tedy byla 0,2 µg/µl a takto připravené vzorky jsou nachystány k reverzní transkripci. Uchovávány byly v mrazáku při -70 °C.

4.3.4. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, kdy je RNA přepisována do cDNA (complementary DNA) za účasti enzymu reverzní transkriptasy. Reverzní transkriptasa je RNA-dependentní DNA polymerasa. Ke startu je potřeba krátký primer, který je komplementárně vázán na templátovou RNA.

Nejprve byla napipetována směs 5 µl RNA vzorků a 1 µl oligo(dT) primeru do mikrozkušavek. Takto byly připraveny dvě paralelní sady, každá o 15 vzorcích RNA včetně kontrol (3x5). Jedna sada vždy slouží jako kontrola a je bez reverzní transkriptasy. Mikrozkušavky s touto směsí byly zahřívány v PCR cykléru na 65 °C po dobu 5 minut, kdy proběhne denaturace RNA. Pak byly postaveny na led a lehce stočeny na vortexu.

Následně bylo do každé mikrozkušavky pipetováno 14 µl mastermixu. Mastermixy byly připraveny podle následující tabulky, jednotlivá množství se násobila počtem vzorků+1, tj. 16.

Tabulka 6: Složení mastermixů na jeden vzorek

	sada s RT	sada bez RT
Reakční pufr 5x	4 μ l	4 μ l
DTT	2 μ l	2 μ l
dNTPs 5mM	2 μ l	2 μ l
RT	0,5 μ l	--
H ₂ O	5,5 μ l	6 μ l

Vysvětlivky: RT=reverzní transkriptasa, DTT= dithiothreitol, dNTPs = deoxyribonukleotidtrifosfáty, reakční pufr – dodáván s RT, složení - 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂

Mikrozkumavky s reakční směsí byly inkubovány v PCR cykléru 50 minut při 42° C, kdy proběhne syntéza vlákna cDNA a poté 5 minut při 85°C, kdy dochází k denuraci reverzní transkriptasy.

Přípravená cDNA v mikrozkumavkách byla ředěna 80 μ l redestilované vody.

4.3.5. Kvantitativní RT-PCR v reálném čase

Pro měření vlivu zkoumaných látek na množství mRNA daných enzymů byla použita metoda kvantitativní real-time PCR spojená s reverzní transkripcí. Principem je izolace RNA ze vzorku s následným přepisem řetězce RNA pomocí reverzní transkriptasy do cDNA. Takto získané vlákno templátové DNA vstupuje do PCR, kde je k vláknu DNA pomocí primerů, DNA-polymerasy a oligonukleotidů v reakční směsi syntetizováno druhé vlákno. Denurací při cca 95 °C se od sebe vlákna DNA oddělí, opět dojde k přisednutí primerů a syntéze nového vlákna DNA. Takto dochází s každým cyklem k amplifikaci vybraného úseku DNA.

Na rozdíl od klasické PCR, při real-time PCR je množství DNA produktu zaznamenáváno v průběhu reakce.

V každém cyklu bylo množství produktu detekováno pomocí měření fluorescence. Jako zdroj fluorescence bylo použito interkalační barvivo SYBR Green I, které se nespecificky váže na dvouřetězcovou DNA. K fluorescenci dochází až po navázání na dvouřetězcovou DNA (Adams, 2020).

Pro zhodnocení genové exprese byla použita relativní kvantifikace. Výpočet byl proveden za použití komparativní $\Delta\Delta C_t$ metody (Nolan a kol. 2006, Schmittgen a Livak 2008).

Výpočet R (normalizovaný expresní poměr): $R=2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (ovlivněný vzorek) – ΔCt (kontrola)

ΔCt (ovlivněný vzorek) = ΔCt cílového genu – ΔCt referenčního genu

ΔCt (kontrola) = ΔCt cílového genu – ΔCt referenčního genu

Jako referenční geny byly využity gen pro 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) a gen pro beta-aktin (ACTB). U použitých primerů byla ověřena čistota, účinnost, koncentrace.

Tabulka 7. Použité primery

Gen	Forward primer	Reverse primer
ACTB	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
YWHAZ	TGATCCCCAATGCTTCACAAG	GCCAAGTAACGGTAGTAATCTCC
CYP3A4	CCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGG	CTGGTGTTCCTCAGGCACAGA
CYP1A2	CTTCCCTGAGAGTAGCGATGAGA	GCAGTCTCCACGAACTCATGAG
UGT1A9	AGGAACATTTATTATGCCACCGT	GAGATCATACTCCGTAACAGGTG
UGT1A6	CCGGGGTCATGAGATTGTAGT	AGCTCTTCTTGGTCATACGGC
SULT1A	CCCACGACTCCTGAAGACAC	CACATCCTTTGCGTTGCGG

Nejdříve byly do 0,5 ml mikrozkušavek připraveny mastermixy pro jednotlivé cílové geny a pro referenční geny.

Tabulka 8. SYBR qPCR MasterMix – reakční směs pro PCR

	na 1 jamku (reakci)	na 33 jamek (reakcí)
redestilovaná voda	4,2 μ l	138,6 μ l
2x SG Mix*	10,0 μ l	330,0 μ l
Forward primer 5 μ M	0,4 μ l	13,2 μ l
Reverse primer 5 μ M	0,4 μ l	13,2 μ l

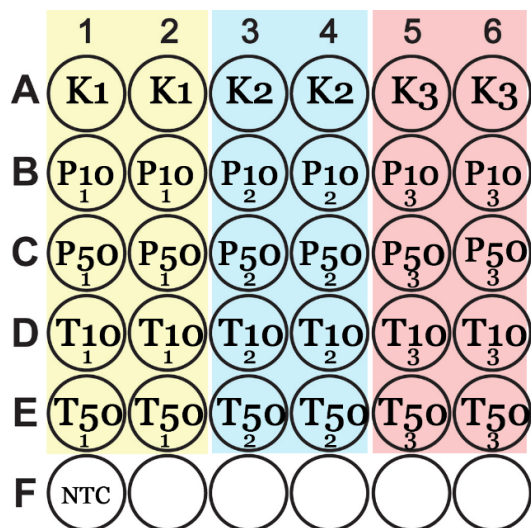
*2x SG Mix= obsahuje SYBR Green I, DNA polymerasu, dinukleotidtrifosfáty, pufr

Pro stanovení 1 genu u celkem 15 vzorků od jednoho pacienta v duplikátech + 1x kontrola bez templátové cDNA (NTC) + 2 vzorky navíc kvůli možné nepřesnosti v pipetování bylo připraveno množství reakční směsi vždy pro 33 jamek. Schéma pipetování ilustruje obrázek 6.

Připravený SYBR qPCR MasterMix byl rozpipetován po 15 μ l do každé jamky destičky pro PCR. Nakonec byly do jamek pipetovány vzorky cDNA v množství 5 μ l. Do jedné jamky pro NTC bylo pipetováno 5 μ l vody místo cDNA.

Destička byla vždy přelepena uzavírací fólií, mírně protřepána, a vložena do termocykléru Quant Studio 6 Flex, kde byl spuštěn příslušný program.

Získaná data byla jako tabulka exportována do programu MS Excel.



Obrázek 6. Pipetovací schéma, pro jeden gen u jednoho pacienta. K=kontrola, P₁₀, P₅₀=vzorky ovlivněné piperitonem v daných koncentracích (μ M), T₁₀, T₅₀ = vzorky ovlivněné thujonem v daných koncentracích

4.4. Kvantifikace vybraných proteinů

4.4.1. Příprava vzorků

4.4.1.1. Příprava zásobních roztoků na ředění vzorků

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky – lyzační pufr a 4xSDS vzorkový pufr podle Tabulky 9 a 10.

Tabulka 9. Příprava 4xSDS vzorkového pufru

TRIS/HCl pH 6,8 1M	4 ml
85% glycerol	9,41 ml
SDS	1,2 g
DTT	0,617 g
bromfenolová modř	0,1 g
redestilovaná voda	20 ml

Tabulka 10. Příprava zásobního lyzačního pufru

Tris/HCl pH 7,4 1M	50 ml
NaCl	8,766 g
85% glycerol	117,65 ml
100% Triton X-100	10 ml
EDTA	0,58 g
EGTA	0,76 g
B-glycerolfosfát	8,52 g
fluorid sodný	2,09 g
pyrofosfát sodný	4,46 g
dithiotreitol	0,3085 g
vanadičnan sodný	0,03678 g
voda	doplněno do 1 litru

Před použitím bylo odebráno do plastové zkumavky s víčkem 13 ml zásobního lyzačního pufru. Následně bylo do zkumavky přidáno 130 μ l směsi inhibitorů proteáz a 130 μ l fenylmethansulfonyl fluoridu o koncentraci 100 mM.

4.4.1.2. Homogenizace řezů

Pro jeden experiment bylo použito celkem 15 jaterních řezů – řezy ovlivněné thujonem v koncentraci 10 a 50 μ M, řezy ovlivněné piperitonem o koncentraci 10 a 50 μ M a kontrola, vždy v triplicátech.

Po inkubaci byly jednotlivé řezy přeneseny do mikrozkuvek typu eppendorf s 300 μ l lyzačního pufru a zhomogenizovány. Mikrozkuvky se zhomogenizovaným

obsahem se poté nechaly 20 minut stát v ledu a následně byly centrifugovány při 4 °C, 13 000 rpm 10 minut. Supernatant byl odebrán do nových mikrozkuavek.

4.4.1.3. BCA stanovení bílkoviny

Pro správné zředění vzorků na Western blot (1µg/µl bílkovin) bylo nejprve potřeba stanovit množství bílkoviny ve vzorcích.

Podstatou této metody je redukce Cu^{2+} na Cu^{1+} v zásaditém prostředí, a to prostřednictvím peptidových vazeb. Měďné ionty následně tvoří modrofialový komplex s BCA. Množství vzniklých měďných iontů je přímo úměrné množství přítomných proteinů.

4.4.1.3.1. Kalibrační křivka

Příprava roztoku C

Pracovní roztok C byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 50:1

Roztok A = NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1M NaOH

Roztok B = 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Bylo pipetováno 235 µl roztoku B a 11,76 ml roztoku A.

Standardní roztoky

Do 6 mikrozkuavek byly připraveny standardní roztoky podle Tabulky 11.

Tabulka 11. Kalibrační přímka

	koncentrace [µg/ml]	0,2% roztok BSA [µl]	destilovaná voda [µl]
1	0	0	100
2	200	10	90
3	400	20	80
4	600	30	70
5	800	40	60
6	1000	50	50

Do jamky bylo napipetováno vždy 10 µl standardního roztoku bílkoviny a 200 µl roztoku C, každý vzorek ve 4 paralelkách.

Pro stanovení bílkoviny ve vzorcích bylo odebráno vždy 10 µl supernatantu a toto množství bylo zředěno 40 µl destilované vody. Pipetováno bylo do každé jamky 10 µl zředěného vzorku a 200 µl roztoku C. Každý vzorek byl pipetován v duplikátu a hodnoty při vyhodnocování zprůměrovány.

Po napipetování vzorků a roztoků pro kalibrační přímku byla destička inkubována 30 min při 37 °C v přístroji Themomixer.

Množství proteinů se určuje spektrofotometricky. Modrofialový komplex BCA a měďných iontů vykazuje maximální absorpenci při vlnové délce 562 nm. Pro měření absorbance byl použit přístroj Tecan Infinite M200 Pro.

Z naměřených dat byla v MS Excel sestavena kalibrační přímk a určena rovnice kalibrační přímky, podle které byly vypočítány celkové obsahy proteinů ve vzorcích.

4.4.1.4. Naředění vzorků lyzačním pufrem a 4xSDS

Podle zjištěného obsahu bílkoviny ve vzorcích byly lyzáty jaterních řezů naředěny lyzačním pufrem a 4xSDS pufrem tak, aby SDS pufr tvořil ¼ celkového objemu a zároveň, aby koncentrace bílkoviny ve vzorku byla 1 µg/µl.

Z triplikátů byly smícháním vytvořeny směsné vzorky. Vzorky byly před nanášením na gel denaturovány v přístroji Thermomixer Eppendorf Comfort po dobu 5 minut za teploty 95°C.

4.4.2. Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu

4.4.2.1. Příprava roztoků

- *Zásobní roztok AA+bis AA* – 30 g AA + 0,8 g bisAA bylo smícháno a doplněno redestilovanou vodou do 100 ml.
- *1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8* – 18,5 g Tris bylo rozpuštěno v 75 ml redestilované vody, pomocí 4 M HCl upraveno pH a doplněno vodou do 100 ml.
- *0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8* – 6 g Tris bylo rozpuštěno v 75 ml redestilované vody, dále upraveno pH pomocí 4 M HCl na 6,8 a doplněno vodou do 100 ml.
- *10% SDS* – 10 g SDS bylo rozpuštěno v 80 ml redestilované vody a doplněno vodou do 100 ml.
- *Elektrodový pufr* – 72 g glycinu, 15 g Tris a 5 g SDS bylo rozpuštěno v 900 ml redestilované vody, pH upraveno pomocí 4M HCl na 8,3 a doplněno vodou do 1000 ml. 70 ml tohoto pufru bylo smícháno s 280 ml redestilované vody.

- 10% APS (na dva gely 1,5mm) – 50 mg peroxidisíranu amonného bylo rozpuštěno v 500 µl redestilované vody. Příprava probíhá až těsně před použitím.

4.4.2.2. Příprava gelů

Důkladně omyté sklo a sklo se spacerem (pro 1,5 mm gel) byly přiloženy k sobě a vloženy do nalévacího stojánku na gumovou podložku a uchyceny horním kolíkem.

V kádince s míchadlem byl jako první připraven separační gel, jak ukazuje Tabulka 12. Příprava byla prováděna v digestoři. Roztok APS a TEMED byly přidány jako poslední, protože iniciují polymeraci. Ihned po smíchání všech komponent byl roztok pipetován mezi skla do výše asi 4,5 cm.

Tabulka 12. Příprava roztoku na separační gel (2 gely, 10%, 1,5 mm)

Redestilovaná voda	9,8 ml
Pufř 1,5M Tris-HCl pH 8,8	5 ml
roztok 40% AA + bis AA	5 ml
10% SDS	200 µl
Roztok APS	200 µl
TEMED	16 µl

Roztok na gel byl převrstven malým množstvím isobutanolu nasyceného vodou a nechal se polymerovat přibližně 1 hodinu. Isobutanol byl poté slit a zbytek vysušen filtračním papírem.

Dále byl v kádince v digestoři namíchán roztok pro zaostřovací gel dle Tabulky 13.

Tabulka 13. Příprava roztoku na zaostřovací gel (2 gely, 4%, 1,5 mm)

Redestilovaná voda	6,42 ml
Pufř 0,5M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
roztok 40% AA + bis AA	0,98 ml
10% SDS	100 µl
Roztok APS	200 µl
TEMED	16 µl

Roztok pro zaostřovací gel byl pipetován na separační gel až k hornímu okraji a následně do něj byl zasunut hřeben pro vytvoření jamek na vzorky. Nechal se polymerovat přes noc.

4.4.2.3. Průběh elektroforézy

Gelová elektroforéza je metoda, která separuje proteiny podle jejich molekulové hmotnosti. Systémem prochází elektrický proud, který způsobí pohyb záporně nabitých proteinů gelem směrem k anodě. Přidaný SDS denaturuje proteiny a zároveň se na ně váže, čímž jim uděluje záporný náboj. Rychlost pohybu proteinů gelem proto závisí pouze na molekulové hmotnosti – menší proteiny se pohybují gelem rychleji.

Skla s gelem byla umyta vodou a z gelu byl vyjmut hřeben. Jamky vytvořené hřebenem byly opláchnuty destilovanou vodou. Skla byla vložena do stojanu na elektroforézu tak, aby sklo se spacerem směřovalo směrem ven a tenčí krycí sklo směrem dovnitř elektroforetické cely. Stojan byl vložen do vaničky na elektroforézu.

Do vnitřního prostoru elektroforetické cely byl mezi skla s gely nalit elektrodotový pufr tak, aby byl celý gel ponořen. Vanička byla rovněž naplněna elektrodotovým puffrem do takové výšky, aby drátek ve stojanu pro elektroforézu byl pod hladinou.

Do první jamky bylo pipetováno 1,25 μ l proteinového markeru, dále bylo pipetováno vždy 25 μ l kontroly a vzorků. Do zbylých jamek bylo pipetou nanášeno 25 μ l 1xSDS puffru.

Vanička byla přikryta víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Bylo nastaveno napětí 90 V, asi po 30 minutách bylo navýšeno na 120 V. Přístroj byl vypnut v momentě, kdy čelo dorazilo ke spodnímu okraji separačního gelu.

4.4.2.4. Western blot a chemiluminiscenční detekce proteinů

Western blot je metoda sloužící k detekci konkrétního proteinu. Po proběhnutí elektroforézy jsou rozdělené proteiny z gelu přeneseny na membránu působením elektrického proudu. Na membráně jsou dané proteiny detekovány vazbou primární protilátky proti požadovanému proteinu. Na primární protilátku se váže značená sekundární protilátka umožňující detekci.

4.4.2.4.1. Příprava roztoků

- *Blotovací pufr* – 6,06 g Tris a 28,8 g glycinu bylo rozpuštěno v 500 ml redestilované vody. Bylo přidáno 400 ml methanolu a doplněno vodou do 2000 ml.

- 0,1 M TRIS pufr, pH 8,0 – 12,11 g Tris byl rozpuštěn v 800 ml redestilované vody a pH upraveno na 8,0 pomocí 4M HCl. Roztok byl doplněn vodou do 1000 ml.
- TBST - 8,77 g NaCl bylo rozpuštěno v 300 ml redestilované vody, následně bylo přidáno 500 µl Tweenu 20 a 100 ml 0,1M TRIS pufru o pH 8. Vše bylo doplněno do 1000 ml.
- 5% roztok mléka v TBST – na dvě membrány bylo potřeba navážit 2,5 g Skim Milk Powder a rozpustit v 50 ml TBST.

Primární protilátky – zásobní protilátka byla zředěna TBST pufrům s 1% BSA

protilátka proti CYP3A4 – rabbit, zředění 1: 5000 (Abcam, ab124921)

protilátka proti CYP1A2 – mouse, zředění 1:5000 (Cell Signaling, D2V7S)

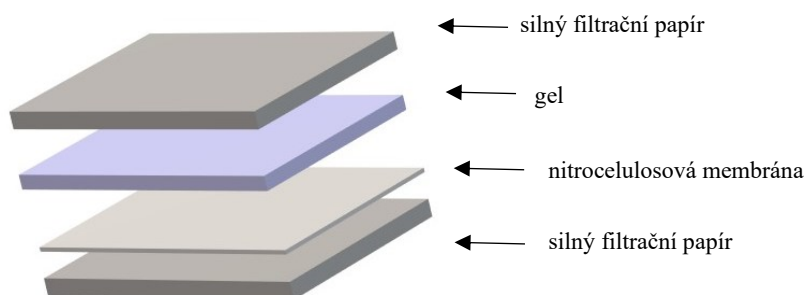
protilátka proti kalnexinu – rabbit, zředění 1:5000 (Abcam, ab75801)

Sekundární protilátky - zásobní protilátka byla zředěna TBST pufrům s 1% BSA
anti-rabbit, anti-mouse – zředění 1:20 000, konjugované s křenovou peroxidasou

4.4.2.4.2. Western blot

Sklo s gelem bylo opatrně otevřeno klínkem, byl odříznut zaostřovací gel a spodní část separačního gelu s barvivem. Gely byly poté přeneseny do blotovacího pufru, kde se nechaly ponořené 20 minut. Do blotovacího pufru se rovněž na 20 minut vložily nitrocelulosové membrány o velikosti gelu a silné filtrační papíry – jedna membrána a 2 filtrační papíry na jeden gel.

Pro samotný transfer proteinů na membránu byl použit blotovací přístroj Biorad Trans Blot Turbo Transfer System. Do kazety přístroje se skládal blot v následujícím pořadí:



Obrázek 7. Skládání blotovacího sandwiche

Gel byl po položení na filtrační papír uhlazen válečkem, aby byly odstraněny případné vzduchové bubliny. Po složení byl opět celý sandwich v kazetě uhlazen válečkem a mírně polit blotovacím pufrem. Kazeta byla přiklopena víkem, uzavřena a vložena do přístroje. Blotting probíhal 20 minut při napětí 25 V a proudu 1,3 A.

4.4.2.4.3. Detekce proteinů

Po dokončení blotování bylo nejprve zkontrolováno, jestli se přenesl proteinový marker (molekulový standard) na membránu. Barevné značky byly obtaženy propiskou a popsány. Poté byla membrána pinzetou přenesena do plastové krabičky s víčkem a 3x opláchnuta redestilovanou vodou. Do krabičky s membránou bylo posléze nalito asi 25 ml 5% roztoku mléka v TBST pufru a krabička byla umístěna na kývačku. Po dvou hodinách byl roztok slit, membrána se 3x opláchnula redestilovanou vodou a v krabičce se přes noc na kývačce inkubovala s primární protilátkou.

Druhý den se po slití roztoku primární protilátky membrána 4x15 minut oplachovala TBST pufrem. Následovala jednodinová inkubace membrány se sekundární protilátkou s navázanou křenovou peroxidasou. Po inkubaci byla membrána opět 4x opláchnuta TBST pufrem.

Po vylití TBST pufru z krabičky byl na membránu napipetován substrát tak, aby pokryl celou membránu. Jako substrát pro detekci se použilo detekční činidlo od firmy Amersham (ECL Prime Western Blotting detection reagent), obsahující roztok luminolu a roztok peroxidu. Na jednu membránu bylo použito 600 μ l luminolu + 600 μ l roztoku peroxidu.

Membrána byla po 5 minutách pinzetou přenesena mezi dvě fólie. Fólie byly papírovým ubrouskem opatrně uhlazeny, aby se odstranily bubliny a nadbytek detekčního roztoku. Chemiluminiscenční detekce proteinů proběhla za použití přístroje Uvitec Alliance.

Křenová peroxidasa navázaná na sekundární protilátku katalyzuje oxidaci luminolu roztokem peroxidu vodíku. Oxidovaný luminol pak vykazuje chemiluminiscenci.

4.5. Zpracování dat

Statistické zhodnocení dat bylo provedeno metodou one-way ANOVA s Dunnetovým testem v programu GraphPad Prism verze 8.0.1. Hodnocen byl vždy rozdíl mezi kontrolním neovlivněným vzorkem a vzorkem ovlivněným monoterpenem. O statisticky významný rozdíl se jednalo, když $p < 0,05$. Grafy byly vytvořeny rovněž v programu GraphPad Prism verze 8.0.1.

Pro hodnocení dat proteinové exprese byl využit program ImageJ.

5. VÝSLEDKY

5.1. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA vybraných biotransformačních enzymů

Pro stanovení změn v množství mRNA vybraných biotransformačních enzymů byla použita metoda rt-PCR s reverzní transkripcí. Ultratenké jaterní řezy z tkáně lidských jater byly inkubovány 24 hodin s vybranými monoterpeny. Byl použit piperiton a thujon v koncentracích 10 μM a 50 μM .

Pro experiment byly použity jaterní řezy z tkáně tří pacientů. Při zpětném stanovování integrity mRNA byly výsledky u vzorků pacienta č.51 nevyhovující, a proto výsledky měření vzorků pacienta č.51 nakonec nebyly použity.

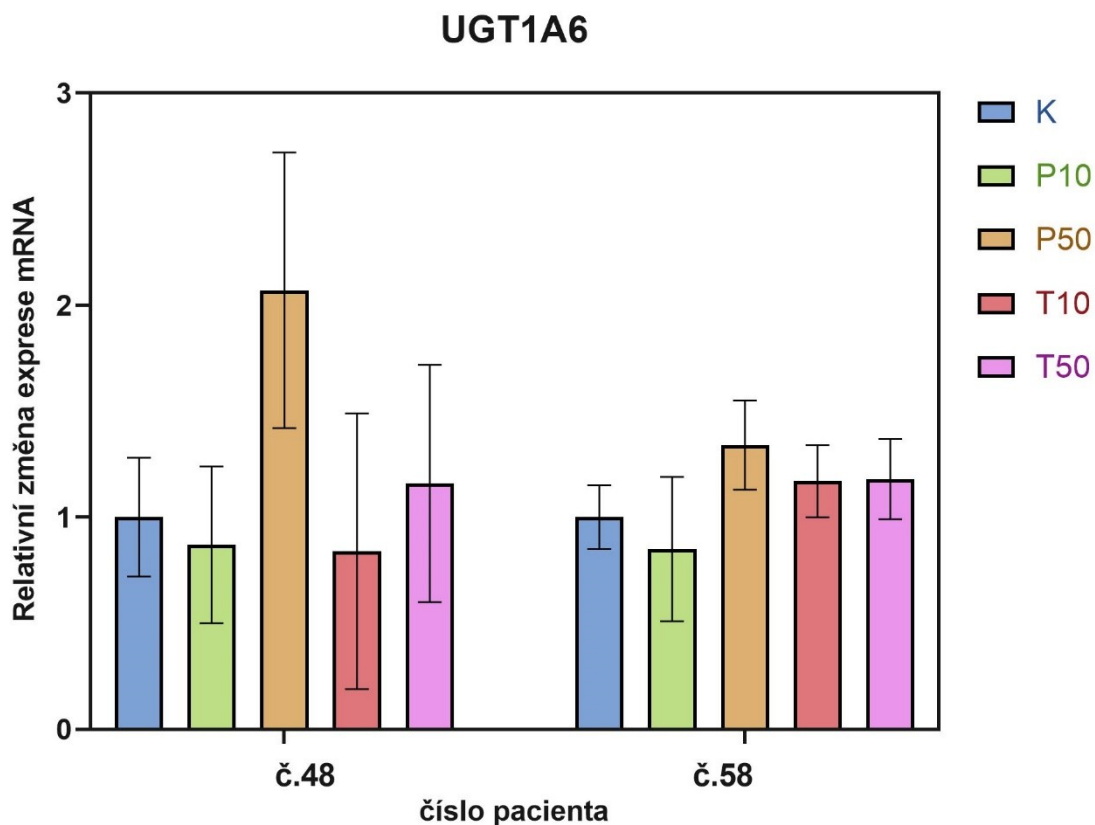
S každou látkou, v obou koncentracích, byly inkubovány vždy celkem tři řezy od jednoho pacienta.

Každé opakování bylo do destičky na rt-PCR pipetováno v duplikátu.

Studovanými biotransformačními enzymy byly UGT1A6, UGT1A9, SULT1A, CYP1A2 a CYP3A4. Použité referenční geny byly ACTB a YWHAZ, resp. jejich geometrický průměr. Výsledky byly vztaženy ke kontrolnímu vzorku (K).

5.1.1. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA UGT1A6

Obrázek 8 ukazuje relativní změny v expresi mRNA enzymu UGT1A6. Žádný z výsledků nepředstavuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole, ale u pacienta č.48 i pacienta č. 58 si lze všimnout mírného zvýšení exprese oproti kontrole u vzorků inkubovaných s piperitonem o koncentraci 50 μM .

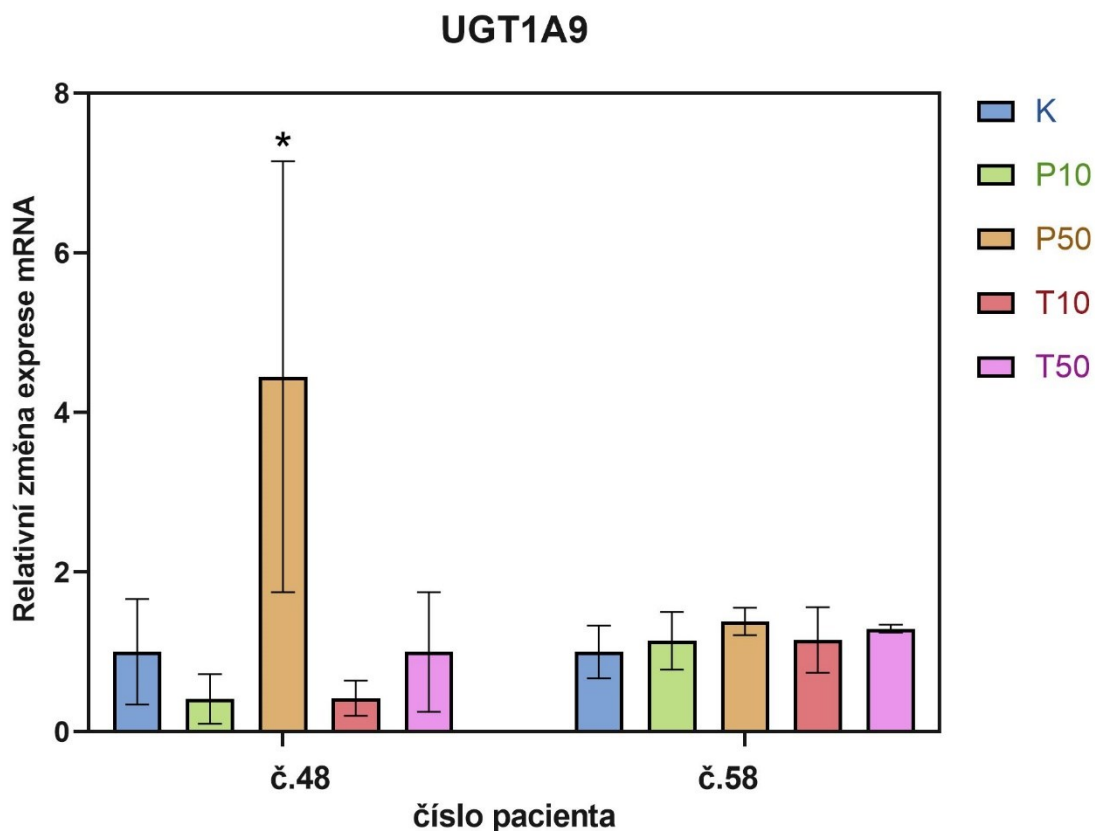


Obrázek 8. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA UGT1A6. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (P10, P50) a s thujonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (T10, T50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze tří paralelních měření.

5.1.2. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA UGT1A9

Relativní změny v expresi mRNA enzymu UGT1A9 jsou zobrazeny na Obrázku 9. Ke statisticky významnému zvýšení exprese, navzdory vysoké směrodatné odchylce, došlo u vzorku pacienta č.48 inkubovaného 24 hodin s piperitonem o koncentraci 50 μM .

U všech ostatních měření množství mRNA UGT1A9 byly změny vůči kontrole nesignifikantní.



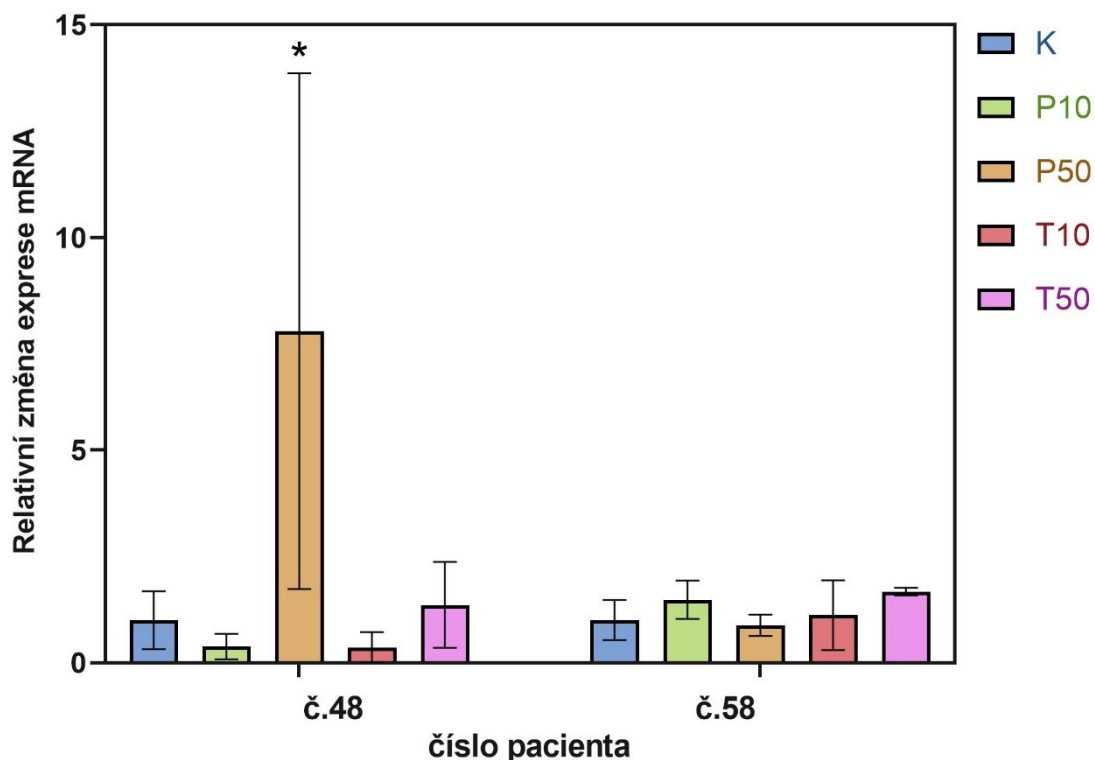
Obrázek 9. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA UGT1A9. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (P10, P50) a s thujonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (T10, T50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze tří paralelních měření. * označuje statisticky významnou změnu oproti kontrole (one-way ANOVA s Dunnettovým testem, $p < 0,05$).

5.1.3. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA SULT1A

Obrázek 10 znázorňuje vliv thujonu a piperitonu o koncentraci 10 μM a 50 μM na množství mRNA SULT1A v lidských jaterních řezech. U pacienta č. 48 můžeme vidět statisticky významné zvýšení exprese SULT1A u vzorků inkubovaných s 50 μM piperitonem. Nicméně, jak je vidět podle chybové úsečky, mezi jednotlivými měřeními byla velmi vysoká variabilita dat a nelze tedy na tomto místě vyloučit chybu vzniklou v průběhu experimentu.

Ostatní výsledky nevykazovaly statisticky významné změny v expresi SULT1A.

SULT1A



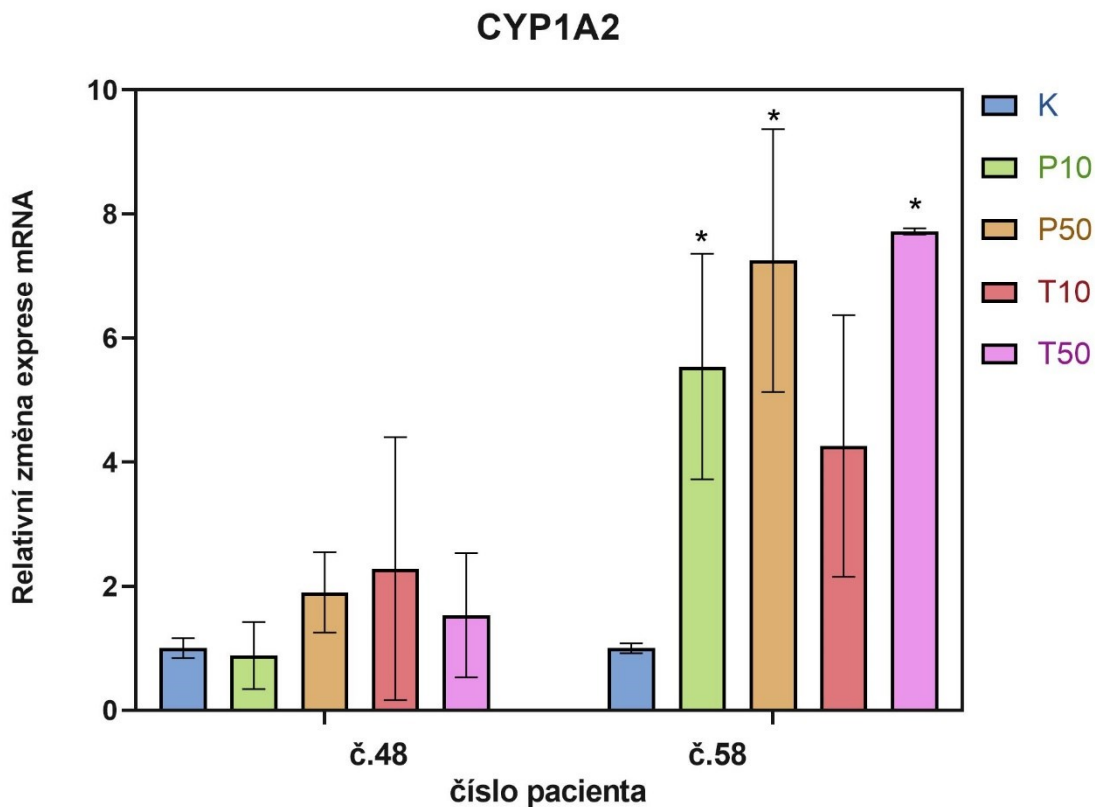
Obrázek 10. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA SULT1A. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (P10, P50) a s thujonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (T10, T50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze tří paralelních měření. * označuje statisticky významnou změnu oproti kontrole (one-way ANOVA s Dunnettovým testem, $p < 0,05$).

5.1.4. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA CYP1A2

Změny exprese CYP1A2 ve vzorcích ovlivněných thujonem nebo piperitonem popisuje graf na následujícím obrázku. U pacienta č.58 byla zaznamenána statisticky významná indukce CYP1A2 u vzorků ovlivněných piperitonem v koncentraci 10 μM i 50 μM a u vzorků ovlivněných thujonem o koncentraci 50 μM .

U pacienta č. 48 nedošlo u žádných vzorků ke statisticky významné změně v expresi enzymu oproti kontrole. Je vidět pouze malé zvýšení exprese u vzorků ovlivněných thujonem a piperitonem v koncentraci 50 μM .

U obou pacientů je patrné zvýšení množství CYP1A2 v řezech ovlivněných 10 μM thujonem, kvůli vysoké směrodatné odchylce se ale nejedná o statisticky signifikantní změnu.

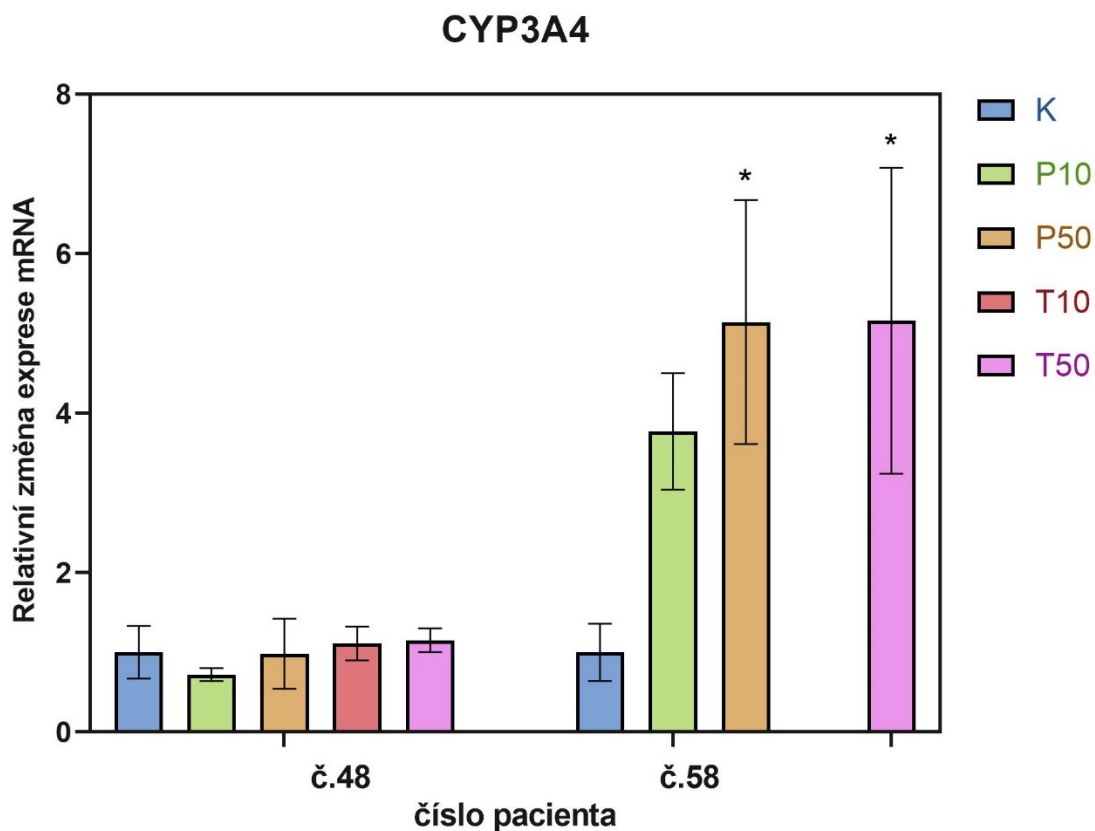


Obrázek 11. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA CYP1A2. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (P10, P50) a s thujonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (T10, T50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze tří paralelních měření. * označuje statisticky významnou změnu oproti kontrole (one-way ANOVA s Dunnettovým testem, $p < 0,05$).

5.1.5. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA CYP3A4

U pacienta č.48 nedošlo k žádným významným změnám exprese. Zvýšená exprese byla pozorována u pacienta č.58, kdy došlo ke statisticky významné indukci CYP3A4 po inkubaci s piperitonem (50 μM). Z grafu je vidět, že množství mRNA zvyšoval i piperiton o koncentraci 10 μM .

Thujon (50 μM) způsobil u pacienta č.58 statisticky významné zvýšení exprese mRNA CYP3A4. U vzorků ovlivněných thujonem v koncentraci 10 μM u pacienta č.58 se nepodařilo stanovit expresi mRNA.

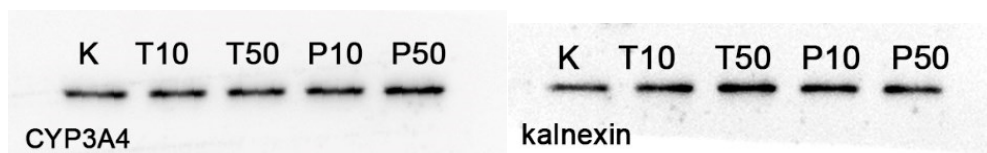


Obrázek 12. Vliv thujonu a piperitonu na množství mRNA CYP3A4. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (P10, P50) a s thujonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (T10, T50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze tří paralelních měření. * označuje statisticky významnou změnu oproti kontrole (one-way ANOVA s Dunnettovým testem, $p < 0,05$).

5.2. Vliv thujonu a piperitonu na množství proteinu vybraných biotransformačních enzymů

Byl sledován vliv vybraných monoterpenů na množství proteinu CYP1A2 a CYP3A4. Proteiny byly kvantifikovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu a Western blotu s následnou chemiluminiscenční detekcí. Vzorky byly inkubovány s piperitonem (10 μM , 50 μM) nebo thujonem (10 μM , 50 μM) 24 hodin při teplotě 37°C.

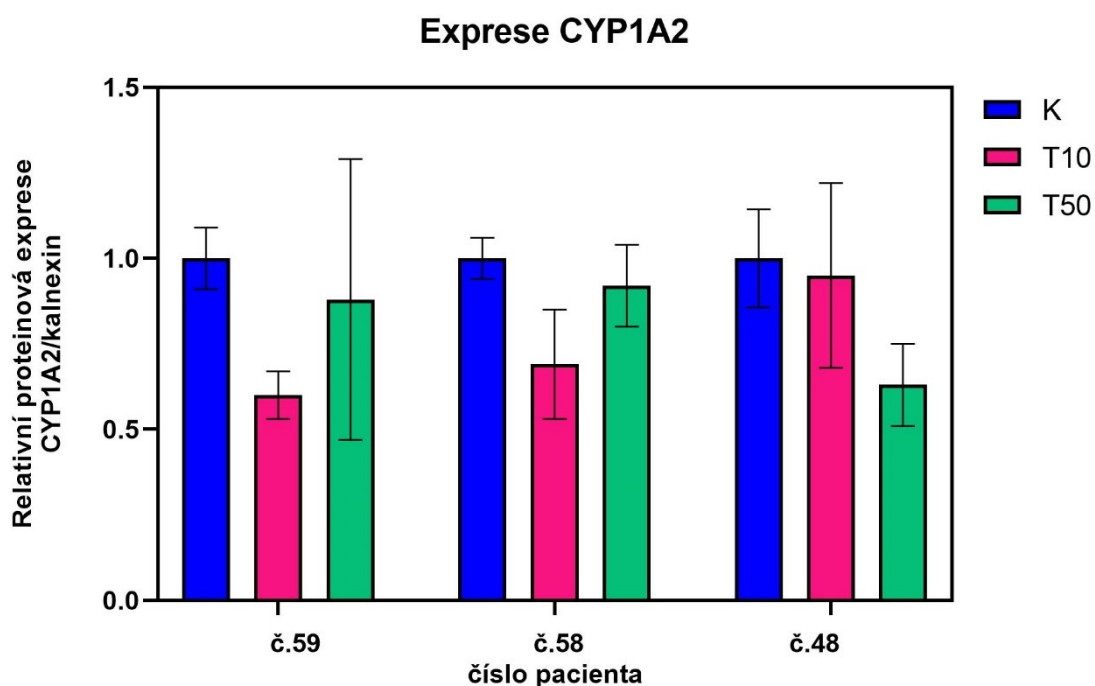
Naskenované membrány získané pomocí přístroje Uvitec byly dále vyhodnocovány v programu ImageJ, kde byly změřeny denzity jednotlivých bandů (proužků). Získané hodnoty denzit jednotlivých proužků enzymů byly vyděleny hodnotou denzity příslušného proužku kalnexinu. Kalnexin zde sloužil jako referenční protein pro normalizaci výsledků. Pro určení relativní proteinové exprese byly takto získané hodnoty ovlivněných vzorků vztaženy k hodnotám kontrolních vzorků (=1).



Obrázek 13. Ukázka blotu z měření CYP3A4 u pacienta č. 59

5.2.1. Vliv thujonu na množství proteinu CYP1A2

Obrázek 14 zobrazuje ovlivnění proteinové exprese u tří pacientů po inkubaci jaterních řezů s thujonem. Po inkubaci s 10 μM thujonem, ani s 50 μM thujonem nebyla pozorována statisticky významná změna množství proteinu oproti kontrole. U pacienta číslo 59 a pacienta číslo 58 si lze všimnout snížení množství proteinu po inkubaci s 10 μM thujonem (o 40 % u pacienta č.59, o 31 % u pacienta č.58), hodnoty ale nejsou statisticky významné.

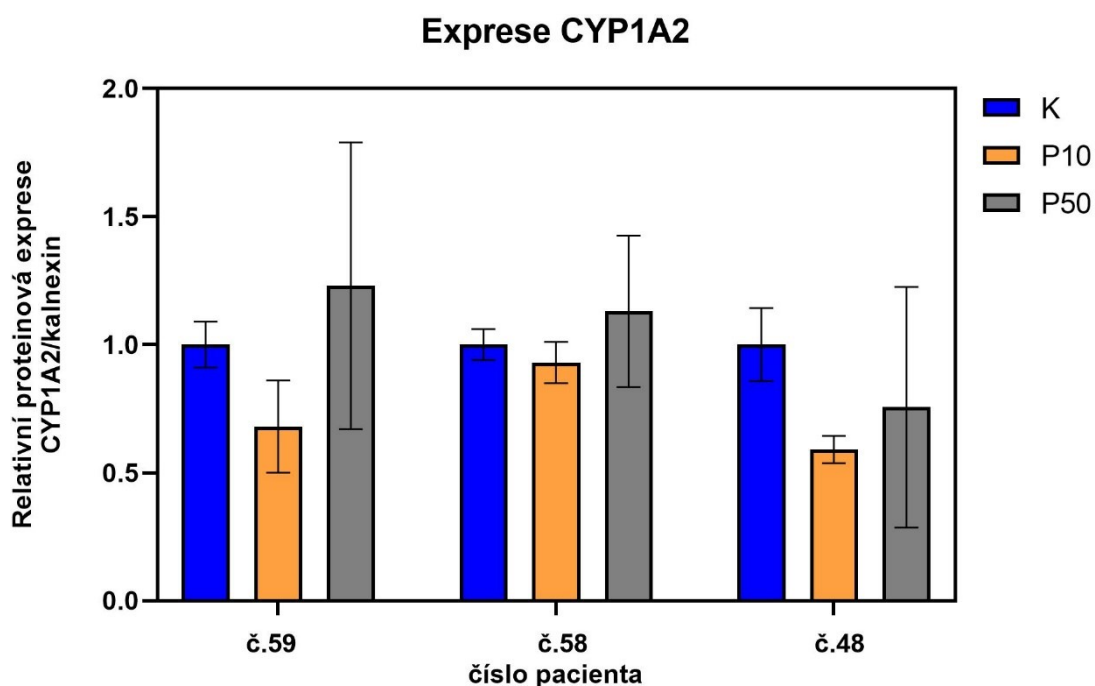


Obrázek 14. Vliv thujonu na množství proteinu CYP1A2. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s thujonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (T10, T50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze dvou měření. K měření byly použity směsné vzorky ze tří řezů téhož pacienta.

5.2.2. Vliv piperitonu na množství proteinu CYP1A2

Množství enzymu CYP1A2 po inkubaci s piperitonem (10 μM , 50 μM) ilustruje graf na obrázku 15.

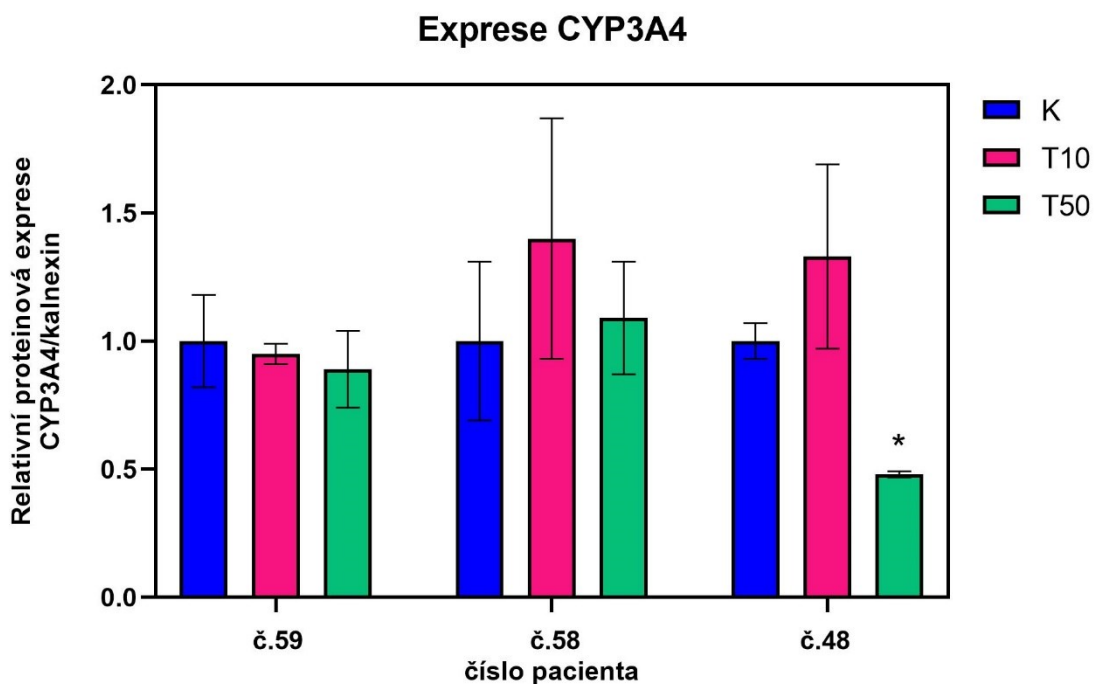
Piperiton neměl na proteinovou expresi CYP1A2 žádný statisticky významný vliv. Výsledky jsou navíc zatíženy vyšší směrodatnou odchylkou. Nevýznamné snížení exprese lze vidět u pacienta č. 48 a č.59 po inkubaci s 10 μM piperitonem.



Obrázek 15. Vliv piperitonu na množství proteinu CYP1A2. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (P10, P50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze dvou měření. K měření byly použity směsné vzorky ze tří řezů téhož pacienta.

5.2.3. Vliv thujonu na množství proteinu CYP3A4

Účinek thujonu na množství proteinu CYP3A4 znázorňuje Obrázek 16. Statisticky významný vliv na množství proteinu je možno vidět pouze u pacienta č. 48. 50 μM thujon snížil proteinovou expresi enzymu u pacienta č. 48 o 51,7 % oproti kontrole. Tento vliv ale nebyl pozorován u zbylých dvou pacientů.

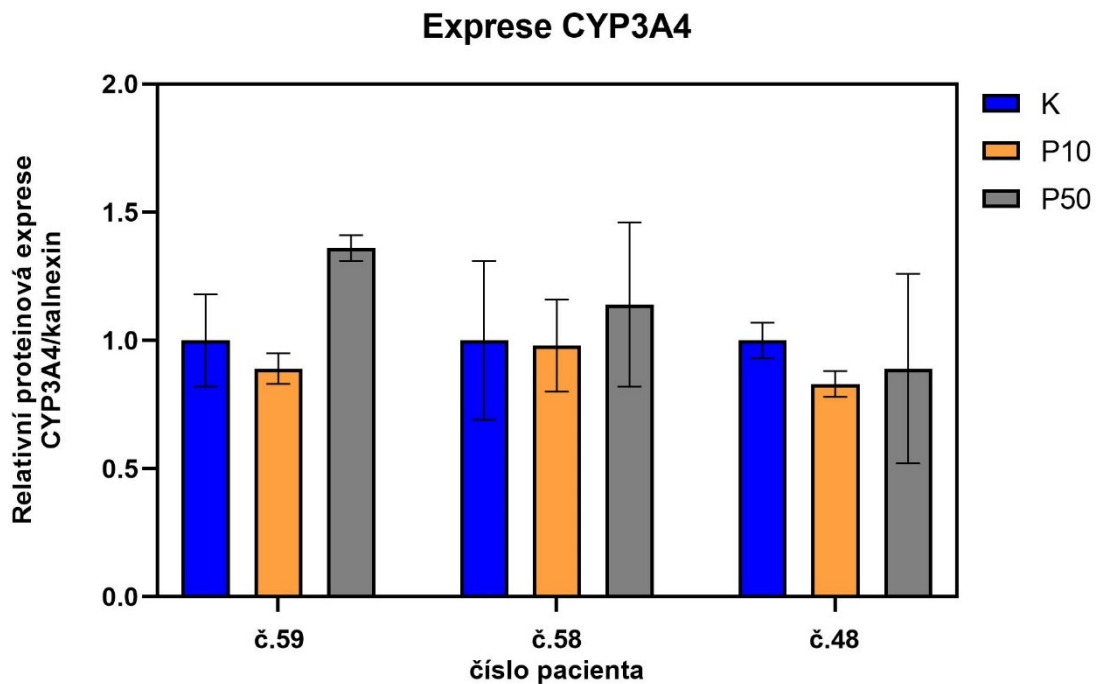


Obrázek 16. Vliv thujonu na množství proteinu CYP3A4. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s thujonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (T10, T50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze dvou měření. K měření byly použity směsné vzorky ze tří řezů téhož pacienta. * označuje statisticky významnou změnu oproti kontrole (one-way ANOVA s Dunnettovým testem, $p < 0,05$).

5.2.4. Vliv piperitonu na množství proteinu CYP3A4

Změny v proteinové expresi CYP3A4 po 24hodinové inkubaci jaterních řezů s piperitonem (10 μM , 50 μM) popisuje graf na Obrázku 17.

Z grafu je zřejmé, že nedošlo k žádným statisticky významným změnám v množství proteinu CYP3A4 oproti kontrole. U pacienta číslo 59 můžeme vidět statisticky nevýznamnou indukci (o 36 % oproti kontrole) po inkubaci s piperitonem o koncentraci 50 μM .



Obrázek 17. Vliv piperitonu na množství proteinu CYP3A4. Ultratenké jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem o koncentracích 10 μM a 50 μM (P10, P50) po dobu 24 h. Sloupec představuje průměr ze dvou měření. K měření byly použity směsné vzorky ze tří řezů téhož pacienta.

6. DISKUZE

Rostliny jsou zdrojem širokého spektra strukturně rozmanitých chemických látek majících význam nejen pro samotnou rostlinu, ale i pro člověka. Jde o sekundární metabolity, mezi které řadíme například alkaloidy, třísloviny, terpeny, flavonoidy, saponiny nebo kumariny. Využívání rostlin jako prostředku k léčení nemocí či mírnění symptomů je spojeno již se samotnými počátky léčitelství a rostlinné přípravky či doplňky stravy s rostlinnými látkami jsou používány i v současnosti. U některých byly identifikovány účinné látky i jejich mechanismus působení, u jiných se předpokládá, že za účinkem stojí synergismus látek v rostlině, extraktu či silici. Rostlinné látky se také hojně využívají v potravinářském průmyslu, při výrobě kosmetiky, pigmentů či parfémů.

Sekundární metabolity rostlin jsou pro lidský organismus xenobiotiky, proto podléhají detoxifikaci pomocí intestinálních a jaterních biotransformačních enzymů metabolizujících xenobiotika (Gurley 2012).

Námi testované látky, thujon a piperiton, patří do skupiny monoterpenů. Monoterpeny jsou součástí rostlinných silic, podílí se na vůni a obraných mechanismech rostliny. Uplatňují se v potravinářství jako aromata a dochucovadla, v parfumerii nebo jako rozpouštědla. U některých byly popsány účinky antikancerogenní, insekticidní, antibakteriální, antioxidační nebo antifungální (Wojtunik-Kulesza a kol. 2019).

Ne všechny účinky jsou ale pozitivní. U některých monoterpenů byla potvrzena hepatotoxicita. Příkladem je R-pulegon, monoterpen charakteru ketonu, který je ve významném množství přítomen v *Mentha pulegium*. Nadměrné používání přípravků z této rostliny je spojeno s jaterním poškozením u lidí. Hepatotoxicita R-pulegonu byla potvrzena i na myších a potkaních modelech. Jako další hepatotoxickou složkou silice *Mentha pulegium* byl identifikován i monoterpen menthofuran. Dokumentovány byly rovněž hepatotoxické účinky monoterpenu kafru (Zárybnický a kol. 2018).

Monoterpeny mohou mít vliv na aktivitu a expresi biotransformačních enzymů. Myristicin indukoval CYP1A2 v potkaních jaterních mikrozomech, cedrol a β -cedren inhibovaly aktivitu CYP3A4 v lidských jaterních mikrozomech a například chamazulen je inhibitorem CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4 (Zehetner a kol. 2019).

Je to právě vliv rostlinných látek na biotransformační enzymy, který může být potenciálním zdrojem interakcí užívaných léků s rostlinnými přípravky, doplňky stravy nebo složkami potravy. Znalost ovlivnění biotransformačních enzymů těmito látkami je tedy důležitá proto, abychom se mohli těmito nežádoucími interakcemi vyhnout.

V této diplomové práci jsem se věnovala vlivu thujonu a piperitonu na expresi vybraných biotransformačních enzymů. Ultratenké jaterní řezy získané z lidské tkáně byly inkubovány s piperitonem (10 μM a 50 μM) a thujonem (10 μM a 50 μM) 24 hodin při teplotě 37 °C. Použita byla jaterní tkáň získaná po provedené částečné hepatektomii u pacientů obou pohlaví ve věkovém rozmezí 42-76 let.

Pro určení relativní exprese na úrovni mRNA enzymů CYP1A2, CYP3A4, UGT1A6, UGT1A9 a SULT1A byla použita metoda rt-PCR spojená s reverzní transkripcí. Změny v množství proteinu byly studovány u enzymů CYP1A2 a CYP3A4. Použitou metodou byla elektroforéza na polyakrylamidovém gelu a Western blot s následnou chemiluminiscenční detekcí vybraných proteinů. Relativní proteinová exprese byla vztahována ke kalnexinu.

Zvýšení genové exprese UGT1A9, které bylo vyhodnoceno jako statisticky významné, bylo pozorováno u vzorků inkubovaných s 50 μM piperitonem u pacienta č. 48. Toto zvýšení ale nebylo pozorováno u pacienta č. 58. Výsledek je navíc kvůli vyšší směrodatné odchylce nepřesný.

Piperiton v koncentraci 50 μM rovněž zvýšil expresi mRNA SULT1A. Výsledek byl ovšem zatížen vysokou směrodatnou odchylkou naznačující velké rozdíly mezi jednotlivými měřeními a nelze vyloučit chybu v měření. Piperiton v obou zkoušených koncentracích signifikantně zvyšoval množství mRNA CYP1A2 u pacienta č. 58, avšak nikoliv u pacienta č. 48. Významné zvýšení exprese mRNA CYP3A4 bylo zaznamenáno u pacienta č. 58 po inkubaci s piperitonem o koncentraci 50 μM .

Thujon v koncentraci 50 μM zvýšil expresi CYP1A2 u pacienta č. 58. Při určování změn v genové expresi CYP3A4 zvýšil thujon o koncentraci 50 μM expresi u pacienta č. 58.

Při hodnocení změn proteinové exprese CYP1A2 a CYP3A4 nevykazoval piperiton žádný signifikantní vliv.

Thujon o koncentraci 50 μM snížil množství proteinu CYP3A4 o 51,7 % u pacienta č. 48. U ostatních dvou pacientů tyto změny pozorovány nebyly.

Jiné studie, zabývající se vlivem thujonu a piperitonu na expresi mRNA a množství proteinu biotransformačních enzymů, nebyly provedeny a není možné tedy výsledky porovnat.

Abass a kol. (2010) studovali vliv α -thujonu na biotransformační enzymy. Nesledovali však expresi mRNA a proteinů, ale enzymovou aktivitu. Thujon vykazoval

střední inhibici CYP2A6 a CYP2B6. Měl zanedbatelný nebo žádný vliv na aktivitu CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2C8.

Studie ovlivnění proteinové exprese a exprese mRNA biotransformačních enzymů chybí i pro další monoterpenické ketony strukturně příbuzné piperitonu a thujonu, jako je například karvon, fenchon, pulegon, piperitenon nebo menthon. Kafr, bicyklický monoterpen charakteru ketonu, zvyšoval expresi proteinu CYP3A4 v ultratenkých lidských jaterních řezech po 24hodinové inkubaci. Expresi mRNA zvýšil (-)-kafr u CYP3A4 a UGT1A6, ovšem pouze u jednoho pacienta ze tří. Bylo zaznamenáno snížení exprese mRNA SUL1A1 (Smolíková, 2021).

Při vyhodnocování výsledků této práce byla pozorována variabilita proteinové a mRNA exprese mezi jednotlivými pacienty. Tyto interindividuální rozdíly mohou být podmíněny řadou různých faktorů. Například je to existence genetických variant jaderných receptorů a jiných transkripčních faktorů, variabilita v expresi membránových transportérů, genetický polymorfismus genů pro biotransformační enzymy, přítomná onemocnění, věk, pohlaví nebo stav samotného vzorku jater, ze kterého byly získány ultratenké řezy. Dále to mohou být i epigenetické regulační faktory, například regulace pomocí mikroRNA, nebo DNA-methylace (Tang a kol. 2005, Skálová a kol. 2017).

Jednou z limitací této práce je malý počet vzorků lidských jater (dva pacienti pro stanovení exprese mRNA a tři pacienti pro stanovení množství proteinu) a obecně větší variabilita mezi měřeními. V další studii by bylo vhodné použít řezy od více dárců a ve větším počtu replikátů.

7. ZÁVĚR

Výsledky experimentální části mohou být shrnuty do následujících bodů:

- Připravené ultratenké jaterní řezy byly inkubovány 24 hodin s thujonem nebo piperitonem o koncentracích 10 μM a 50 μM .
- Změny v množství mRNA byly studovány u UGT1A6, UGT1A9, SULT1A, CYP3A4, CYP1A2. Ke zvýšení exprese CYP1A2 došlo u pacienta č. 58 vlivem 10 μM a 50 μM piperitonu i 50 μM thujonu. 50 μM piperiton zvyšoval expresi UGT1A9 u pacienta č. 48. Indukce CYP3A4 byla pozorována u pacienta č. 58 po inkubaci s 50 μM thujonem a 50 μM piperitonem.
- Metodou Western blotu s chemiluminiscenční detekcí byl stanoven vliv piperitonu a thujonu (10 μM a 50 μM) na množství proteinu CYP1A2 a CYP3A4 u tří pacientů. K jediné statisticky významné změně došlo u pacienta č. 48, kde thujon o koncentraci 50 μM snížil expresi proteinu CYP3A4.

Z výsledků lze usuzovat, že u množství thujonu a piperitonu běžně se vyskytujícího v potravě nebo rostlinných přípravcích, je vznik klinicky významných interakcí na podkladě indukce či inhibice biotransformačních enzymů nepravděpodobný.

8. SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky
ALD	alkoholické poškození jater
APS	peroxodisíran amonný
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CAR	konstitutivní androstanový receptor
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom P450
DEPC	diethylpyrokarbonát
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraoctová kyselina
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicines Agency)
FXR	farnesoidní X-receptor
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GR	glukokortikoidní receptor
HSP	heat shock protein
IPP	isopentenyldifosfát
LXR	liver X receptor
MEP	2-methyl-D-erythritol-4-fosfát
mRNA	mediátorová RNA („messenger RNA“)
MRP2	„multidrug resistance-associated protein 2“
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NRF2	„nuclear factor erythroid 2-related factor 2“
NTC	kontrola bez templátové cDNA („non-template control“)
PPAR	receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomů
PXR	pregnanový X-receptor
ROS	reaktivní kyslíkové radikály („reactive oxygen species“)

ROR	„retinoid-related orphan receptor“
RT	reverzní transkriptasa
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
SDS	dodecylsíran sodný
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
SULT	sulfotransferasa
TBST	„Tris buffered saline with Tween“
TEMED	tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
VDR	receptor vitaminu D

9. LITERATURA

Abass, K., P. Reponen, S. Mattila a O. Pelkonen. Metabolism of α -thujone in human hepatic preparations in vitro: Site Specificity and Species Differences in Cytochrome P450 Oxidation in Vitro and in Vivo. *Xenobiotica*. 2010, 41(2), 101-111. ISSN 0049-8254. DOI:10.3109/00498254.2010.528066

Abdelgaleil, S. A.M., M. A. Abbassy, A. H. Belal a M. A.A. Abdel Rasoul. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. *Bioresource Technology*. 2008, 99(13), 5947-5950. ISSN 09608524. DOI:10.1016/j.biortech.2007.10.043

Adams, G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*. 2020, 42(3), 48-53. ISSN 0954-982X. DOI:10.1042/BIO20200034

Andersson, T. B., K. P. Kanebratt a J. G. Kenna. The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*,. 2012, 8(7), 909-920. DOI:10.1517/17425255.2012.685159

Andria, B., A. Bracco, G. Cirino a R. A. F. M. Chamuleau. Liver Cell Culture Devices. *Cell Medicine*. 2010, 1(1), 55-70. ISSN 2155-1790. DOI:10.3727/215517910X519274

Ashour, M., M. Wink a J. Gershenzon. Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010, 258-303. ISBN 9781444320503. DOI:10.1002/9781444320503.ch5

Bell, C. C., D. F. G. Hendriks, S. M. L. Moro, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). ISSN 2045-2322. DOI:10.1038/srep25187

Bhatia, S. N., U. J. Balis, M. L. Yarmush a M. Toner. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *The FASEB Journal*. 1999, 13(14), 1883-1900. ISSN 0892-6638. DOI:10.1096/fasebj.13.14.1883

Breitmaier, E. *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. ISBN 978-3-527-31786-8.

Burbott, A. J., W.C. Johnson a W.D. Loomis. Configuration of piperitone from oil of *Mentha piperita*. *Phytochemistry*. 1983, 22(10), 2227-2230. ISSN 0031-9422. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80152-1

Burkhardt, B., J. J. Martinez-Sanchez, A. Bachmann, R. Ladurner A A. K. Nüssler. Long-term culture of primary hepatocytes: new matrices and microfluidic devices. *Hepatology International*. 2014, 8(1), 14-22. ISSN 1936-0533. DOI:10.1007/s12072-013-9487-3

Cook, D.J., J.D. Finnigan, K. Cook, G.W. Black A S.J. Charnock. Cytochromes P450. Insights into enzyme mechanisms and functions from experimental and computational methods. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2016, 105, 105-126. ISSN 1876-1623. DOI:10.1016/bs.apcsb.2016.07.003

Daniels, J. a S. Kadlubar. Pharmacogenetics of SULT1A1. *Pharmacogenomics*. 2014, 15(14), 1823-1838. ISSN 1462-2416. DOI:10.2217/pgs.14.134

De Bruyn, T, S Chatterjee, S Fattah, J Keemink, J Nicolai, P Augustijns a P Annaert. Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2013, 9(5), 589-616. DOI:10.1517/17425255.2013.773973

Delgado, G. a M. Y. Ríos. Monoterpenes from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry*. 1991, 30(9), 3129-3131. ISSN 0031-9422. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)98268-2

Dewyse, L., H. Reynaert a L. A. Van Grunsven. Best Practices and Progress in Precision-Cut Liver Slice Cultures. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(13). ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms22137137

Donato, M. T., L. Tolosa a M. J. Gómez-Lechón. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. New York, NY: Springer New York, 2015, 77-93. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-2073-0. DOI:10.1007/978-1-4939-2074-7_5

Duffel, M.W. Sulfotransferases. *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, 2018, 407-428. ISBN 9780081006016. DOI:10.1016/B978-0-12-801238-3.95623-X

Dvořáková M, Valterová I, Vaněk T (2011) Monoterpeny v rostlinách. *Chemické Listy*. 2011, 105(11), 839-845.

Elaut, G., T. Vanhaecke, Y. V. Heyden a V. Rogiers. Spontaneous apoptosis, necrosis, energy status, glutathione levels and biotransformation capacities of isolated rat hepatocytes in suspension: Effect of the incubation medium. *Biochemical Pharmacology*. 2005, 69(12), 1829-1838. ISSN 00062952. DOI:10.1016/j.bcp.2005.03.020

Elkayam, T., S. Amitay-Shaprut, M. Dvir-Ginzberg, T. Harel a S. Cohen. Enhancing the Drug Metabolism Activities of C3A— A Human Hepatocyte Cell Line—By Tissue Engineering Within Alginate Scaffolds. *Tissue Engineering*. 2006, 12(5), 1357-1368. ISSN 1076-3279. DOI:10.1089/ten.2006.12.1357

European Union herbal monograph on *Artemisia absinthium* L., herba: EMA/HMPC/751490/2016 Corr. 1. [online]. Amsterdam, The Netherlands: European Medicines Agency, 2020 [cit. 2021-11-28]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-artemisia-absinthium-l-herba-revision-1_en.pdf

European Union herbal monograph on *Salvia officinalis* L., folium: EMA/HMPC/277152/2015. [online]. London, United Kingdom: European Medicines Agency, 2016 [cit. 2021-11-28]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-salvia-officinalis-l-folium-revision-1_en.pdf

Fraczek, J., J. Bolleyn, T. Vanhaecke, V. Rogiers a M. Vinken. Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. *Archives of Toxicology*. 2013, 87(4), 577-610. ISSN 0340-5761. DOI:10.1007/s00204-012-0983-3

Fretland, A. a M. Monshouwer. Enzyme Induction: Translating Multiple Approaches, Assays, Endpoints, and Opinions into a Valuable Induction Screening Strategy. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2010, 13(2), 135-144. ISSN 13862073. DOI:10.2174/138620710790596727

Gaskell, H., P. Sharma, H. E. Colley, C. Murdoch, D. P. Williams a S. D. Webb. Characterization of a functional C3A liver spheroid model. *Toxicology Research*. 2016, 5(4), 1053-1065. ISSN 2045-452X. DOI:10.1039/C6TX00101G

Godoy, P., N. J. Hewitt, U. Albrecht, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of Toxicology*. 2013, 87(8), 1315-1530. ISSN 0340-5761. DOI:10.1007/s00204-013-1078-5

Gómez-Lechón, M J., L. Tolosa, I. Conde a M T. Donato. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2014, 10(11), 1553-1568. ISSN 1742-5255. DOI:10.1517/17425255.2014.967680

Graaf, I. Am de, G. Mm Groothuis a P. Olinga. Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2007, 3(6), 879-898. ISSN 1742-5255. DOI:10.1517/17425255.3.6.879

Graaf, I. Am de, P. Olinga, M. H De Jager, M. T Merema, R. De Kanter, E. G Van de Kerkhof a G. 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. ISSN 1754-2189. DOI:10.1038/nprot.2010.111

Gunes, A. a M. Dahl. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics*. 2008, 9(5), 625-637. ISSN 1462-2416. DOI:10.2217/14622416.9.5.625

Gurley, B. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions (Part 1): origins, mechanisms, and the impact of botanical dietary supplements. *Planta Medica*. 2012, 78(13), 1478-1489. ISSN 0032-0943. DOI:10.1055/s-0031-1298273

Hempel, N., N. Gamage, J. L. Martin a M. E. Mcmanus. Human cytosolic sulfotransferase SULT1A1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007, 39(4), 685-689. ISSN 13572725. DOI:10.1016/j.biocel.2006.10.002

Höld, K. M., N. S. Sirisoma, T. Ikeda, T. Narahashi a J. E. Casida. Alpha -Thujone (the active component of absinthe): gamma -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97(8), 3826-3831. ISSN 0027-8424. DOI:10.1073/pnas.070042397

Höld, K. M., N. S. Sirisoma a J. E. Casida. Detoxification of α - and β -thujones (the active ingredients of absinthe): site specificity and species differences in cytochrome P450 Oxidation in Vitro and in Vivo. *Chemical Research in Toxicology*. 2001, 14(5), 589-595. ISSN 0893-228X. DOI:10.1021/tx000242c

Ingelman-Sundberg, M. a V. M. Lauschke. 3D human liver spheroids for translational pharmacology and toxicology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2021. ISSN 1742-7835. DOI:10.1111/bcpt.13587

Iraji, A., S. Yazdanpanah, F. Alizadeh, S. Mirzamohammadi, Y. Ghasemi, K. Pakshir, Y. Yang a K. Zomorodian. Screening the antifungal activities of monoterpenes and their isomers against *Candida* species. *Journal of Applied Microbiology*. 2020, 129(6), 1541-1551. ISSN 1364-5072. DOI:10.1111/jam.14740

James, M. O. a S. Ambadapadi. Interactions of cytosolic sulfotransferases with xenobiotics. *Drug Metabolism Reviews*. 2013, 45(4), 401-414. ISSN 0360-2532. DOI:10.3109/03602532.2013.835613

Jančová, P., P. Anzenbacher a E. Anzenbacherová. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers*. 2010, 154(2), 103-116. DOI:10.5507/bp.2010.017

KAMMERER, S. Three-dimensional liver culture systems to maintain primary hepatic properties for toxicological analysis in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(19). ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms221910214

Ketoh, G. K., H. K. Koumaglo, I. A. Glitho a J. Huignard. Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia*. 2006, 77(7-8), 506-510. ISSN 0367326X. DOI:10.1016/j.fitote.2006.05.031

Kiang, T, M Ensom a T Chang. *UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions*. 2005, 106(1), 97-132. ISSN 01637258. DOI:10.1016/j.pharmthera.2004.10.013

Kousalová, L., J. Baranová a P. Anzenbacher. Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klin Farmakol Farm*. 2003, 17(3), 151–157

- Krishnaswamy, S., Q. Hao, A. Al-Rohaimi, L. M. Hesse, L. L. Von Moltke, D. J. Greenblatt a M. H. Court. UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 pharmacogenetics: ii. functional impact of the three most common nonsynonymous UGT1A6 polymorphisms (S7A, T181A, and R184S). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005, 313(3), 1340-1346. ISSN 0022-3565. DOI:10.1124/jpet.104.081968
- Kwon, Y., Sangyun Shin a Y.-J. Chun. Biological roles of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1 enzymes. *Archives of Pharmacal Research*. 2021, 44(1), 63-83. ISSN 0253-6269. DOI:10.1007/s12272-021-01306-w
- Lake, B. G. a R. J. Price. Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica*. 2012, 43(1), 41-53. ISSN 0049-8254. DOI:10.3109/00498254.2012.734643
- Lecluyse, E. L. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001, 13(4), 343-368. ISSN 09280987. DOI:10.1016/S0928-0987(01)00135-X
- Ledvina, M., A. Stoklasová a J. Cerman. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009, 49-52. ISBN 978-80-246-1416-8.
- Lee, J., H. Park, W. Lim a G. Song. Therapeutic potential of α,β -thujone through metabolic reprogramming and caspase-dependent apoptosis in ovarian cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2020, 236(2), 1545-1558. ISSN 0021-9541. DOI:10.1002/jcp.30086
- Lerche-Langrand, C. a H. J. Toutain. Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology*. 2000, 153(1-3), 221-253. ISSN 0300483X. DOI:10.1016/S0300-483X(00)00316-4
- Ludwiczuk, A., K. Skalicka-Woźniak a M.I. Georgiev. Terpenoids. *Pharmacognosy*. Elsevier, 2017, 233-266. ISBN 9780128021040. DOI:10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1
- Manikandan, P. a S. Nagini. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Current Drug Targets*. 2018, 19(1). ISSN 13894501. DOI:10.2174/1389450118666170125144557

Meech, R., D. G. Hu, R. A. Mckinnon, S. N. Mubarakah, Alex Z. Haines, Pramod C. Nair, Andrew Rowland a Peter I. Mackenzie. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily: new members, new functions, and novel paradigms. *Physiological Reviews*. 2019, 99(2), 1153-1222. ISSN 0031-9333. DOI:10.1152/physrev.00058.2017

Mizoi, K., H. Arakawa, K. Yano, S. Koyama, H. Kojima a T. Ogihara. Utility of three-dimensional cultures of primary human hepatocytes (spheroids) as pharmacokinetic models. *Biomedicines*. 2020, 8(10). ISSN 2227-9059. DOI:10.3390/biomedicines8100374

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1334/2008 ze dne 16. prosince 2008 o aromatech a některých složkách potravin s aromatickými vlastnostmi pro použití v potravinách nebo na jejich povrchu a o změně nařízení Rady (EHS) č. 1601/91, nařízení (ES) č. 2232/96 a č. 110/2008 a směrnice 2000/13/ES. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:02008R1334-20211124>

Nebert, D. W a D. W Russell. Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*. 2002, 360(9340), 1155-1162. ISSN 01406736. DOI:10.1016/S0140-6736(02)11203-7

Nolan, T., R. E Hands a S. A Bustin. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. 2006, 1(3), 1559-1582. ISSN 1754-2189. DOI:10.1038/nprot.2006.236

Palma, E., E. J. Doornebal a S. Chokshi. Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepatology International*. 2019, 13(1), 51-57. ISSN 1936-0533. DOI:10.1007/s12072-018-9913-7

Park, K. S., D. H. Sohn, R. L. Veech a B. J. Song. Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*. 1993, 248(1), 7-14. ISSN 09266917. DOI:10.1016/0926-6917(93)90019-M

Philips, M. A. a M. R. Concepción. Terpenoids: Lower. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, 2010. DOI:10.1002/9780470015902.a0001915.pub2

Price, R. J., S. E. Ball, A. B. Renwick, P. T. Barton, J. A. Beaman a B. G. Lake. Use of precision-cut rat liver slices for studies of xenobiotic metabolism and toxicity: comparison of the Krumdieck and Brendel tissue slicers. *Xenobiotica*. 2008, 28(4), 361-371. ISSN 0049-8254. DOI:10.1080/004982598239470

PubChem Compound Summary for CID 6987: Piperitone | C₁₀H₁₆O - PubChem. *PubChem* [online]. Bethesda, MD, USA: National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information, 2004- [cit. 2021-7-9]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/PIPERITONE>

Public statement on the use of herbal medicinal products containing thujone: EMA/HMPC/732886/2010 Rev.1. [online]. London, United Kingdom: European Medicines Agency, 2012 [cit. 2021-11-28]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/public-statement-use-herbal-medicinal-products-containing-thujone-revision-1_en.pdf

Pudełek, M., J. Catapano, P. Kochanowski, K. Mrowiec, N. Janik-Olchawa, J. Czyż a D. Ryszawy. Therapeutic potential of monoterpene α -thujone, the main compound of *Thuja occidentalis* L. essential oil, against malignant glioblastoma multiforme cells in vitro. *Fitoterapia*. 2019, 134, 172-181. ISSN 0367326X. DOI:10.1016/j.fitote.2019.02.020

Radulović, N. S., M. S. Genčić, N. M. Stojanović, P. J. Randjelović, Z. Z. Stojanović-Radić a N. I. Stojiljković. Toxic essential oils. Part V: Behaviour modulating and toxic properties of thujones and thujone-containing essential oils of *Salvia officinalis* L., *Artemisia absinthium* L., *Thuja occidentalis* L. and *Tanacetum vulgare* L. *Food and Chemical Toxicology*. 2017, 105, 355-369. ISSN 02786915. DOI:10.1016/j.fct.2017.04.044

Ramboer, E., T. Vanhaecke, V. Rogiers a M. Vinken. Primary hepatocyte cultures as prominent in vitro tools to study hepatic drug transporters. *Drug Metabolism Reviews*. 2013, 45(2), 196-217. DOI:10.3109/03602532.2012.756010

Richert, L., M. J. Liguori, C. Abadie, B. Heyd, G. Manton, N. Halkic a J. F. Waring. Gene expression in human hepatocytes in suspension after isolation is similar to the liver of origin, is not affected by hepatocyte cold storage and cryopreservation, but is strongly changed after hepatocyte plating. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006, 34(5), 870-879. ISSN 0090-9556. DOI:10.1124/dmd.105.007708

Runge-Morris, M., T. A. Kocarek a C. N. Falany. Regulation of the cytosolic sulfotransferases by nuclear receptors. *Drug Metabolism Reviews*. 2013, 45(1), 15-33. ISSN 0360-2532. DOI:10.3109/03602532.2012.748794

Ruoß, M., M. VOSOUGH, A. KÖNIGSRAINER, et al. Towards improved hepatocyte cultures: Progress and limitations. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, 138. ISSN 02786915. DOI:10.1016/j.fct.2020.111188

Saleh, M., M. Belal a G. El-Baroty. Fungicidal activity of *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae). *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 2006, 41(3), 237-244. ISSN 0360-1234. DOI:10.1080/03601230500354774

Shahverdi, A. R., F. Rafii, F. Tavassoli, M. Bagheri, F. Attar a A. Ghahraman. Piperitone from *Mentha longifolia* var. *chorodictya* Rech F. reduces the nitrofurantoin resistance of strains of enterobacteriaceae. *Phytotherapy Research*. 2004, 18(11), 911-914. ISSN 0951-418X. DOI:10.1002/ptr.1566

Shankar, K. a H.M. Mehendale. Cytochrome P450. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2014, s. 1125-1127. ISBN 9780123864550. DOI:10.1016/B978-0-12-386454-3.00299-2

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

Skálová, L. Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 978-80-246-3733-4.

Smolíková, M.. Účinek isomerů kafry na expresi biotransformačních enzymů v lidských jaterních buňkách. Hradec Králové, 2021. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.

Soldatow, V. Y., E. L. Lecluyse, L. G. Griffith a I. Rusyn. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res*. 2013, 2(1), 23-39. ISSN 2045-452X. DOI:10.1039/C2TX20051A

Švihovec, J. Farmakologie. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

Tang, C., J. H. Lin a A. Y. H. Lu. Metabolism-based drug-drug interactions: what determines individual variability in cytochrome p450 induction? *Drug Metabolism and Disposition*. 2005, 33(5), 603-613. ISSN 0090-9556. DOI:10.1124/dmd.104.003236

Thijs, J. L., B. A. M. Van Der Geest, J. Van Der Schaft, et al. Predicting therapy response to mycophenolic acid using UGT1A9 genotyping: towards personalized medicine in

atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment*. 2016, 28(3), 242-245. ISSN 0954-6634. DOI:10.1080/09546634.2016.1227420

Timbrell, J. A. a T. C. Marrs. Biotransformation of Xenobiotics. *General, Applied and Systems Toxicology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2009. ISBN 9780470723272. DOI:10.1002/9780470744307

Tornio, A. a J. T. Backman. Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. *Pharmacogenetics*. Elsevier, 2018, 9(5), 3-32. *Advances in Pharmacology*. ISBN 9780128133811. ISSN 1462-2416. DOI: 10.1016/bs.apha.2018.04.007

Torres, A., Y. Vargas, D. Uribe, Et al. Pro-apoptotic and anti-angiogenic properties of the α / β -thujone fraction from *Thuja occidentalis* on glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*. 2016, 128(1), 9-19. ISSN 0167-594X. DOI:10.1007/s11060-016-2076-2

Vilas-Boas, V., A. Cooreman, E. Gijbels, et al. Primary hepatocytes and their cultures for the testing of drug-induced liver injury. *Drug-induced Liver Injury*. Elsevier, 2019, 1-30. *Advances in Pharmacology*. ISBN 9780128167595. DOI: 10.1016/bs.apha.2018.08.00

Vorriink, S. U., S. Ullah, S. Schmidt, J. Nandania, V. Velagapudi, O. Beck, M. Ingelman-Sundberg a V. M. Lauschke. Endogenous and xenobiotic metabolic stability of primary human hepatocytes in long-term 3D spheroid cultures revealed by a combination of targeted and untargeted metabolomics. *The FASEB Journal*. 2017, 31(6), 2696-2708. ISSN 0892-6638. DOI:10.1096/fj.201601375R

Bock, W., K. a C. Köhle. UDP-Glucuronosyltransferase 1A6: Structural, Functional, and Regulatory Aspects. *Phase II Conjugation Enzymes and Transport Systems*. Elsevier, 2005, 57-75. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780121828059. DOI:10.1016/S0076-6879(05)00004-2

Wang, G., W. Tang a R. R. Bidigare. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. *Natural Products*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005, 197-227. ISBN 978-1-58829-383-1. DOI:10.1007/978-1-59259-976-9_9

Wang, L. a M. James. Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics. *Current Drug Metabolism*. 2006, 7(1), 83-104. ISSN 13892002. DOI:10.2174/138920006774832596

Weikum, E. R., X. Liu a E. A. Ortlund. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science*. 2018, 27(11), 1876-1892. ISSN 09618368. DOI:10.1002/pro.3496

Williams, J. D., J. A. Yazarians, C. C. Almeyda, K. A. Anderson a G. R. Boyce. Detection of the previously unobserved stereoisomers of thujone in the essential oil and consumable products of Sage (*Salvia officinalis* L.) using headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, 64(21), 4319-4326. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01065

Wojtunik-Kulesza, K. A., K. Kasprzak, T. Oniszczyk a A. Oniszczyk. *Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent*. 2019, 16(12). ISSN 1612-1872. DOI:10.1002/cbdv.201900434

Xie, Y. a W. Xie. The Role of Sulfotransferases in Liver Diseases. *Drug Metabolism and Disposition*. 2020, 48(9), 742-749. ISSN 0090-9556. DOI:10.1124/dmd.120.000074

Yener, I., O. T. Olmez, M. Akdeniz, F. Tekin, N. Hasimi, M. H. Alkan, M. Ozturk a A. Ertaş. A detailed biological and chemical investigation of sixteen *Achillea* species' essential oils via chemometric approach. *Chemistry & Biodiversity*. 2020, 17(3), 1612-1872. ISSN 1612-1872. DOI:10.1002/cbdv.201900484

Németh, Z., É. a H. Thi Nguyen. Thujone, a widely debated volatile compound: What do we know about it? *Phytochemistry Reviews*. 2020, 19(2), 405-423. ISSN 1568-7767. DOI:10.1007/s11101-020-09671-y

Zanger, U. M. a M. 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. ISSN 01637258. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007

Zárybnický, T., I. Boušová, M. Ambrož a L. Skálová. Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Archives of Toxicology*. 2018, 92(1), 1-13. ISSN 0340-5761. DOI:10.1007/s00204-017-2062-2

Zehetner, P., M. Höferl a G. Buchbauer. Essential oil components and cytochrome P450 enzymes: a review. *Flavour and Fragrance Journal*. 2019, 34(4), 223-240. ISSN 0882-5734. DOI:10.1002/ffj.3496

Zhang, X., T. Jiang, D. Chen, Q. Wang a L. W. Zhang. Three-dimensional liver models: state of the art and their application for hepatotoxicity evaluation. *Critical Reviews in Toxicology*. 2020, 50(4), 279-309. ISSN 1040-8444. DOI:10.1080/10408444.2020.1756219

Zhou, S. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. *Current Drug Metabolism*. 2008, 9(4), 310-322. ISSN 13892002. DOI:10.2174/138920008784220664

Zhou, S., L. Yang, M. Wei, W. Duan a E. Chan. Insights into the structure, function, and regulation of human cytochrome P450 1A2. *Current Drug Metabolism*. 2009, 10(7), 713-729. ISSN 13892002. DOI:10.2174/138920009789895552

Zdroje obrázků:

Obr.1: Základní schéma biosyntézy terpenů o rostlin. Převzato z:

Ashour, M., M. Wink a J. Gershenzon. Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010, 258-303. ISBN 9781444320503. DOI: 10.1002/9781444320503.ch5

Obr.2: Piperiton. [cit. 2022-03-12]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/78/Piperitone.png>

Obr.3: Thujon. [cit. 2022-03-12]. Dostupné z:

<https://www.researchgate.net/publication/7059388/figure/fig3/AS:202672012566537@1425332181523/Structure-of-a-und-b-thujone-the-principal-components-of-wormwood-oil-Artemisia.png>

Obr.4: Brendel-Vitron kráječ. Převzato z:

Hays, A. M., R. C. Lantz a M. L. Witten. Correlation between in vivo and in vitro pulmonary responses to jet propulsion Fuel-8 using precision-cut lung slices and a dynamic organ culture system. *Toxicologic Pathology*. 2003, 31(2), 200-207. ISSN 0192-6233. DOI:10.1080/01926230390183689

Obr.5: Krumdieckův kráječ. Převzato z:

Olinga, P. a D. Schuppan. Precision-cut liver slices: A tool to model the liver ex vivo.

Journal of Hepatology. 2013, 58, 1252-1253.