

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

JATERNÍ ŘEZY – MODELOVÝ SYSTÉM PRO STUDIUM VLIVU
SESKVITERPENŮ NA DETOXIKAČNÍ ENZYMY

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Slavičková Zlata

„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 či stejného titulu.“

V Hradci Králové

Zlata Slavíčková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup při řešení dané práce. Zároveň bych chtěla poděkovat PharmDr. Kateřině Lněničkové, Ph.D. za velkou pomoc a rady v experimentální části práce. Děkuji také všem pracovníkům Katedry biochemických věd za příjemné pracovní prostředí.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Zlata Slavíčková

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Jaterní řezy – modelový systém pro studium vlivu seskviterpenů na detoxikační enzymy

Seskviterpeny se přirozeně vyskytují převážně ve vyšších rostlinách jako sekundární metabolity, společně s monoterpeny jsou hlavní součástí rostlinných silic. Seskviterpeny jsou biologicky aktivní sloučeniny, mezi jejich biologické vlastnosti patří protizánětlivý, protirakovinný, antioxidační, antibakteriální a antifungální účinek.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv tří strukturně podobných acyklických seskviterpenů *cis*-nerolidolu (CNER), *trans*-nerolidolu (TNER) a farnesolu (FAR) na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů – aldo-ketoreduktasa (AKR1A1 a AKR1C9), karbonylreduktasa 1 (CBR1), NAD(P)H-chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1), cytochrom P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B CYP3A), sulfotranferasa (SULT), glutathion-S-transferasa (GST), UDP-glukuronosyltransferasa (UGT) v játrech potkana. Vliv seskviterpenů na vybrané enzymy byl studován na ultratenkých precizních řezech o přibližné tloušťce 200-250 μm a průměru 8 mm. Tkáňové řezy byly získány z jater laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*, kmen *Wistar*). Jaterní řezy byly po dobu 8 a 24 hodin inkubovány v médiu, které obsahovalo testované látky v 10 μM koncentraci. Inkubace probíhala ve 12-jamkové destičce při 37 °C v atmosféře pneumoxidu. Řezy ovlivněné CNER vykazovaly po 24 hodinách inkubace zvýšení aktivity AKR1A1. Aktivita AKR1C v řezech ovlivněných FAR vykazovala pokles aktivity oproti kontrole po 8 hodinách inkubace. Řezy ovlivněné TNER vykazovaly pokles aktivity SULT po 8 hodinách a CYP2B/3A po 8 a 24 hodinách inkubace oproti kontrole. Statisticky významná změna aktivity nebyla pozorována u CBR1, NQO1 a GST. U isoform cytochromu P450 CYP1A1, CYP1A2 a konjugačního enzymu UGT nebyla aktivita vůbec detekována.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Zlata Slavíčková

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Liver slices – model system for studying the effect of sesquiterpenes on detoxifying enzymes

Sesquiterpenes are naturally occurring substances, mainly in higher plants as secondary metabolites. Together with monoterpenes, represent the main components of plant essential oils. Sesquiterpenes are biologically active compounds, among their biological activities belong anti-inflammatory, anti-carcinogenic, antioxidant, antibacterial and antimycotic effects.

The aim of this diploma thesis was to find out the influence of three structurally similar acyclic sesquiterpenes *cis*-nerolidol, *trans*-nerolidol, and farnesol on the activity of selected biotransformation enzymes – aldo-keto reductase (AKR1A1, AKR1C9), carbonyl reductase 1 (CBR1), NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1), cytochrome P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B, CYP3A), sulfotransferase (SULT), glutathione-S-transferase (GST), and UDP-glucuronosyltransferase (UGT) in rat liver. The influence of sesquiterpenes on selected enzymes was studied in precision-cut liver slices. The precision-cut tissue slices were obtained from rat liver (*Rattus norvegicus*, tribe *Wistar*). The thickness of the slices was approximately 200-250 μm and diameter 8 mm. The precision-cut liver slices were incubated for 8 and 24 hours in the medium containing the test substances in concentration 10 μM . The incubation was performed in a 12-well plate at 37 °C in the atmosphere of pneumoxide. The slices affected by CNER showed an increase in activity of AKR1A1 after 24 hours of incubation. AKR1C activity in slices affected by FAR showed a decrease in activity after 8 hours of incubation. TNER caused decrease in activity of SULT after 8 hours and inactivity of CYP2B/3A after 8 and 24 hours incubation. The activity of CBR1, NQO1, and GST in slices affected by the tested sesquiterpenes did not show any significant change in comparison to control. The activities of cytochrome P450 isoforms CYP1A1, CYP1A2, and conjugating enzyme UGT were not detected.

OBSAH

1	Úvod	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Tkáňové řezy	10
2.1.1	Využití tkáňových řezů	10
2.1.2	Izolace tkáně.....	11
2.1.3	Tloušťka	11
2.1.4	Tvar	12
2.1.5	Fyziologické izotonické médium	12
2.1.6	Jaterní tkáň	13
2.1.7	Preinkubace	13
2.1.8	Inkubace	14
2.1.8.1	Inkubace v destičkách	14
2.1.9	Homogenizace	14
2.2	Terpeny	15
2.2.1	Farnesol	16
2.2.2	Nerolidol.....	18
2.3	Biotransformace xenobiotik	21
2.3.1	První fáze biotransformace.....	21
2.3.1.1	Enzymy redukující karbonylovou skupinu.....	22
2.3.1.1.1	Aldo-ketoreduktasy	22
2.3.1.1.2	Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem.....	23
2.3.1.2	NAD(P)H-chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1).....	23
2.3.1.3	Cytochrom P450.....	24
2.3.1.3.1	Podrodina CYP1A.....	27
2.3.1.3.2	Podrodina CYP2B	27
2.3.1.3.3	Podrodina CYP3A.....	28

2.3.2	Druhá fáze biotransformace	29
2.3.2.1	Glutathion-S-transferasa (GST)	30
2.3.2.2	UDP-glukuronosyltransferasa (UGT)	31
2.3.2.3	Sulfottransferasy	31
2.4	Mezidruhové rozdíly	33
3	Cíl práce.....	35
4	Experimentální část	36
4.1	Materiál a chemikálie	36
4.1.1	Biologický materiál	36
4.1.2	Chemikálie.....	36
4.1.3	Použité přístroje.....	37
4.2	Pracovní postupy	38
4.2.1	Příprava Krebsova-Henseleitova pufru	38
4.2.2	Příprava inkubačního média.....	38
4.2.3	Příprava ultratenkých řezů z potkaních jater.....	39
4.2.4	Preinkubace a inkubace jaterních řezů	39
4.2.5	Odběr vzorků, homogenizace a příprava subcelulárních frakcí	39
4.2.6	Stanovení koncentrace proteinů	40
4.2.7	Příprava roztoků seskviterpenů	42
4.2.8	Stanovení aktivity aldehydoreduktasy AKR1A1	42
4.2.9	Stanovení aktivity aldoketoreduktasy AKR1C9	43
4.2.10	Stanovení aktivity karbonylreduktasy CBR1	45
4.2.11	Stanovení aktivity NAD(P)H: chinonoxidoreduktasy 1 (NQO1) ..	46
4.2.12	Stanovení aktivity isoform cytochromu P450	48
4.2.13	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy	50
4.2.14	Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy.....	51
4.2.15	Stanovení aktivity sulfottransferasy	53

5	Výsledky.....	56
5.1	BCA stanovení koncentrace proteinů.....	56
5.2	Ovlivnění aktivit biotransformačních enzymů seskviterpeny.....	57
5.2.1	Vliv seskviterpenů na aktivitu AKR1A1.....	57
5.2.2	Vliv seskviterpenů na aktivitu AKR1C9.....	58
5.2.3	Vliv seskviterpenů na aktivitu CBR1	59
5.2.4	Vliv seskviterpenů na aktivitu NQO1	60
5.2.5	Vliv seskviterpenů na aktivitu isoform cytochromu P450	61
5.2.6	Vliv seskviterpenů na aktivitu GST	62
5.2.7	Vliv seskviterpenů na aktivitu UGT.....	63
5.2.8	Vliv seskviterpenů na aktivitu SULT	64
6	Diskuze	66
7	Závěr.....	69
8	Seznam zkratk.....	70
9	Citovaná literatura	71

1 Úvod

Seskviterpeny jsou přírodní látky, které se vyskytují především v silicích vyšších rostlin. Jsou využívány v lidovém léčitelství, kosmetice, používají se také jako doplňky stravy. Jsou studovány hlavně pro jejich biologické vlastnosti, o jejich metabolismu, vlivu na metabolismus jiných současně podávaných látek (např. léčiv) a jejich toxicitě je známo málo informací.

Tato diplomová práce se zabývá studiem *cis*-nerolidolu, *trans*-nerolidolu, farnesolu a jejich vlivu na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů v ultratenkých jaterních řezech potkana. Sledována byla aktivita enzymů I. fáze biotransformace, aldo-keto reduktasy (AKR1A1, AKR1C9), karbonylreduktasy 1 (CBR1), NAD(P)H-chinonoxidoreduktasy 1 (NQO1), isoformem cytochromu P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B, CYP3A) a enzymů II. fáze biotransformace, sulfotransferasy (SULT), glutathion-S-transferasy (GST), UDP-glukuronosyltransferasy (UGT).

2 Teoretická část

2.1 Tkáňové řezy

Tkáňové řezy jsou široce používány jako *in vitro* model studovaného orgánu. Řezy jsou v podstatě životaschopné explantáty tkáně, které mohou být kultivovány *ex vivo*. Tkáňové řezy obsahují všechny typy buněk přítomných v daném orgánu *in vivo*, je zachována mezibuněčná a buněčná matrice, mezibuněčná komunikace a buněčná interakce. Řezy jsou užitečné pro studium biochemických funkcí, jako je endogenní metabolismus, biotransformace, jsou důležité i pro toxikologické studie a pro posouzení účinnosti léků (Bach a kol. 1996; de Graaf a kol. 2010). Příprava tkáňových řezů pro reprodukovatelné metabolické studie je zajištěna plně automatizovanými, přesnými a spolehlivými kráječi. C.L. Krumdieck navrhl plně automatizovaný mikrotom pro přípravu nepoškozených tkáňových řezů (Červenková a kol. 2001).



Obrázek 1 Krumdieck Tissue Slicer MD4000

2.1.1 Využití tkáňových řezů

V současné době se řezy tkáně používají hlavně ke studiu metabolismu přírodních a syntetických léčiv. Jaterní tkáň je nejvíce využívána, neboť se jedná o tkáň s nejvyšší metabolickou aktivitou. Tkáňové řezy se využívají i ke studiu orgánové fyziologie, ke studiu mezidruhových rozdílů nebo ke studiu inhibice/indukce biotransformačních enzymů. Slouží také ke sledování účinků parakrinních nebo autokrinních stimulů. Mohou být použity jak zdravé tkáně, tak nemocné. Studie s těmito řezy umožňují zkoumat metabolismus léků ve fyziologickém i patologickém prostředí. Tyto studie mohou poskytnout lepší přehled o změnách metabolismu léků. Řezy z nemocné tkáně mohou být využity také ve farmakologii ke studiu terapeutického

účinku léků na určitou chorobu. Nově se tkáňové řezy využívají v klinické praxi jako diagnostická technika používaná při transplantaci orgánů (Červenková a kol. 2001; de Graaf a kol. 2007; de Graaf a kol. 2010).

Výhody:

- Přítomny všechny typy buněk, které jsou typické pro danou tkáň
- Snížení počtu laboratorních zvířat pro výzkum
- Příprava řezů je relativně rychlá a snadná
- Tkáňové řezy lze získat z různých tkání
- Zachovaná struktura tkáně, mezibuněčná komunikace a interakce buněk

Nevýhody:

- Nízká životaschopnost řezů, řádově hodiny až dny
- Pokles hladiny biotransformačních enzymů v čase
- Finančně náročné
- Nutnost čerstvé tkáně (Bach a kol. 1996; Červenková a kol. 2001).

2.1.2 Izolace tkáně

Tkáň by měla být po získání použita co nejrychleji, aby byla čerstvá a byla zachována její životaschopnost. To znamená, že orgány by měly být co nejrychleji ochlazeny, aby nedošlo k ischemii. U malých orgánů není nutné proplachování izotonickým roztokem, u velkých orgánů je vhodné venózní proplachování izotonickým roztokem (de Graaf a kol. 2010).

2.1.3 Tloušťka

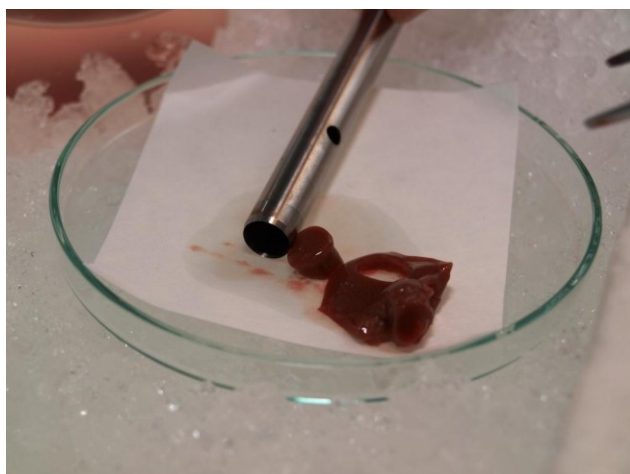
Mikrotom by měl být schopen tvořit řezy jednotné tloušťky v rozmezí přibližně 100-500 μm . Tloušťka řezů ovlivňuje jejich životaschopnost, optimální tloušťka zajišťuje spolu s vhodně provzdušněným médiem dostatečný přísun kyslíku ke všem buňkám. Pokud jsou řezy příliš tenké $< 100 \mu\text{m}$, dochází k poškození povrchu buněk a řezy se trhají. Naopak pokud jsou řezy příliš silné $> 500 \mu\text{m}$, může to vést k nekróze buněk ve středu řezu, protože difúzní vzdálenost pro živiny a kyslík je příliš dlouhá. Každá tkáň má různé požadavky na optimální tloušťku řezu (Tab. 1) (Bach a kol. 1996; de Graaf a kol. 2010; Krumdieck 2013).

Tab. 1: Optimální tloušťka precizních řezů různých tkání

Orgán	Optimální tloušťka (μm)
Játra	200 – 250
Ledvina	200 – 250
Srdce	250 – 350
Plíce	500 – 700
Slezina	200 – 350

2.1.4 Tvar

Mikrotom musí být schopen vytvořit řezy s jednotnou geometrií, řezy mají stejný tvar a rozměr. Pokud je zachována jednotná geometrie řezů, mohou být tyto řezy vzájemně porovnány bez potřeby další normalizace. Pro zachování geometrie řezu se vytváří válcovitá jádra, která jsou vykrojena z tkáně pomocí specifického tvořítka s daným průměrem. K dispozici jsou válečky o průměru 3, 5, 8, 10 a 15 mm. Vzniklé válečky tkáně by měly být uloženy na ledu a ponořené v izotonickém roztoku. Tkáňový váleček je poté vložen do otvoru stejného průměru v kráječci a je stlačen malým vyváženým pístem. Tkáň je kolmo nasměrovaná k čepeli kráječe, to zabezpečuje jednotný tvar a tloušťku tkáně. Správné řezy mají stejnou tloušťku, tvar, jednotnou barvu a mají hladký okraj (de Graaf a kol. 2010; Krumdieck 2013).

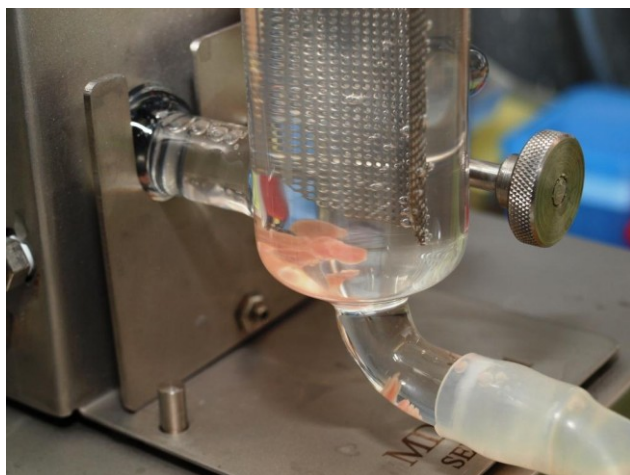


Obrázek 2 Válcovité jádro z tkáně vytvořené pomocí specifického tvořítka

2.1.5 Fyziologické izotonické médium

Pro zachování kvalitního tkáňového řezu je nezbytné fyziologické izotonické médium, které chrání řez před změnami tonicity a poskytuje mu dostatečnou lubrikaci.

Snižuje se riziko poškození tkáně během krájení. Vhodná teplota média je 2-4 °C, což minimalizuje hypoxické poškození tkáně. Fyziologické médium usnadňuje manipulaci s řezy, jemný proud média odnáší čerstvě vytvořené řezy do zásobní nádoby, nedochází k hromadění řezů v blízkosti ostří kráječe a řezy se nepoškodí (Krumdieck 2013).



Obrázek 3 Zásobní nádoba Krumdieck Tissue Slicer MD4000 s tkáňovými řezy

2.1.6 Jaterní tkáň

Játra jsou složená z více typů buněk. Hepatocyty zaujímají zhruba 80% objemu jater, tvoří však jen 60% frakce jaterních buněk. Zbývajících 40% se skládá z Kupfferových buněk (tkáňové buňky), jaterních stellátových buněk, endoteliálních buněk tvořících výstelku cév, biliárních epitelových buněk, fibroblastů, imunitních buněk a kmenových buněk. Všechny tyto buňky spolu navzájem komunikují. Játra savců představují hlavní orgán biotransformace xenobiotik. Pro studium účinků xenobiotik se jako *in vitro* systém využívají jaterní tkáňové řezy (de Graaf a kol. 2010).

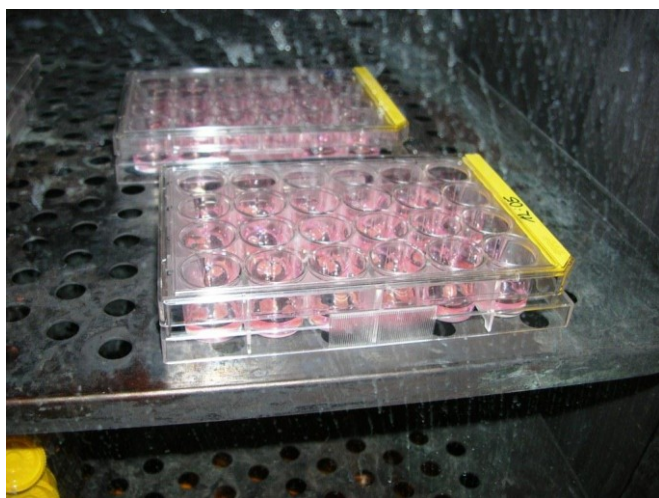
2.1.7 Preinkubace

Preinkubace je prováděna za stejných podmínek jako inkubace řezů v médiu, ale bez přítomnosti testovaných látek. Preinkubace ve finálním médiu je nutná, protože většina inkubačních médií má jinou iontovou rovnováhu než studené uchovávací pufry. U krátkodobých metabolických studií se doporučuje preinkubace 10-30 minut. U dlouhodobých toxikologických studií se doporučuje preinkubace 1-2 hodiny, tak aby došlo k návratu K^+ iontů v jaterních řezech do normálu. Výměnou média dojde k odstranění povrchových nečistot z řezů a enzymů, např. laktátdehydrogenasa, alaninaminotransferasa, které jsou uvolněny z poškozených buněk do média (Bach a kol. 1996; (Fisher a Vickers 2013).

2.1.8 Inkubace

Inkubace slouží k metabolickým studiím testovaných látek nebo ke sledování vlivu těchto látek na řezy. Je nutné zachování geometrie řezu, zachování životaschopnosti a udržení funkčnosti řezů po celou dobu inkubace. K tomu slouží inkubační médium, které zajišťuje přístup živin, kyslíku, testovaných látek, zajišťuje výměnu plynů, zabraňuje vzniku nekrózy (Fisher a Vickers 2013).

Pro tkáňové řezy je využívána řada inkubačních systémů. V rámci diplomové práce byla využita inkubace v jamkových destičkách.



Obrázek 4 Inkubace tkáňových řezů v jamkových destičkách

2.1.8.1 Inkubace v destičkách

Řezy se umístí do vícejamkové destičky (6, 12, 24 jamek), do každé jamky je možné umístit 1-3 řezy. Destičky jsou poté umístěny do CO₂/O₂ inkubátoru (37 °C), kde jsou protřepávány (většinou 70rpm). Destičková inkubace umožňuje rychlý odběr média nebo řezu bez přerušení inkubace. Poměr objemu k povrchu kultivačního média má velký význam pro optimální výměnu kyslíku a CO₂ mezi kultivačním médiem a atmosférou a poměr tkání k objemu je důležitý pro dostatečný přísun živin (Fisher a Vickers 2013; de Graaf 2010).

2.1.9 Homogenizace

V metabolických studiích jsou tkáňové řezy inkubovány v různých inkubačních systémech. Po inkubaci mohou být xenobiotika a jejich metabolity zachyceny v řezech. Testováním samotného média by se správná hladina xenobiotika a metabolitů nezjistila. Nutná je tedy homogenizace v inkubačním médiu. Vzniklý homogenát obsahuje jak xenobiotikum, tak jeho metabolity. Tímto způsobem jsou získány informace o hladině

mateřské látky a jejích metabolitech (Lake a Price 2010). Homogenizace by měla probíhat při teplotě 0-4 °C (Graham 2002).

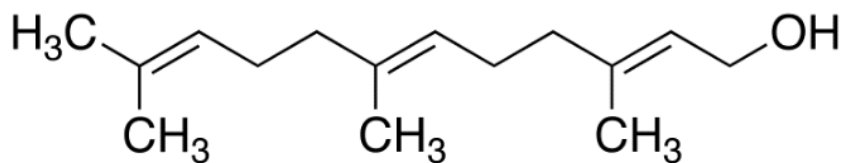
2.2 Terpeny

Terpeny jsou organické sloučeniny patřící mezi isoprenoidy, jsou většinou rostlinného původu a jsou biosynteticky odvozeny od izoprenové jednotky s molekulovým vzorcem $(C_5H_8)_n$, kde n vyjadřuje počet propojených isoprenových jednotek. Terpeny lze dělit podle struktury na acyklické nebo cyklické. Další typ dělení terpenů je dle počtu isoprenových jednotek: hemi- (C_5), což odpovídá jedné isoprenové jednotce, mono- (C_{10}) odpovídá dvěma izoprenovým jednotkám, seskvi- (C_{15}) odpovídá třem molekulám isoprenu, di- (C_{20}) odpovídá čtyřem isoprenovým jednotkám, tri- (C_{30}) odpovídá šesti molekulám isoprenu a tetra- (C_{40}) odpovídá osmi isoprenovým jednotkám. Terpeny na svém uhlovodíkovém skeletu mohou obsahovat kyslíkovou funkční skupinu – hydroxylovou, karboxylovou, ketonickou, aldehydovou. Výsledné chemické modifikace terpenů jsou označovány jako terpenoidy (Paduch a kol. 2007).

Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou přirozeně se vyskytující látky, vyskytují se převážně ve vyšších rostlinách jako sekundární metabolity, které jsou obsaženy v silicích, ale také se nalézají v houbách a v bezobratlých živočiších. Tyto látky se také vyznačují širokou biologickou aktivitou, která zahrnuje protizánětlivý, protirakovinný, antibakteriální, anthelmintický, antimalarický, antifungální, antivirový, antihyperglykemický účinek. Kromě těchto pozitivních účinků mohou mít tyto látky nežádoucí účinky a být toxické. Biologická aktivita seskviterpenů je založena na jejich antioxidačních a prooxidačních účincích. Zda daný seskviterpen bude působit antioxidačně, tedy proti oxidačnímu stresu nebo daný děj bude podporovat, záleží také na jeho struktuře, koncentraci a v neposlední řadě záleží i na typu buňky a jejím metabolismu. Není tedy jednoduché předem určit, jakým mechanismem bude seskviterpen účinkovat. Proto jsou neustálým předmětem výzkumu a sleduje se jejich biologická aktivita *in vitro* a *in vivo* z důvodu určení účinnosti a bezpečnosti (Bártíková a kol. 2014; Paduch a kol. 2007).

2.2.1 Farnesol



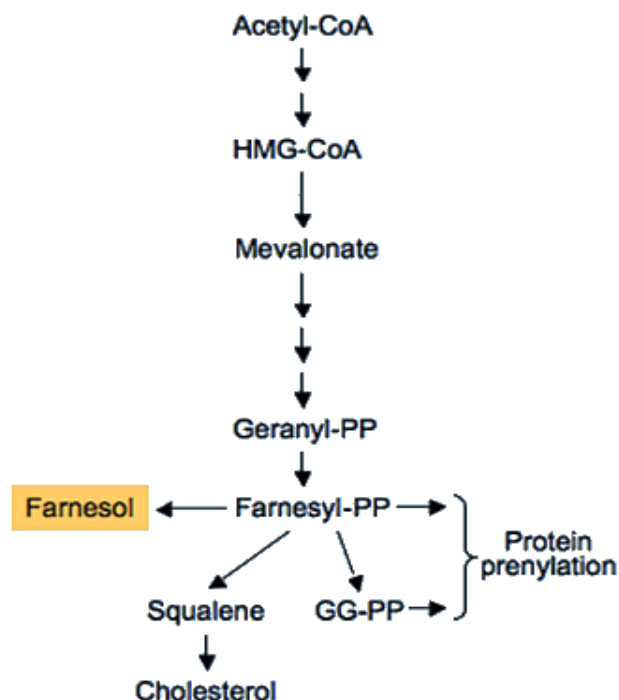
Obrázek 5 Chemická struktura farnesolu (převzato z webu 1)

Farnesol (FAR, (2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol), je 15-uhlíkový seskviterpenový acyklický alkohol. Farnesol vzniká defosforylací farnesylpyrofosfátu (farnesyl-PP), metabolitu z biosyntetické dráhy cholesterolu. FAR se nachází v mnoha druzích ovoce a aromatických rostlin (růže, citronová tráva, heřmánek). FAR je bezbarvá olejovitá kapalina s mírně sladkým aromatem, díky čemuž se využívá v kosmetickém průmyslu. Silice se nejčastěji používají do toaletních mýdel, šamponů, parfémů nebo do aromatických olejů. Farnesol patří mezi alergeny, může vyvolat alergickou reakci, proto je jeho použití omezené. Jeho hlavní vlastnosti jsou protirakovinné a antibakteriální, zabráňuje růstu a množení bakterií (Lapczynski a kol. 2008; Joo a Jetten 2010).

Protirakovinné a chemoprevenční účinky FAR zahrnují několik různých mechanismů, mohou působit buď ve fázi iniciace, nebo progresu tumorigeneze. FAR může snižovat karcinogenem indukované přerušení DNA řetězce a tvorbu DNA aduktů, může působit na nukleární receptory nebo může inhibovat proliferaci a indukovat apoptózu buněk. Řada studií prokázala, že FAR a příbuzné isoprenoidy včetně geraniolu a perillylalkoholu inhibují buněčnou proliferaci a indukují buněčnou apoptózu. Nádorové buňky jsou výrazně citlivější na účinky FAR než buňky nenádorové, např. leukemické buňky v porovnání s T-lymfocyty a monocyty jsou méně odolné vůči farnesolem indukované apoptóze. Mechanismus, na kterém je tento rozdíl citlivosti založen není doposud znám. Leukemické buňky patří mezi nejcitlivější na účinky farnesolu. U většiny buněčných typů včetně adenokarcinomu plic, melanomu, lymfoblastické leukemie, kolorektálního karcinomu, spinocelurálního karcinomu a adenokarcinomu pankreatu vyvolal farnesol zástavu buněčného cyklu. Inhibice růstu vyvolána farnesolem je u většiny buněčných typů zprostředkována apoptózou (Joo a Jetten 2010).

Studie ukázaly, že inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy je spojena s inhibičním účinkem farnesolu na 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-(HMG-CoA) reduktasu. Tento enzym přeměňuje HMG-CoA na mevalonát. Mevalonát slouží

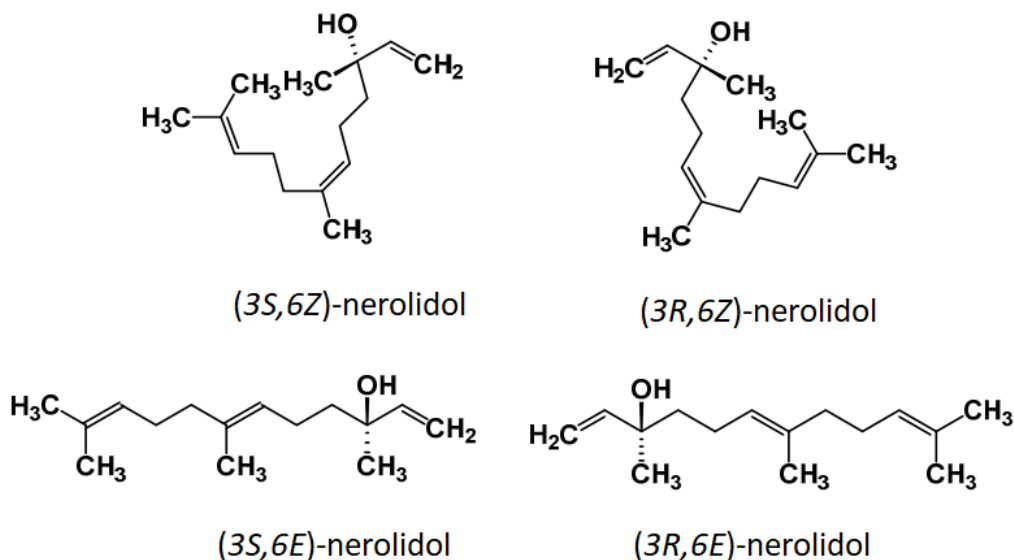
k syntéze nejprve geranylpyrofosfátu a poté farnesyl-PP, který je prekurzor biosyntézy cholesterolu a může být převeden na geranylgeranylpyrofosfát (geranylgeranyl-PP) a farnesol. Nesterolový isoprenoid farnesol vzniká defosforylací farnesyl-PP. Farnesyl-PP a geranylgeranyl-PP jsou zodpovědné za prenylaci různých proteinů a posttranslační modifikace proteinů. Výsledky studie vedou k myšlence, že mezi farnesolem a HMG-CoA reduktasou by mohla být souvislost, inhibice HMG-CoA reduktasy by mohla přispět k inhibici růstu nádorových buněk a indukci apoptózy. Tato myšlenka je v souladu i s jinými studiemi, které poukazují na souvislost mezi inhibicí HMG-CoA reduktasy, indukci apoptózy, potlačením růstu nádoru a snížením rizika rakoviny. Tyto účinky by se mohly vztahovat k inhibici prenylace určitých protoonkogenů jako jsou např. členové rodiny Ras, kteří jsou důležití při řízení proliferace buněk. Ve studii nebylo prokázáno, že by farnesol inhiboval prenylaci Ras, z čehož vyplývá, že jeho inhibice růstu a indukce apoptózy nesouvisí s účinky na prenylaci. Rychle rostoucí nádorové buňky vyžadují zvýšenou biosyntézu cholesterolu, účinky farnesolu na potlačení růstu nádorových buněk se mohou vztahovat k inhibici biosyntézy cholesterolu. Jiná studie poukázala na další mechanismus, inhibice HMG-CoA reduktasy může vyvolat stres endoplazmatického retikula, jedná se o hlavní cestu vedoucí k apoptóze (Joo a Jetten).



Obrázek 6 Schéma syntézy farnesolu (Joo a Jetten 2010)

Další biologická aktivita, která je připisována farnesolu je antifungální. Bylo zjištěno, že ovlivňuje kvasinku *Candida albicans*, působí nejen na její růst, ale také ovlivňuje její morfologii, proto je vhodným kandidátem při léčbě kandidových onemocnění (Saidi a kol. 2006).

2.2.2 Nerolidol



Obrázek 7 Chemická struktura cis- a trans-nerolidolu (převzato z Chan a kol. 2016)

Nerolidol (3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodekatrien-3-ol; NER) též známý jako peruvial je alylický isomer farnesolu, má čtyři různé isomerní formy, které se skládají ze dvou enantiomerů a ze dvou geometrických izomerů, které se vyskytují v *trans* a *cis* formě. Tyto isomerní formy jsou způsobeny přítomností dvojně vazby na C-6 a asymetrického centra na C-3. Jedná se o přirozeně se vyskytující seskviterpenový alkohol, který je přítomný v silicích různých rostlin, např. *Baccharis dracunculifolia*, *Amaranthus retroflexus*, *Canarium schweinfurthii*, *Piper quandichaudiarum*, *Myrica rubra*. Přítomnost nerolidolu je běžná v mnoha kosmetických výrobcích (šampóny, parfémy) a v dalších výrobcích (čisticí prostředky či detergenty). Kromě toho se využívá i jako zesilovač chuti v potravinářském průmyslu. Podobně jako ostatní seskviterpeny má nerolidol vysokou hydrofobicitu, snadno prochází přes plazmatickou membránu a může interagovat s intracelulárními proteiny či uvnitř organel. Mezi biologické a farmakologické vlastnosti nerolidolu patří antioxidační, antimikrobiální, antiparazitické, antiulcerózní, antinociceptivní, antimykotické účinky (Ambrož a kol. 2015; Ferreira a kol. 2012; Chan a kol. 2016; Sperotto a kol. 2013; Špičáková a kol. 2017).

Antioxidační účinky nerolidolu byly studovány na modelu myšího hipokampu, cílem bylo prokázat neuroprotektivní vlastnosti. Mozek je dobrým modelem ke studiu antioxidačního potenciálu, protože pozitivní účinky na bioenergetiku mozku korelují s antioxidačními účinky v neurálních buňkách. Nerolidol může chránit hipokampus proti neurodegenerativnímu poškození, snižuje peroxidaci lipidů a hladinu dusitanů. Antioxidační účinek nerolidolu je důležitý pro vývoj selektivní antioxidační terapie, neboť oxidační stres je jedním z patofyziologických mechanismů vedoucích ke vzniku neurodegenerativních poruch, jako je amyotrofická laterální skleróza, Parkinsonova nemoc, epilepsie a Alzheimerova nemoc (Neto a kol. 2013).

Nerolidol vykazoval antibakteriální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, proti kmenům citlivým i rezistentním na methicilin. Nerolidol způsoboval únik K^+ iontů z buňky, což vedlo k poškození buňky a k její lýze. Antibakteriální účinek může být spojen se strukturou nerolidolu, resp. s jeho dlouhým alifatickým řetězcem. Kromě antibakteriálního účinku nerolidolu bylo zjištěno, že potencuje účinek některých antibiotik (amoxicilin/kyselina klavulánová proti *Staphylococcus aureus*, amoxicilin/kyselina klavulánová, ceftazidinu a imipenemu proti *Escherichia coli*). Také byla pozorována schopnost nerolidolu zvyšovat citlivost bakterií k antimikrobiálním látkám. Nerolidol zvyšoval citlivost *Staphylococcus aureus* na ciprofloxacin, klindamycin, erytromycin, gentamycin, tetracyklin a vankomycin a také *Escherichia coli* na polymyxin B (Chan a kol. 2016).

Také byla prokázána antifungální aktivita nerolidolu. *Trans*-nerolidol, který je hlavní složkou *Papaver clausenium*, vykazuje fungicidní aktivitu tím, že narušuje hyfální růst *Trichophyton mentagrophytes*. Dále nerolidol vykazuje antifungální aktivitu proti *Microsporum gypseum*, která způsobuje dermatofytózu. Kromě antifungálního účinku proti lidským patogenům vykazuje nerolidol také výsledky při potlačení houbových infekcí u rostlin způsobených fytopatogenními houbami. Na základě studií zaměřených na antifungální aktivitu nerolidolu je vhodným kandidátem na vývoj antifungálních léků (Chan a kol. 2016).

Antiparazitární aktivita nerolidolu je významná pro potencionální vývoj nových antiparazitik proti nemocem, jako je malárie, leishmanióza, spavá nemoc, Chagasova nemoc. Bylo zjištěné, že nerolidol inhiboval růst *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* a *L. chagasi* promastigotů a *L. amazonensis* amastigotů. Další studie ukázala, že je nerolidol schopen zvýšit molekulární dynamiku lipidové složky v plazmatické membráně *Leishmania*. To je pravděpodobně způsobeno vložením

nerolidolu do lipidové dvojvrstvy, kde působí jako rozptylovač a zvyšuje fluiditu membrány, protože nerolidol má vysokou hydrofobicitu, což způsobuje významnou reorganizaci buněčné membrány. Následně dochází ke zvýšení molekulární dynamiky, což způsobuje únik cytoplazmatického obsahu a nakonec smrt buňky *Leishmania*. V další studii byla prokázána antitrypanozomální aktivita, racemická směs nerolidolu je slibným kandidátem při léčbě spavé nemoci. Nerolidol vykazuje také antiparazitární účinky na krevní motolice rodu *Schistosoma*, resp. racemická směs má tyto účinky. Racemická směs působí proti dospělcům *Schistosoma mansoni*. Účinek byl zprostředkován snížením motorické aktivity a smrtí krevních motolic. Studie také zjistila, že nerolidol vyvolal morfologické změny v tegumentu u dospělých krevniček. Dalším biologickým účinkem je antimalarická aktivita. Nerolidol vyvolal po 48 hodinové expozici 100% inhibiční účinek na vývoj trofozoitů do schizontů. Studie naznačuje, že antimalarický účinek je pravděpodobně zprostředkován kompeticí v biosyntéze isoprenoidních derivátů, což vede k inhibici biosyntézy glykoproteinů. Dále bylo zjištěno, že nerolidol vykazuje synergický účinek s fosfomycinem nebo squalestinem. Kombinace nerolidolu s těmito léčivy zvyšuje jejich antimalarickou aktivitu (Chan a kol. 2016).

Nerolidol byl také označen jako nositel antiulcerózního účinku. Nerolidol významně inhibuje tvorbu vředu vyvolanou různými příčinami, ať je vyvolávající příčinou stres, kouření, etanol, výživové nedostatky nebo nesteroidní protizánětlivá léčiva. Toto zjištění vede k tomu, že nerolidol by měl být používán jako aktivní složka při gastroprotektivní a protinádorové léčbě (Chan a kol. 2016).

Nerolidol má vliv na zvýšení kožní penetrace, což umožňuje rychlejší průnik některých léčiv při transdermální aplikaci. Proto jsou terpeny používány jako lokální zesilovače penetrace přes kůži. Mechanismus je pravděpodobně založen na rozrušení kožních lipidů ve *stratum corneum*, což vede ke zvýšení propustnosti. Bylo zjištěno, že nerolidol umí zvýšit rychlost difúze více než 20 krát u některých léčiv, např. u 5-fluoruracilu (Chan a kol. 2016).

Další biologický účinek nerolidolu je antinociceptivní a protizánětlivý, má vliv na GABAergní receptory a inhibiční vliv na zánět. Nerolidol má tedy slibné analgetické a protizánětlivé účinky (Chan a kol. 2016).

Několik studií připisuje nerolidolu cytotoxickou aktivitu na rakovinné buňky. Bylo zjištěno, že indukuje silný cytotoxický účinek u karcinomu plic, prsu, prostaty, adenokarcinomu ledvin. Antiproliferační účinek byl pozorován také u nádorové linie

střevního adenokarcinomu (CaCo-2), přičemž neovlivňoval životaschopnost zdravých hepatocytů. Kromě toho bylo zjištěno, že v kombinaci s doxorubicinem potencuje jeho účinek a dochází ke zvýšení koncentrace doxorubicinu v nádorových buňkách (Ambrož a kol. 2015; Chan a kol. 2016).

Nerolidol se také používá jako složka repelentů k odpuzování hmyzu. Má insekticidní účinky proti specifickým škůdcům bez škodlivých vedlejších účinků na člověka a zvířata. Kombinace nerolidolu a linaloolu vykazuje odpuzující aktivitu proti *Sitophilus zeamais* (Pilous kukuřičný), který napadá kukuřici. V jiné studii bylo prokázáno, že směs nerolidolu a čajovníku australského v poměru 2:1 vykazuje insekticidní a ovocidní účinek proti *Pediculus capitis* (Veš dětská). Dále má nerolidol akaricidní aktivitu a způsobuje 100% úmrtnost larvy *Rhipicephalus microplus* (Klíště skotu). Nerolidol snižuje kvalitu vajíček a larválního líhnutí (Chan a kol. 2016).

2.3 Biotransformace xenobiotik

Biotransformační enzymy hrají důležitou roli v metabolismu, eliminaci a/nebo detoxikaci léků a jiných xenobiotik zavedených do lidského organismu. Tyto enzymy chrání organismus před škodlivými účinky xenobiotik a některých endobiotik. Metabolismus xenobiotik se tradičně dělí do dvou fází. První fáze biotransformace zahrnuje oxidaci, redukci a hydrolýzu, pro II. fázi biotransformace jsou typické konjugační reakce. Následovat může i III. fáze, na které se podílejí transportní proteiny, které přenášejí xenobiotika a jejich metabolity přes membrány (Xu a kol. 2005).

2.3.1 První fáze biotransformace

Do první fáze biotransformace se zahrnuje již výše zmíněná oxidace, redukce a hydrolýza. Během této fáze se připojí nebo odhalí funkční skupiny (-OH, -NH₂, -SH nebo -COOH) a většinou vedou pouze k mírnému zvýšení hydrofility. Funkční skupiny, které vznikají během této fáze, jsou většinou místem pro reakce II. fáze (Parkinson a kol. 2001)

Níže jsou popsány ty biotransformační enzymy, které byly prakticky stanovovány v rámci diplomové práce.

2.3.1.1 Enzymy redukující karbonylovou skupinu

Enzymy redukující karbonylovou skupinu se rozdělují do tří nadrodin:

- Aldo-ketoreduktasy (AKR)
- Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)
- Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

2.3.1.1.1 Aldo-ketoreduktasy

Aldo-ketoreduktasy (AKR) představují nadrodinu oxidoreduktas účastnících se první fáze biotransformace. Nacházejí se ve většině živých organismů a vyznačují se tkáňovou specifitou. Jejich kofaktorem při redukci aldehydů nebo ketonů na primární nebo sekundární alkoholy je NADPH. Proteiny tvořící nadrodinu AKR jsou typické tím, že ve svém prostorovém uspořádání obsahují $(\alpha/\beta)_8$ soudkový motiv, který je tvořen osmi α -šroubovicemi a osmi β -skládanými listy, které se střídají podél centrálního řetězce peptidů. Nadrodinu AKR tvoří především monomerní proteiny o velikosti 34-37 kDa, výjimky zde tvoří rodiny AKR2, AKR6 a AKR7, které vytvářejí multimerní komplexy. Charakteristickou vlastností AKR je nízká substrátová selektivita, AKR přeměňují jak endogenní látky, tak xenobiotika. Reakce, které AKR katalyzují, jsou obousměrné, ale převládají spíše redukční reakce než oxidační. Názvosloví je odvozené od nadrodiny CYP (El-Kabbani a kol. 2007; Skálová a Boušová 2011).

V této diplomové práci byla stanovována aldo-ketoreduktasa isoforma A1A (aldehydreduktasa, AKR1A1) a isoforma 1C9 (hydroxysteroiddehydrogenasa, AKR1C9).

Isoforma AKR1A1 je jednou z prvních objevených AKR. Je přítomna ve všech eukaryotách od kvasinek po savce. Enzym je exprimován ve většině tkání, nejvíce však v kůře ledvin a v játrech. Vyznačuje se nízkou substrátovou selektivitou. AKR1A1 je důležitá v metabolismu glukuronátu, neurotransmiterů (produktů monoaminoxidasy) a steroidů (hlavně kortikosteroidů) (Barski a kol. 1999; Skálová a Boušová 2011).

Aldo-ketoreduktasy AKR1C1-1C4 katalyzují oxidoredukční přeměnu různých substrátů. Jednotlivé isoformy u lidí se navzájem liší rozdílnou citlivostí k inhibitorům a rozdílnou tkáňovou distribucí. Všechny isoformy byly nalezeny v jaterní tkáni, ale jejich extrahepatální distribuce je odlišná. AKR1C4 je pouze jaterní enzym, 1C2 a 1C3 jsou exprimovány v prostatě a prsní tkáni. Enzymy této podrodiny štěpí nejen aldehydy a ketony, ale mají významnou roli v metabolismu steroidů, resp. androgenů a estrogenů, čímž mohou ovlivňovat vznik a progresi androgen- a estrogen-dependetních

onemocnění, dále hrají důležitou roli v biosyntéze neurosteroidů a žlučových kyselin. Nerovnováha v biosyntéze a inaktivaci steroidů může vést ke karcinomu prostaty, benigní hyperplazii prostaty, karcinomu prsu, karcinomu endometria, k cholestáze, neonatálnímu selhání jater, neurologickým poruchám, k malformaci nebo diferenciaci genitálií. Všechny isoformy se podílejí na metabolismu xenobiotik (Rižner a Penning 2014; Skálová a Boušová 2011).

2.3.1.1.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

Karbonylreduktasa 1 (CBR1) patří do rozsáhlé nadrodiny SDR, počet členů této nadrodiny neustále roste, v současné době existuje více než 160 000 členů přiřazených k SDR nadrodině (Persson a Kallberg 2013). SDR hrají významnou roli v I. fázi biotransformace xenobiotik. Karbonylreduktasy jsou NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasy, většinou monomerní, cytosolové enzymy se širokou substrátovou specifitou pro mnoho endogenních látek, např. steroidy, prostaglandiny a xenobiotických karbonylových sloučenin, např. alifatických a aromatických aldehydů a ketonů, chinonů, protinádorových antracyklinů (daunorubicin, doxorubicin) a dalších léčiv. U lidí byly objeveny tři isoformy CBR – CBR1, CBR3, CBR4, mezi CBR1 a CBR3 je 72% podobnost v aminokyselinové sekvenci, liší se však v enzymatických vlastnostech, CBR3 má vyšší substrátovou selektivitu. Rozdíly v selektivitě jsou způsobeny především odlišným tvarem aktivních míst a vlastnostmi povrchů. Nejvýznamnějším členem nadrodiny SDR je CBR1, u člověka se nachází nejvíce v jaterní tkáni, v placentě a centrální nervové soustavě, dále se může vyskytovat v epidermis žaludku, v tenkém střevě nebo v ledvinách (Pilka a kol. 2009; Forrest a Gonzales 2000; Miura a kol. 2013; Dinkova-Kostkova a Talalay 2010).

2.3.1.2 NAD(P)H-chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1)

Chinonreduktasy byly nalezeny v mnoha eukaryotních buňkách. Jejich katalytické vlastnosti poprvé popsali Ernster a Navazio v roce 1958. NQO1 je homodimerní FAD-dependentní flavoprotein, jedna molekula FAD připadá na monomer. Tento flavoenzym zprostředkovává dvouelektronovou redukci, vyznačuje se svou schopností využívat jak NADH, tak NADPH jako redukční kofaktor. Kofaktor a substrát se váží na stejné vazebné místo a katalýza probíhá ping-pongovým mechanismem. NQO1 katalyzuje dvouelektronovou redukci chinonů, ve které je chinon redukován na hydrochinon v jednom kroku. Tím zabrání vzniku toxických semichinonových radikálů a reaktivních forem kyslíku, čímž snižuje jejich mutagenitu

a kancerogenitu. NQO1 tak hrají důležitou protektivní roli při oxidačním stresu. Méně stabilní hydrochinony mohou reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku semichinonů a aktivních kyslíkových forem, které jsou schopny alkylovat nukleofilní místa DNA. NQO1 působí buď jako detoxikační, nebo jako aktivační enzym v závislosti na stabilitě vzniklého hydrochinonu. NQO1 enzym je exprimován v mnoha tkáních, které vyžadují vysokou úroveň antioxidační ochrany. Patří sem epitelální buňky plic, prsu a tlustého střeva, vaskulární endotel, adipocyty, epitel rohovky a čočky, optický nerv a nervová vlákna, játra, dále je ve vysoké míře exprimován v solidních nádorech (Dinkova-Kostova a Talalay 2010; Ross a kol. 2000; Siegel a kol. 2012; Skálová a Boušová 2011).

Předpokládá se, že NQO1 hraje roli antioxidantu v redukci endogenních chinonů, jako je vitamín E a koenzym Q10. Redukcí těchto látek dochází ke vzniku stabilních hydrochinonů s významnými antioxidačními účinky, chrání buněčné membrány před oxidačním stresem (Ross a kol. 2000; Siegel a kol. 2004).

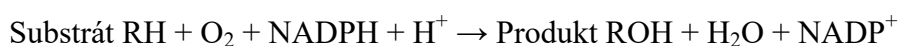
2.3.1.3 Cytochrom P450

Cytochromy P450 (CYP) patří do rozsáhlé rodiny hemoproteinů a hrají klíčovou roli v metabolismu xenobiotik i endogenních látek. CYP se podílí jak na biotransformačních procesech široké škály xenobiotik, tak je to i enzymatický systém podílející se na tvorbě cholesterolu, žlučových kyselin, steroidů, prostacyklinů a tromboxanu A₂. V organismu jsou především zodpovědné za oxidační reakce I. fáze biotransformace. Sloučeniny, které jsou substráty CYP, jsou v organismu biotransformovány za vzniku polárnějších sloučenin, které pak mohou být vyloučeny a nedochází k bioakumulaci xenobiotik. Kromě detoxikace těchto xenobiotik může docházet i ke vzniku takových derivátů, které jsou biologicky aktivnější: některé pozitivně (např. aktivní formy některých léčiv), jiné mohou být toxické, mutagenní či karcinogenní. V lidském organismu je lze nalézt v největší míře v játrech, ledvinách, plicích, kůži, v tkáních gastrointestinálního traktu a močových cest, v menším množství jsou přítomny prakticky ve všech tkáních a specializovaných buňkách. V eukaryotických buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplazmatického retikula, v menší míře pak v membránách mitochondrií, případně jádra. Naproti tomu v bakteriálních buňkách je CYP přítomen volně v cytosolu (Dostálek a kol. 2006, Stiborová a kol. 1999; Skálová a Boušová 2011).

Množství cytochromu P450 v jednotlivých tkáních nelze považovat za absolutní. Obsah tohoto enzymu v jednotlivých tkáních závisí na mnoha faktorech, např. na genetickém polymorfismu, vlivu vnějšího prostředí, výživě, věku, pohlaví, kouření, konzumaci alkoholu, působení podávaných léčiv, proto se mohou hladiny jednotlivých isoformů cytochromu P450 každého jednotlivce značně lišit (Dostálek a kol. 2006).

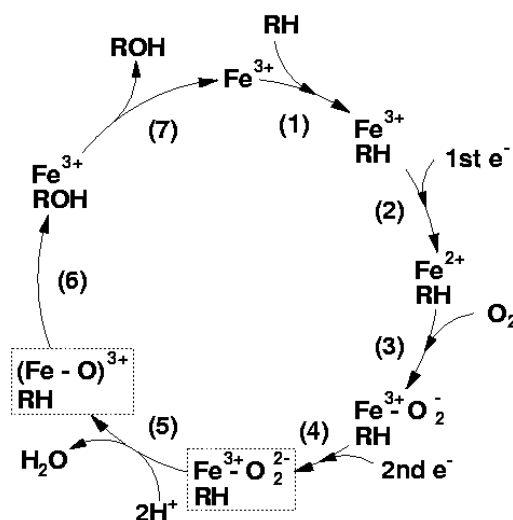
Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, jejichž společným rysem je přítomnost hemu typu b (protoporfyrin IX), podobně jako u hemoglobinu a myoglobinu s tím rozdílem, že u CYP je železo v hemové skupině v oxidované formě (Fe^{3+}). Atom Fe^{3+} je lokalizován v centru protoporfyrinového kruhu, ke kterému je vázán čtyřmi ligandy. Pátým ligandem železa je thiolátový anion pocházející z cysteinu. Šestým ligandem hemu se v průběhu reakce stává atom kyslíku molekuly vody (Dostálek a kol. 2006; Skálová a Boušová 2011; Zuber a kol. 2002).

Cytochrom P450 je centrální enzym monoxygenačních dějů. Monoxygenasy jsou enzymy, které váží vzdušný kyslík, štěpí jeho molekulu, jeden atom kyslíku je inkorporován do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody. Souhrnně lze rovnici monoxygenasové aktivity CYP vůči substrátu (RH) napsat:



Reakční cyklus CYP je poměrně složitý, lze ho stručně popsat v několika krocích (Obrázek 8). V prvním kroku dochází k vazbě substrátu (RH), substrát se váže na oxidovanou formu CYP, vzniká komplex $\text{RH-(Fe}^{3+}\text{)}$. Dochází k jednoelektronové redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} , resp. $\text{RH-(Fe}^{2+}\text{)}$, následuje vazba kyslíku na volné šesté koordinační místo hemového železa, vzniká $\text{RH-Fe}^{2+}(\text{O}_2)$ a následuje druhá redukce. Dochází k rozštěpení vazby O-O a reakci se dvěma protony za vzniku molekuly vody a komplexu $(\text{Fe-O})^{3+}\text{RH}$. Posledním krokem reakčního cyklu CYP je tvorba produktu. Atom kyslíku vázaný na železo je navázán na molekulu RH, dochází ke vzniku hydroxylované formy substrátu (ROH), která je produktem reakce. Dochází k uvolnění produktu a dochází k regeneraci enzymu, který se vrací do původního stavu s oxidovaným Fe^{3+} . Zdrojem kyslíku mohou být i peroxidy (zvláště organické hydroperoxidy); reakční mechanismus je pak samozřejmě odlišný. K redukci CYP jsou nutné dva elektrony, které pochází z NADPH, neboť je to dárce elektronů. K transportu elektronů na CYP slouží ve tkáních savců dva typy elektronových transportních systémů. První typ je v mitochondriích, druhý typ se nachází v endoplazmatickém retikulu. Druhý typ se též nazývá mikrosomální typ cytochromu P450. Elektrony

pro mitochondriální CYP jsou přenášeny z NADPH přes adrenodoxinreduktasu na adrenodoxin a z něj na CYP. Mikrosomální cytochrom P450 se skládá ze dvou na membráně vázaných komponent, cytochromu a NADPH-cytochrom P450 reduktasy. NADPH-cytochrom P450 reduktasa má dvě domény – FAD doménu a FMN doménu. Flavin adenin dinukleotid přijímá dva elektrony (potřebné k redukci cytochromu P450) z NADPH a přes flavin adenin mononukleotid je přenáší na cytochrom P450 (Dostálek a kol. 2006).



Obrázek 8 Katalytický cyklus CYP450 (převzato z webu 2)

V důsledku rozsáhlého počtu zástupců enzymového systému cytochromu P450, bylo nutné zavést systémové názvosloví. Všechny cytochromy P450 tvoří dohromady nadrodinu označovanou zkratkou CYP. Nadrodina CYP je pak podle stoupající podobnosti v aminokyselinové sekvenci členěna do rodin (minimálně 40% homologie v aminokyselinové sekvenci) a do podrodin (minimálně 60% homologie v aminokyselinové sekvenci). Rodiny jsou označovány arabskou číslicí za zkratkou CYP. Podrodiny jsou označovány velkým písmenem za arabskou číslicí. Posledním znakem v nomenklatuře je opět arabská číslice, která charakterizuje přesnou isoformu cytochromu P450 (Dostálek a kol. 2006; Skálová a Boušová 2011; Stiborová a kol. 1999).

V praktické části této diplomové části byly studovány isoformy CYP1A1, CYP1A2 a podrodiny CYP2B, CYP3A.

2.3.1.3.1 Podrodina CYP1A

Podrodina CYP1A zahrnuje dvě hlavní isoformy, tj. CYP1A1 a CYP1A2, které se významně podílejí na biotransformaci xenobiotik. Oba enzymy jsou si značně podobné, vykazují až 70% homologii v aminokyselinové sekvenci. Katalyzují i stejné reakce, liší se však v lokalizaci. Isoforma CYP1A1 se nachází v extrahepatálních tkáních, a to v mozku, plicích, gastrointestinálním traktu, srdci, lymfocytech a pouze v nízkých hladinách se nachází v játrech. Vyšší hladiny CYP1A1 jsou zaznamenány hlavně při kouření, fyzické námaze a při konzumaci grilovaného masa. Isoforma CYP1A2 je především lokalizována v jaterní tkáni. Podrodina CYP1A patří mezi nejvýznamnější formy CYP z hlediska karcinogeneze. Obě isoformy jsou hlavními aktivátory kontaminantů životního prostředí, léčiv, toxických látek a hlavně prokarcinogenů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly a heterocyklické aromatické aminy. Mezi významné substráty CYP1A1/2 se také řadí kofein, theofylin, paracetamol, benzimidazoly a řada dalších léčiv. Cytochromy P450 1A1 a 1A2 se podílejí také i na aktivaci genotoxických chemikálií přítomných v cigaretovém kouři. Indukce CYP1A je zprostředkována přes receptor aromatických uhlovodíků (AhR). Ligandy AhR jsou jak kontaminanty životního prostředí, tak i přírodní látky. Většina AhR ligandů, jako je α -naftoflavon, β -naftoflavon, quercetin, galargin, je přítomna v potravě, např. v ovoci, zelenině, červeném víně, fazolích nebo v čaji. Flavonoidy tedy představují největší skupinu AhR ligandů obsažených v potravě. Flavonoidy jsou jak AhR agonisté, indukující expresi CYP1A1/2, tak i antagonisté, blokující vazbu ligandů na AhR. Účinek flavonoidů na tyto receptory závisí na jejich struktuře a koncentraci. Dále mohou být CYP1A1/2 indukovány např. kofeinem a inhibovány např. některými antibiotiky (erytromycin, ciprofloxacin). Vzhledem k toxickému účinku CYP1A je indukce nežádoucí (Ashida a kol. 2000; Dostálek a kol. 2006, Martignoni a kol. 2006; Skálová a Boušová 2011; Stiborová a kol. 1999).

2.3.1.3.2 Podrodina CYP2B

Zástupcem této podrodiny u člověka je isoforma CYP2B6. Jedná se o enzym, který je lokalizován jak v jaterní tkáni, tak i extrahepatálně, ve vysokých koncentracích je popisován v centrální nervové soustavě, v nízkých koncentracích v ledvinách. Hraje důležitou roli v metabolismu různých farmaceutických substancí a podílí se na aktivaci

některých karcinogenů. Hraje úlohu i při bioaktivaci antineoplastik, zejména cyklofosfamidu a isofosmamidů (Dostálek a kol. 2006; Stiborová a kol. 1999).

2.3.1.3.3 Podrodina CYP3A

Tato podrodina je považována za nejdůležitější z celého enzymatického systému CYP, jelikož se podílí na biotransformaci endogenních i exogenních látek (Dostálek a kol. 2006)

Nejvíce jsou u člověka zastoupeny isoformy CYP3A4 a CYP3A5, které se nacházejí především v játrech a gastrointestinálním traktu, dále pak v ledvinách, plicích, centrálním nervovém systému, endotelu, placentě a v lymfocytech. Tyto isoformy se podílejí z 52% na celkové metabolické aktivitě cytochromu P450. Podrodina CYP3A se vyznačuje širokou substrátovou specifičností, proto významně chrání živé organismy před škodlivými látkami z vnějšího prostředí (Dostálek a kol. 2006). U člověka se vyskytuje i isoforma CYP3A7 jedná se o fetální formu, krátce po narození přebírá její funkci CYP3A4 (Skálová a Boušová 2011).

Účastní se metabolismu asi poloviny známých léčiv, které se používají v klinické praxi. Mezi léčiva, která jsou považována za typické substráty s velkým potenciálem k interakcím, jsou řazena makrolidová antibiotika (erytromycin), azolová antimykotika (itakonazol, ketokonazol) a blokátory kalciových kanálů s dihydropyridinovou strukturou (nifedipin). Lékové interakce na úrovni CYP3A4 jsou způsobeny jak indukci, tak inhibicí tohoto enzymu (Kousalová a kol. 2003).

CYP3A4 se podílí také na oxidaci řady karcinogenů. Z hlediska kancerogeneze jsou tedy důležitými substráty kancerogenní xenobiotika, jako jsou některé přírodní produkty (aflatoxiny), polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy (Stiborová a kol. 1999).

Hladiny CYP3A4 se zvyšují po podání řady látek, dochází k indukci, může se jednat o významné lékové interakce. Induktory jsou ligandy pregnanových X receptorů, na základě interakce s ligandem je regulována exprese CYP3A4. Indukci vyvolávají např. barbituráty, některé steroidy (dexametazon), rifampicin, extrakt třezalky tečkované. Důsledkem této interakce je snížení hladiny metabolizované látky a zvýšení hladiny metabolitu. Dalším typem lékové interakce na úrovni CYP3A4 je inhibice, jedná se o soutěž o vazebné místo dvou či více léčiv vážících se na CYP3A4. Takto se vzájemně inhibují např. blokátory vápníkových kanálů (nifedipin) a prokinetikum cisaprid. Mezi inhibitory CYP3A4 patří zejména makrolidová antibiotika (erytromycin,

klaritromycin), chemoterapeutika norfloxacin a ciprofloxacin, azolová antimykotika, inhibitory vápníkových kanálů (nifedipin, verapamil), některá antidepresiva (fluoxetin, sertralin, paroxetin), inhibitory reverzní transkriptázy (delavirdin, efavirenz), inhibitory proteas (indinavir, ritonavir) a grapefruitový džus. V řadě případů tyto lékové interakce měly závažné důsledky včetně selhání léčby nebo nežádoucích a toxických účinků vedoucích až k úmrtí pacienta (Kousalová a kol. 2003; Skálová a Boušová 2011).

Kvůli překrývání substrátové specifity CYP3A4 a P-glykoproteinu (proteinový přenašeč zodpovědný za mnohočetnou lékovou rezistenci) a kvůli podobnostem inhibitorů a induktorů CYP3A4 a P-glykoproteinu je mnoho lékových interakcí společných (Kousalová a kol. 2003).

2.3.2 Druhá fáze biotransformace

Pro II. fázi biotransformace jsou charakteristické konjugační enzymy. Při těchto konjugačních reakcích xenobiotikum nebo metabolit vzniklý v I. fázi biotransformace reaguje s endogenní sloučeninou, která se musí většinou před konjugací aktivovat vazbou s makroergním kofaktorem, poté dochází ke vzniku konjugátu. Konjugačním reakcím podléhá i řada endogenních látek s výraznou biologickou aktivitou, např. hormony, hemoglobin, cholesterol, žlučové kyseliny. Aktivita konjugačních enzymů je také regulátorem endogenního metabolismu (Dostálek a kol. 2006; Skálová a Boušová 2011).

Mezi nejčastější konjugační reakce patří glukuronidace, sulfonace, metylace, acetylace či konjugace s glutathionem nebo konjugace s aminokyselinami, tyto reakce jsou katalyzované různými transferasami. Vzniklé konjugáty jsou většinou hydrofilnější a snadněji eliminovatelné z organismu, mohou být vyloučeny močí nebo žlučí. Hydrofilní konjugáty jsou přes membrány přenášeny pomocí transportních membránových proteinů. Afinita a aktivita transportérů ovlivňuje rychlost eliminace konjugátů. Konjugačními reakcemi téměř vždy dochází ke snížení biologické aktivity a toxicity. Rizikem toxického účinku xenobiotik je nestabilita některých konjugátů, které mohou podléhat enzymové nebo neenzymové hydrolýze za vzniku reaktivních toxických produktů (Dostálek a kol. 2006; Skálová a Boušová 2011).

Některá xenobiotika mohou podléhat více typům konjugačních reakcí v závislosti na afinitě konjugačních enzymů k substrátu, na koncentraci xenobiotika a kapacitě enzymu (Skálová a Boušová 2011).

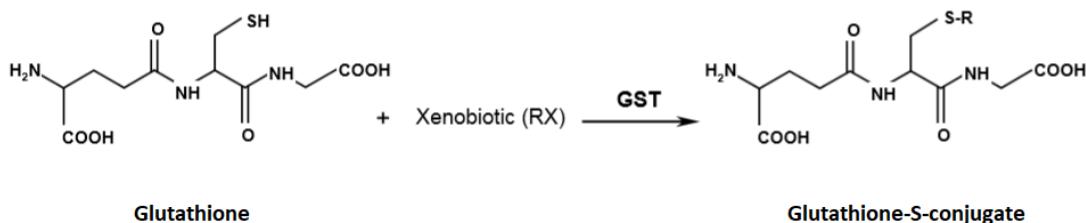
2.3.2.1 Glutathion-S-transferasa (GST)

GST patří mezi enzymy II. fáze biotransformace, významný je zejména protektivní účinek proti chemickým kancerogenům a detoxikační účinek (Dostálek a kol. 2006).

Ke konjugaci dochází za přítomnosti kofaktoru, endogenního tripeptidu glutathionu, který vzniká syntézou glycinu, cysteinu a glutamové kyseliny ve dvou po sobě jdoucích reakcích. První reakce je katalyzována γ -glutamylcysteinsynthetasou a druhá glutathionsynthetasou. Oba kroky jsou ATP-dependentní (Parkinson a kol. 2001; Skálová a Boušová 2011).

Thiolová skupina cysteinu v glutathionu má nukleofilní charakter, díky čemuž dochází ke konjugaci s elektrofilními xenobiotiky nebo s xenobiotiky, která mohou být biotransformována na elektrofil, výsledným produktem této konjugace je thioether. Substráty pro konjugaci s glutathionem mohou být rozděleny do dvou skupin. První skupinou jsou látky, které jsou dostatečně elektrofilní a mohou být konjugovány přímo, do druhé skupiny jsou řazeny sloučeniny, které se stávají elektrofilními během I. fáze biotransformace. Konjugace glutathionu s xenobiotikem je katalyzována glutathion-S-transferasou (Parkinson a kol. 2001).

Většina GST se řadí převážně do cytosolické nadrodiny, ale existují i mitochondriální a mikrosomální nadrodiny těchto enzymů. Nadrodina cytosolických dimerních enzymů (též rozpustných) se dělí na základě podobnosti aminokyselinové sekvence do osmi tříd (alpha, kappa, mí, omega, pí, sigma, theta a zeta). Do druhé nadrodiny patří mikrosomální membránově vázané trimerní proteiny, nazývané MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism). Jednotlivé GST se příliš neliší v substrátové specifitě, více isoformem může konjugovat jedno xenobiotikum (Jancova a kol. 2010; Skálová a Boušová 2011).



Obrázek 9 Tvorba glutathionového konjugátu (převzato z Jancova a kol. 2010)

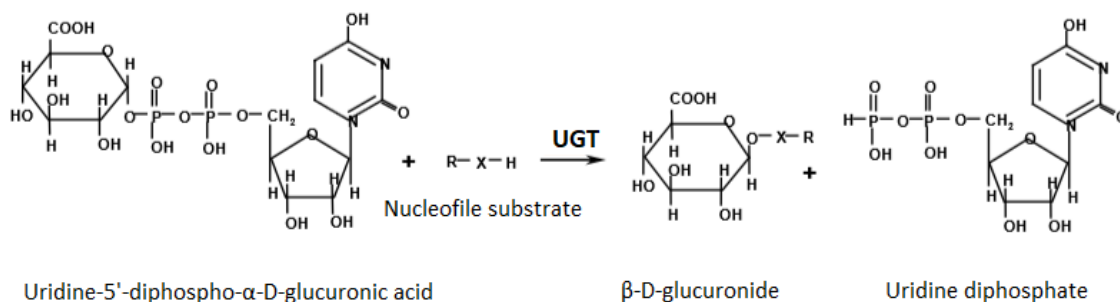
2.3.2.2 UDP-glukuronosyltransferasa (UGT)

Konjugace s kyselinou glukuronovou je nejvýznamnější biodegradční reakcí II. fáze biotransformace. Kofaktorem glukuronidace je uridin difosfátglukuronová kyselina (UDP-glukuronová kyselina, UDP-GA), která v organismu vzniká oxidací UDP-glukosy za katalýzy enzymem UDP-glukosadehydrogenasou. Pro UDP-glukosadehydrogenasu je nebytná přítomnost koenzymu NAD^+ (Dostálek a kol. 2006; Skálová a Boušová 2011).

Glukuronidace je katalyzována UDP-glukuronosyltransferasami (UGT), dělí se na tři základní podrodiny: UGT1A, UGT2A a UGT2B. Enzym je lokalizován na endoplazmatickém retikulu v blízkosti enzymatického systému cytochromu P450 a nachází se především v játrech, ledvinách a střevní sliznici. V menší míře se glukuronosyltransferasová aktivita vyskytuje v mozkové tkáni a placentě (Dostálek a kol. 2006).

Glukuronidace se účastní sloučeniny obsahující ve své struktuře nukleofilní heteroatom (O, S, N), podílí se na metabolismu xenobiotik, karcinogenů a endogenních látek, jako jsou steroidní hormony, žlučové kyseliny, bilirubin, apod. Vzniklé glukuronidy jsou hydrofilnější, méně toxické a biologicky aktivní, z organismu jsou vyloučeny močí nebo žlučí. Některé glukuronidy mohou být nestabilní, což může mít toxikologické následky (Skálová a kol. 2011; Tukey a Strassburg 2000).

UGT vykazují malé rozdíly v substrátové selektivitě, proto řada látek je substrátem pro více isoformů UGT. Při současném výskytu dvou a více xenobiotik hrozí vysoká pravděpodobnost kompetice při glukuronidaci (Skálová a Boušová 2011).



Obrázek 10 Konjugace uridin-5'-difosfo- α -D-glukuronové kyseliny se substrátem (převzato z Jancova a kol. 2010)

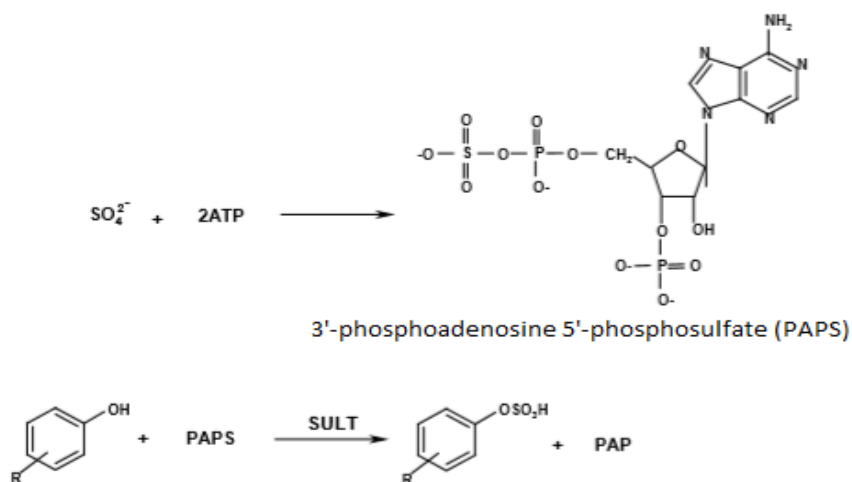
2.3.2.3 Sulfotransferasy

Sulfatační reakce jsou významnou součástí enzymatických reakcí podílejících se na konjugaci fázi biotransformace, jsou katalyzované sulfotransferasami za vzniku sulfátu. Jsou známy čtyři lidské rodiny SULT: SULT1, SULT2, SULT4 a SULT6. Tyto

enzymy přenáší sulfonovou skupinu (SO_3^-) na hydroxy- nebo amino-skupiny endogenních (neuromediátory, steroidní hormony, žlučové kyseliny) i exogenních substrátů. Donorem sulfonové skupiny je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS). Tento univerzální donor vzniká dvoustupňovou reakcí ATP a síranu pocházejícího z cysteinu za katalýzy ATP-sulfurylasou a adenosin-5'-fosfosulfatkinasou. Koncentrace PAPS v organismu představuje limitující faktor pro rychlost sulfonace. Sulfonace je obecně považována za detoxikační reakci. Produkty této reakce jsou polární, snadno eliminovatelné močí nebo žlučí. Některé sulfáty jsou nestabilní a podléhají lehce hydrolýze za vzniku vysoce reaktivních elektrofilních sloučenin, které jsou mutagenní a karcinogenní (Gamage a kol. 2005; Jancová a kol. 2010; Skálová a Boušová 2011).

SULT lze rozdělit na dvě třídy, a to na cytosolickou a membránovou rodinu. Cytosolické sulfotransferasy se nacházejí v játrech, ledvinách, střevech, plicích, placentě, mozku a kůži. Cytosolické SULT jsou zodpovědné za metabolismus xenobiotik a malých endogenních substrátů (např. žlučové kyseliny, steroidní hormony, neurotransmitter dopamin). Membránově vázané SULT se vyskytují v Golgiho aparátu a jsou odpovědné za sulfonaci peptidů (cholecystokininu), proteinů, lipidů, glykosaminoglykanů (Gamage a kol. 2005, Jancová a kol. 2010; Skálová a Boušová 2011).

Mnoho substrátů SULT jsou i substráty UGT. SULT má vyšší afinitu, ale nižší kapacitu, naopak UGT má nižší afinitu a vyšší kapacitu. Významnou roli hraje koncentrace xenobiotika, pokud je koncentrace nižší, převažuje sulfonace, pokud je koncentrace xenobiotika vyšší, převládá glukuronidace (Gamage a kol. 2005; Skálová a Boušová 2011).



Obrázek 11 Biosyntéza PAPS a reakce katalyzované SULT (převzato z Jancova a kol. 2010)

2.4 Mezidruhové rozdíly

Zvířecí modely se běžně používají ke studiu metabolického chování nových sloučenin. Výsledky těchto studií předpovídají chování nových sloučenin v lidském organismu. Je však nutné si uvědomit, že lidé se liší od zvířat. Liší se např. v isoformách enzymů, expresi nebo v katalytické aktivitě enzymu. Většina studií je zaměřena na cytochrom P450, jelikož se jedná o enzym, který se podílí na biotransformaci většiny xenobiotik. Rozdíly v isoformách CYP mezi druhy jsou hlavní příčinou rozdílů v metabolismu léčiv (Martignoni a kol. 2006).

CYP1A

CYP1A byl detekován u všech druhů, jsou známy jeho dvě isoformy: CYP1A1 a CYP1A2. CYP1A1 je exprimován pouze ve velmi nízkých hladinách v játrech potkana i člověka, jedná se o extrahepatální enzym. U potkana se CYP1A1 vyskytuje hlavně v tenkém střevě. U člověka je CYP1A1 exprimován v tenkém střevě proměnlivě. CYP1A2 je exprimován hlavně v játrech u lidí i potkana, v extrahepatálních tkáních je pozorován u obou druhů velmi omezeně. CYP1A1/2 vykazuje tedy značné interindividuální rozdíly mezi jedinci a jeho hladina je závislá na druhu. CYP1A1 je indukovatelný jak u hlodavců, tak u člověka, účinek induktoru se u obou druhů může lišit, protože se zde uplatňují mezidruhové rozdíly v regulaci exprese genu. Stejně tak inhibice je mezidruhově rozdílná, např. látka furafylin ovlivňuje aktivitu CYP1A2 u lidí a potkana v odlišné koncentraci (Martignoni a kol. 2006).

CYP2B

U člověka jsou známy dvě isoformy CYP2B, a to CYP2B6 a CYP2B7, zatímco u potkana jsou známy jiné isoformy: CYP2B1, -B2 a -B3. CYP2B byl detekován v játrech všech druhů. Naproti tomu CYP2B nebyl detekován v tenkém střevě u člověka, ale byl vysoce exprimován ve střevě potkana. Různé isoformy CYP2B se vyskytují u různých druhů a mají různé substrátové specifity. CYP2B je indukován fenobarbitalem jak u hlodavců, tak u člověka. Je zajímavé, že CYP2B je u člověka i potkana sexuálně dimorfní a u psů a opic tomu tak není. Sexuální dimorfismus je vysvětlen sekrecí růstového hormonu hypofýzy, který potlačuje CYP2B více u samic než u samců (Martignoni a kol. 2006).

CYP3A

U lidí jsou známy čtyři isoformy CYP3A: CYP3A4, -3A5, -3A7 a -3A43. U potkanů jsou známy jiné isoformy: CYP3A1, -3A2, -3A9, -3A18 a -3A62. U potkanů jsou isoformy CYP exprimovány na základě sexuálního dimorfismu. Nedávná studie identifikovala novou potkaní isoformu CYP3A62, její profil je podobný lidské isoformě CYP3A4 a potkaní CYP3A9. Isoforma CYP3A62 je hlavně exprimována ve střevním traktu, zatímco ostatní potkaní isoformy jsou exprimovány v játrech. Isoformy CYP3A9 a -3A18 byly detekovány jak v játrech, tak i v tenkém střevě. Potkan není dobrým modelem pro studium nových látek na lidskou populaci, jelikož se zde objevují významné mezidruhové rozdíly. Navíc byly mezi potkany a člověkem zjištěny i nesrovnalosti v metabolismu, mnoho typických substrátů lidských enzymů CYP3A, jako jsou např. blokátory kalciových kanálů (nifedipin), nejsou metabolizovány potkaní CYP3A1. Různé isoformy CYP jsou exprimovány u různých druhů a vykazují různé substrátové specifity. Extrapolace výsledků studií u zvířat na člověka není proto zcela optimální (Martignoni a kol. 2006).

Zvířecí modely jsou využívány ke studiu metabolismu, predikci kinetiky nebo toxicity studované látky na člověka. Je nutné si uvědomit, že zde platí mezidruhové rozdíly, vysoký stupeň sekvenční identity v aminokyselinových sekvencích mezi isoformami u různých druhů, neznamená automaticky stejnou katalytickou aktivitu, na toto by se mělo myslet při interpretaci získaných výsledků (Martignoni a kol. 2006).

3 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo zjistit vliv seskviterpenů (*cis*-nerolidolu, *trans*-nerolidolu, farnesolu) na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů (AKR1A1, AKR1C9, CBR1, NQO1, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B, CYP3A, GST, SULT, UGT) v jaterních řezech.

Předem bylo nutné provést:

- Vytvoření ultratenkých precizních řezů z jater potkana laboratorního (*Rattus norvegicus*, kmen *Wistar*)
- Inkubace řezů s vybranými seskviterpeny
- Homogenizace řezů a stanovení aktivit vybraných biotransformačních enzymů v subcelulárních frakcích jaterního homogenátu
- Porovnání aktivit mezi kontrolními a seskviterpeny ovlivněnými vzorky

4 Experimentální část

4.1 Materiál a chemikálie

4.1.1 Biologický materiál

K experimentální části diplomové práce byli použiti samci laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*, kmen *Wistar*) o hmotnosti 320-480g. Práce se zvířaty byla prováděna v souladu se Zákonem č.246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a pod dohledem Odborné komise Univerzity Karlovy, Farmaceutické fakulty pro zajišťování dobrých podmínek pokusných zvířat.

4.1.2 Chemikálie

- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), Rath
- 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), Fluka
- 2-naftol, Sigma-Aldrich
- 3'-fosfoadenosin-5'-fosfát (PAP), Sigma-Aldrich
- Acenaftenol, Sigma-Aldrich
- Albumin, Sigma-Aldrich
- Benzyloxyresorufin, Sigma-Aldrich
- Bovine serum albumin BSA, Sigma-Aldrich
- Cytochrom c, Serva
- D-glukóza, Riedel-de-Haën
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich
- Dikumarol, Sigma-Aldrich
- DL-glyceraldehyd, BDH
- Ethoxyresorufin, Sigma-Aldrich
- Ethylendiamintetraacetát (EDTA), Roche
- Farnesol, Sigma-Aldrich
- Gluthation redukovaný (GSH), Fluka
- Glukuronová kyselina (UDP-GA), Sigma-Aldrich
- Hydrokortison-21-hemisukcinát, Sigma-Aldrich
- Methoxyresorufin, BioChemica
- L-methionin, Sigma-Aldrich
- Menadion, Sigma-Aldrich

- Nerolidol, Sigma-Aldrich
- Nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma (NADH), Merck
- Nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaná forma (NADPH), Merck
- p-nitrofenol, Fluka
- p-nitrofenylsulfát (PNFS), Sigma-Aldrich
- Resorufin, Sigma-Aldrich
- Roztok bicinchoninové kyseliny (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1M NaOH), Sigma-Aldrich
- Roztok síranu měďnatého (4% CuSO₄.6H₂O), Sigma-Aldrich
- Roztok bicinchoninové kyseliny, Sigma-Aldrich
- Slovasol, Sigma-Aldrich
- Trichloroctová kyselina 3% (TCA), Penta
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Penta
- Ostatní běžné chemikálie čistoty p.a.

4.1.3 Použité přístroje

- Analytické váhy Sartorius CP225D
- Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Biofuge Stratos
- CO₂ inkubátor Heraeus HeraCell
- Laboratorní magnetická míchačka
- Mrazicí box Thermo Scientific Jouan VXE Series
- pH metr ino Lab WTW
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200
- Stolní centrifuga Eppendorf 5415D
- Thermomixer Comfort Eppendorf
- Tkáňový kráječ Krumdieck Tissue Slicer MD4000
- Třepačka Heidolph Unimax 1010
- Ultrazvukový homogenizátor Bandelin Sonorex RK31
- Vortex IKA MS2 Minishaker

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Příprava Krebsova-Henseleitova pufru

Všechny složky (Tab. 2) Krebsova-Henseleitova (K-H) pufru byly rozpuštěny v redestilované vodě a pH bylo upraveno roztokem HCl na hodnotu 7,4. Na jedna potkaní játra byla spotřeba pufru přibližně 1000 ml. Roztok chloridu vápenatého byl přidán nakonec, aby bylo zabráněno vysrážení slabě rozpustných vápenatých solí.

Tab. 2: Složení Krebsova-Henseleitova pufru

Substance	Molekulová hmotnost M_r (g/mol)	Koncentrace v pufru c (mM)
Chlorid sodný	58,44	116
Chlorid draselný	74,56	4,6
Hydrogenuhličitan sodný	84,01	25,4
Síran hořečnatý heptahydrát	246,48	1,16
Dihydrogenfosforečnan draselný	136,09	1,16
Chlorid vápenatý	147,02	2,5
D-glukóza	180,16	25
HEPES	238,31	20

4.2.2 Příprava inkubačního média

Inkubační médium RPMI-1640 bylo upraveno v laminárním boxu (Tab. 3) a doplněno na 100 ml. pH bylo upraveno roztokem NaOH na hodnotu 7,4; výsledné doplněné médium bylo sterilně přefiltrováno.

Tab. 3: Rozpis pro doplnění inkubačního média RPMI-1640

Substance	Molekulová hmotnost M_r	Koncentrace
Fetální hovězí sérový albumin		5%
L-methionin	149,2 g/mol	0,5 mM
Insulin	5807 g/mol	1 μ M
Hydrokortison-21-hemisukcinát	484,5 g/mol	0,01 mM
Gentamycin	50 mg/ml	50 μ g/ml

Příprava na krájení jaterních řezů, byla zahájena již den předem, připraven byl pufr, inkubační médium. Kráječ byl připraven také předem. Všechny části kráječe, které měly přijít do kontaktu s pufrem, byly nejprve omyty redestilovanou vodou a poté 70% lihem. Po uschnutí byly části kráječe překryty alobalem a umístěny společně s pufrem do chladicí místnosti.

4.2.3 Příprava ultratenkých řezů z potkaních jater

V den experimentu byl studený K-H pufr hodinu předem provzdušňován pneumoxidem 95% O₂/5% CO₂. Kráječ Krumdieck byl sestaven a naplněn tímto pufrem. Kráječ byl připojen k vodní lázni s vodou a ledem, která byla temperována na 4 °C. Vodní lázeň chladila pufr, kterým byl kráječ naplněn. Připraven byl box s ledem, kádinka s pufrem na řezy, Petriho miska s filtračním papírem a pufrem pro válečky z jaterní tkáně. Po vypreparování byla játra uložena do kádinky se studeným provzdušněným pufrem, která byla umístěna na ledu. Vykrajovací trubičkou o průměru 8 mm byly vykrojeny válečky. Válečky se poté umístily do nástavce v kráječi Krumdieck. Krájené řezy měly tloušťku přibližně 200-250 μm.

4.2.4 Preinkubace a inkubace jaterních řezů

K inkubaci byly použity 12 jamkové destičky, do každé jamky bylo pipetováno 1,3 ml inkubačního média. Ve 12 jamkové destičce byl vždy jeden řez na jednu jamku. V inkubátoru, který byl vytemperován na 37 °C, byla umístěna orbitální třepačka, během inkubace byla nastavena na 70 rpm. Na třepačce byl box s přívodem pneumoxidu, destičky byly umísťovány do tohoto boxu. Před každou inkubací byla provedena preinkubace. Preinkubace probíhala při 37 °C v atmosféře 95% O₂/5% CO₂. Řezy byly inkubovány v suplementovaném RPMI médiu bez testovaných látek. Po 30 minutách následovala výměna média a inkubace médiem, které obsahovalo testované látky.

4.2.5 Odběr vzorků, homogenizace a příprava subcelulárních frakcí

Příprava sodno-fosfátového pufru

Nejprve byl připraven 0,1 M roztok Na₂HPO₄ rozpuštěním 35,8 g Na₂HPO₄.12H₂O v 1000 ml redestilované vody a 0,1 M roztok NaH₂PO₄ rozpuštěním 3,9 g NaH₂PO₄.2H₂O ve 250 ml redestilované vody. Roztoky byly smíchány za stálého míchání v takovém poměru, aby výsledný pufr měl pH 7,4.

Řezy a médium byly odebírány po 8 a 24 hodinách. Řezy byly odebrány do mikrozkušavek připravených v ledu, obsahujících 500 µl 0,1 M sodno-fosfátového pufru s pH 7,4. Řezy byly ve zkumavce zhomogenizovány homogenizační tyčinkou. Od každého řezu s danou látkou bylo odebráno 450 µl homogenátu a stočeno do jedné mikrozkušavky v centrifuze po dobu 20 minut při 10 000 G a 4 °C. Vzniklý supernatant byl slit do nové zkumavky, rozpipetován po 190 µl do menších mikrozkušavek a ihned zamražen v hlubokomrazícím boxu na -80 °C.

4.2.6 Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení celkového obsahu proteinů byla použita BCA metoda. Jejím principem je reakce měďnatých iontů s proteiny v alkalickém prostředí. Reakcí dojde k redukci měďnatých iontů na měďné, v prostředí kolem pH 10 vzniká stabilní modrofialový komplex s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku. Absorbance komplexu se měří na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm (Smith a kol. 1985).

Reakční roztoky

Roztok A čirý: NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH

Roztok B modrý: 4% CuSO₄.6H₂O

Pracovní roztok C: připraven smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1 za vzniku zelené barvy

Kalibrační křivka

Kalibrační křivka byla vytvořena z 0,1% roztoku hovězího sérového albuminu (BSA). Do 6 mikrozkušavek bylo pipetováno různé množství 0,1% roztoku BSA a redestilované vody, bylo připraveno 6 vzorků o přesně známé koncentraci bílkovin (Tab. 4).

Tab. 4: Ředění BSA pro kalibrační přímkou

	Koncentrace (µg/ml)	0,1% roztok BSA (µl)	Redestilovaná voda (µl)
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Postup

Vzorky supernatantu byly v mikrozkuhavce 5krát nebo 10krát naředěny redestilovanou vodou. Kalibrační roztoky a naředěné vzorky supernatantu byly napipetovány na mikrotitrační destičku GAMA. Do celých sloupců 1-6 byly dle vzestupné koncentrace BSA (0-1000 μl) napipetovány příslušné kalibrační roztoky. Na další destičku byly napipetovány naředěné vzorky supernatantu, vždy do jednoho sloupce jeden vzorek. Kalibrační roztoky a vzorky byly pipetovány po 10 μl na jamku v celém sloupci destičky, tj. celkem 8 paralelních měření. Na slepý vzorek bylo pipetováno 10 μl redestilované vody. Nakonec bylo multikanálovou pipetou přidáno 200 μl pracovního roztoku C. Destička byla vložena do Thermomixeru a po důkladném promíchání, byly vzorky inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Po 30 minutách inkubace, byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 562 nm.

Z hodnot absorbance kalibračních roztoků byla sestrojena kalibrační křivka, která vyjadřuje závislost absorbance na koncentraci bílkoviny BSA. Od naměřených absorbancí vzorků (A_{vz}) byl odečten průměr hodnot slepých vzorků (A_{sl}), byla získána výsledná absorbance ($A_{výsl}$) podle rovnice (1). Naměřené hodnoty absorbance u jednotlivých vzorků byly dány do rovnice lineární regrese (2), která vycházela z kalibrační křivky. Kalibrační křivka udává závislost absorbance měřených vzorků na koncentraci ($\mu\text{g/ml}$).

Rovnice výsledné absorbance (1)

$$A_{výsl} = A_{vz} - A_{sl}$$

Rovnice lineární regrese (2)

$$y = a * x, kde$$

- y hodnota absorbance
- x koncentrace jednotlivých roztoků kalibrační křivky
- a koeficient rovnice

Z a hodnot absorbancí vzorků byla stanovena koncentrace jejich proteinů (x_{vz}) podle rovnice (3)

Rovnice koncentrace proteinů ve vzorku (3)

$$x_{vz} = y/a \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Do výpočtu koncentrace bílkoviny (c_{vz}) bylo zahrnuto i zředění měřeného vzorku (zř) podle rovnice (4).

$$c_{vz} = x_{vz} * zř/1000 \text{ (mg/ml)}$$

4.2.7 Příprava roztoků seskviterpenů

Zásobní roztoky seskviterpenů byly naředěny na potřebnou koncentraci pomocí DMSO. Požadovaná koncentrace roztoků seskviterpenů byla 10 μM . V případě kontrolního vzorku byl k buňkám namísto seskviterpenů přidán pouze DMSO. Výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,1% (neovlivňuje životnost řezů).

10 μM roztok *cis*-nerolidolu, *trans*-nerolidolu, farnesolu

- $M_r = 222,37$ (všechny seskviterpeny mají stejnou M_r)

4.2.8 Stanovení aktivity aldehydreduktasy AKR1A1

Principem stanovení aktivity aldehydreduktasy pomocí glycerinaldehydu je měření poklesu absorbance, ke kterému dochází přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku. Měření je prováděno při vlnové délce 340 nm a teplotě 37 °C. Aktivitu reductas lze kvantitativně vyjádřit pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH 6,22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Enzymová aktivita je vyjádřena jako oxidace 1 molu NADPH/min při zadané teplotě. Měření je prováděno při 37 °C na Tecanu po dobu 5 min (Ohara a kol. 1995).

Použité roztoky:

0,1 M draselno-fosfátový pufr, pH 6,0

- Smíchat 0,1 M K_2HPO_4 s 0,1 M KH_2PO_4 v takovém poměru, aby pH bylo 6,0

1 M roztok DL-glyceraldehydu

- $M_r = 90,08$ g/mol; rozpustit v DMSO

4 mM roztok NADPH

- $M_r = 833,4$ g/mol; rozpustit v redestilované vodě

Roztoky byly připraveny čerstvé v množství dle počtu vzorků.

Do 6 jamek v každém sloupci mikrotitrační destičky GAMA s kulatým dnem bylo napipetováno 10 μl neředěného vzorku supernatantu a do posledních 2 jamek v sloupci bylo napipetováno 10 μl 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4; jako slepý vzorek. Do všech jamek bylo poté multikanálovou pipetou napipetováno 190 μl master mixu. Nakonec byla destička vložena do spektrofotometru Tecan a byl měřen pokles absorbance po dobu 5 minut při vlnové délce 340 nm a teplotě 37 °C.

Tab. 5: Složení master mixu na stanovení AKR1A1

Složky	Množství	
	Na jednu destičku 96 jamek	Na jednu jamku destičky
0,1 M K-fosfátový pufr, pH 6	21,36 ml	178 μl
1 M DL-glyceraldehyd	240 μl	2 μl
4 mM NADPH	1200 μl	10 μl

Měření probíhalo kinetickou metodou po dobu 5 minut. Pro výpočet výsledné aktivity bylo potřebné odečíst změnu absorbance za minutu slepého vzorku od změny absorbance za minutu vzorku supernatantu v oblasti lineárního poklesu. Pomocí molárního absorpčního koeficientu 6,22 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a délky měřené vrstvy 0,75 cm byla vypočítána koncentrace vzniklého NADPH/min. Jednotky enzymové aktivity byly vztaženy na mg proteinu.

Výpočet enzymové aktivity AKR1A1 (nmol/min/ml):

$$akivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) \cdot V_i \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s}$$

ΔA_{vz} absorbance vzorku

ΔA_{sl} absorbance slepého vzorku

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

ε molární absorpční koeficient, tj. 6,22 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm

V_s objem cytosolu, tj. 0,01 ml

4.2.9 Stanovení aktivity aldoketoreduktasy AKR1C9

Principem spektrofotometrického stanovení aktivity aldoketoreduktasy pomocí acenaftenolu je měření vzrůstu absorbance, ke kterému dochází přeměnou NADP^+

na NADPH ve vzorku. Měření je prováděno při vlnové délce 340 nm a teplotě 37 °C. Aktivitu reductas lze kvantitativně vyjádřit pomocí vzrůstu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Enzymová aktivita je vyjádřena jako oxidace 1 molu NADPH/min při zadané teplotě. Měření je prováděno při teplotě 37 °C na Tecanu po dobu 5 minut (Ohara a kol. 1995).

Použité roztoky:

0,1 M TRIS/HCl pufr, pH 8,9

- 1,21 g TRIS rozpustit v přibližně 70 ml redestilované vody, upravit na pH 8,9 pomocí HCl a doplnit na 100 ml

0,1 M roztok acenaftenol

- $M_r = 170,21 \text{ g/mol}$; rozpustit v DMSO

20 mM roztok NADP⁺

- $M_r = 787,37 \text{ g/mol}$; rozpustit v redestilované vodě

Roztoky byly připraveny čerstvé v množství dle počtu vzorků.

Do 6 jamek v každém sloupci mikrotitrační destičky GAMA s kulatým dnem bylo napipetováno 10 μl neředěného vzorku supernatantu a do posledních 2 jamek v každém sloupci bylo napipetováno 10 μl 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 jako slepý vzorek. Do všech jamek bylo multikanálovou pipetou napipetováno 190 μl master mixu. Nakonec byla destička vložena do spektrofotometru Tecan a byl měřen vzrůst absorbance po dobu 5 min při vlnové délce 340 nm a teplotě 37 °C.

Tab. 6: Složení master mixu na stanovení AKR1C9

Složení	Množství	
	Na jednu destičku 96 jamek	Na jednu jamku destičky
0,1 M TRIS/HCl pufr, pH 8,9	21,36 ml	178 μl
0,1 M acenaftenol	240 μl	2 μl
20 mM NADP ⁺	1200 μl	10 μl

Pro výpočet výsledné aktivity bylo potřebné odečíst absorbanci za minutu slepého vzorku od absorbance za minutu vzorku supernatantu v oblasti lineárního vzrůstu. Pomocí molárního absorpčního koeficientu $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a délky měřené vrstvy 0,75 cm byla vypočítána koncentrace vzniklého NADPH/min. Jednotky enzymové aktivity byly vztaženy na mg proteinu.

Výpočet enzymové aktivity AKR1C (nmol/min/ml):

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) \cdot V_i \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s}$$

ΔA_{vz} absorbance vzorku

ΔA_{sl} absorbance slepého vzorku

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

ε molární absorpční koeficient, tj. $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l délky měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm

V_s objem cytosolu, tj. 0,01 ml

4.2.10 Stanovení aktivity karbonylreduktasy CBR1

Principem spektrofotometrického stanovení aktivity karbonylreduktasy je inkubace cytosolu se substrátem menadionem. Redukce menadionu karbonylreduktasou je doprovázena oxidací NAPH, čímž dochází k poklesu absorbance. Aktivitu reduktas lze kvantitativně vyjádřit pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH $6,22 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Měření je prováděno na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 340 nm a teplotě 37 °C (Maté a kol. 2008).

Použité roztoky:

0,1 M draselno-fosfátový pufr, pH 7,4

- K_2HPO_4 (8,71 g do 500 ml) : KH_2PO_4 (2,72 g do 200 ml), smíchat v takovém poměru, aby pH bylo 7,4

50 mM roztok menadionu

- $M_r = 172,18 \text{ g/mol}$; rozpustit v etanolu

5 mM roztok NADPH

- $M_r = 833,40 \text{ g/mol}$; rozpustit v redestilované vodě

Roztoky byly připraveny čerstvé a v množství dle počtu vzorků.

Do 6 jamek v každém sloupci mikrotitrační destičky GAMA s kulatým dnem bylo napipetováno 10 μl neředěného vzorku supernatantu a do posledních 2 jamek v každém sloupci bylo napipetováno 10 μl 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 jako slepý vzorek. Destička byla preinkubována v Thermomixeru při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Poté bylo multikanálovou pipetou do všech jamek přidáno 190 μl master mixu. Nakonec byla destička vložena do spektrofotometru Tecan a byl měřen pokles absorbance po dobu 5 minut při vlnové délce 340 nm a teplotě 37 °C.

Tab. 7: Složení master mixu na stanovení CBR1

Složení	Množství	
	Na jednu destičku 96 jamek	Na jednu jamku destičky
0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7,4	21,36 ml	178 μ l
50 mM menadionu	240 μ l	2 μ l
5 mM NADPH	1200 μ l	10 μ l

Pro výpočet výsledné aktivity bylo potřebné odečíst absorbanci za minutu slepého vzorku od absorbance za minutu vzorku supernatantu v oblasti lineárního poklesu. Pomocí molárního absorpčního koeficientu $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a délky měřené vrstvy 0,75 cm byla vypočítána koncentrace vzniklého NADPH/min. Jednotky enzymové aktivity byly vztaženy na mg proteinu.

Výpočet enzymové aktivity CBR1 (nmol/min/ml):

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) \cdot V_i \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s}$$

ΔA_{vz} absorbance vzorku

ΔA_{sl} absorbance slepého vzorku

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

ε molární absorpční koeficient, tj. $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm

V_s objem cytosolu, tj. 0,01 ml

4.2.11 Stanovení aktivity NAD(P)H: chinonoxidoreduktasy 1 (NQO1)

Principem metody je redukce cytochromu c v přítomnosti NADH (či NADPH) a menadionu jako elektronového akceptoru. Nárůst redukovaného cytochromu c ($\varepsilon = 28 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) se zaznamenává na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 550 nm a teplotě 37 °C. Aktivita NQO1 odpovídá aktivitě inhibované dikumarolem, který je známým inhibitorem tohoto enzymu (Benson a kol. 1980).

Použité roztoky:

50 mM TRIS/HCl pufr, pH 7,5

- navážku 0,606 g TRIS rozpustit v přibližně 80 ml redestilované vody, 1 M HCl upravit pH na 7,5 a doplnit na 100 ml

0,2188% TRIS/HCl s BSA

- navážku 0,1094 g BSA rozpustit v 50 ml pufru

308 μ M roztok cytochromu c

- navážku 0,05 g cytochromu c ($M_r \sim 13000$, čistota 80%) rozpustit v 10 ml BSA

4 mM roztok NADH

- navážku 0,0043 g NADH ($M_r = 709,5$) rozpustit v 1,5 ml redestilované vody

2 mM roztok menadionu

- navážku 0,0017 g menadionu ($M_r = 172,18$ g/mol) rozpustit v 5 ml etanolu

2 mM roztok dikumarolu

- navážku 0,00336 g dikumarolu ($M_r = 336,3$ g/mol) rozpustit v 5 ml DMSO

Roztoky byly připraveny čerstvé vždy podle počtu vzorků.

Do 6 jamek v každém sloupci mikrotitrační destičky GAMA s kulatým dnem bylo napipetováno 10 μ l neředěného vzorku supernatantu a do posledních 2 jamek v každém sloupci bylo napipetováno 10 μ l 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 jako slepý vzorek. Poté bylo multikanálovou pipetou do první poloviny destičky přidáno 190 μ l master mixu bez inhibitoru (s DMSO) a do druhé poloviny bylo přidáno 190 μ l master mixu s inhibitorem (s dikumarolem). Nakonec byla destička vložena do spektrofotometru Tecan a absorbance byla měřena při vlnové délce 550 nm a teplotě 37 °C po dobu 4 minut.

Tab. 8: Složení master mixu na stanovení NQO1 na celou destičku (tj. na 1/2 destičky bez inhibitoru, na 1/2 destičky s inhibitorem)

Složení	Bez inhibitoru	S inhibitorem
0,2188% TRIS/HCl + BSA	7,68 ml	7,68 ml
308 μ M cytochrom c	3 ml	3 ml
4 mM NADH	600 μ l	600 μ l
2 mM menadion	60 μ l	60 μ l
2 mM dikumarol	-	60 μ l
DMSO	60 μ l	-

Z naměřených hodnot absorbance po každé minutě byla z rozdílu mezi 4. a 1. minutou vypočítána absorbance za minutu. Pomocí molárního absorpčního koeficientu redukovaného cytochromu c 28 mM⁻¹.cm⁻¹ a délky měřené vrstvy 0,75 cm byla vypočítána koncentrace vzniklého cytochrom c/min. Jednotky enzymové aktivity byly vztaženy na mg proteinu. Aktivitě NQO1 odpovídá aktivita inhibovaná dikumarolem, vypočítá se: aktivita NQO1 = aktivita neinhibované reakce – aktivita inhibované reakce

Výpočet enzymové aktivity NQO1 (nmol/min/ml):

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) \cdot V_i \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s}$$

ΔA_{vz} absorbance vzorku

ΔA_{sl} absorbance slepého vzorku

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

ε molární absorpční koeficient, tj. 28mM⁻¹.cm⁻¹

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm

V_s objem cytosolu, tj. 0,01 ml

4.2.12 Stanovení aktivity isoform cytochromu P450

Metoda je založena na přidání relativně specifického substrátu jen pro určitou isoformu CYP k mikrosomální frakci. Každá isoforma metabolizuje svůj specifický substrát na fluoreskující produkt – resorufin. Přírůstek fluorescence vznikajícího resorufinu je měřen na spektrofluorimetru Tecan.

Tab. 9: Přehled isoform cytochromu P450 a jejich substrátů

Enzym	Substrát	Isoforma cytochromu P450
Ethoxyresorufin-O-deethylasa (EROD)	Ethoxyresorufin	1A1, částečně 1A2
Methoxyresorufin-O-demethylasa (MROD)	Methoxyresorufin	1A2, částečně 1A1
Benzyloxyresorufin-O-dearylasa (BROD)	Benzyloxyresorufin	3A, 2B

Použité roztoky:

0,1 M TRIS/HCl pufr, pH 7,4

- navážku 1,21 g TRIS rozpustit v přibližně 80 ml redestilované vody, 1 M HCl upravit pH na 7,4 a doplnit na 100 ml

0,1 M roztok MgCl₂ (kofaktor)

- použít MgCl₂ · 6 H₂O; M_r = 203,30 g/mol, rozpustit v redestilované vodě

Roztok substrátu

- potřebný substrát byl rozpuštěn v DMSO, výsledná koncentrace tohoto roztoku byla 0,5 mM

50 mM roztok NADPH v TRIS/HCl pufru

- M_r = 833,40 g/mol, rozpustit v 0,1 M TRIS/HCl pufru, pH 7,4

0,5 mM roztok resorufinu v DMSO

- Před použitím naředit redestilovanou vodou na 0,5 μM (10 μl 0,5 mM resorufinu a 9,99 ml pufru)

Roztoky byly připraveny čerstvé vždy podle počtu vzorků.

Na mikrotitrační destičku GREINER s plochým dnem bylo do prvního sloupce napipetováno 10 μl 0,5 M resorufinu (odpovídá 5 pmol v jamce), do dalších sloupců destičky bylo napipetováno 10 μl neředěného vzorku supernatantu (8 paralelních měření). Poté bylo do prvního sloupce destičky napipetováno 190 μl 0,1 M TRIS/HCl pufru, pH 7,4; do zbývajících sloupců bylo napipetováno multikanálovou pipetou 190 μl master mixu. Poté byla destička vložena do spektrofluorimetru Tecan a byla změřena fluorescence v čase T₀ (excitační λ = 530 nm, emisní λ = 585 nm). Po změření byla destička umístěna do Thermomixeru na 30 minut při teplotě 37 °C. Po uplynutí 30 min byla destička znovu vložena do Tecanu a byl změřen přírůstek emitovaného fluorescenčního záření substrátem v čase T₃₀.

Tab. 10: Složení master mixu na stanovení isoformu cytochromu P450

Složení	Množství	
	Na jednu destičku GREINER	Na jednu jamku destičky
0,1 M TRIS/HCl pufr, pH 7,4	18,2 ml	177 μl
0,1 M MgCl ₂	1 ml	10 μl
0,5 mM substrát	100 μl	1 μl
50 mM NADPH v TRIS/HCl	200 μl	2 μl

Výpočet enzymové aktivity jednotlivých isoform (pmol/ml/min):

$$aktivita = \frac{(F_{T_{30}} - F_{T_0}) \cdot n \cdot V_i}{\Delta F_{sl_{T_0}} \cdot V_s \cdot min}$$

$F_{T_{30}}$ přírůstek fluorescence v čase T_{30}

F_{T_0} fluorescence v čase T_0

n látkové množství resorufinu v jamce, tj. 5 pmol

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

ΔF průměr hodnot fluorescence vzorku obsahujícího 5 pmol resorufinu

V_s objem cytosolu, tj. 0,01 ml

min 30 min inkubace v Thermomixeru při teplotě 37 °C

Jednotky enzymové aktivity byly vztaženy na mg proteinu.

4.2.13 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy

Principem této metody je spektrofotometrické stanovení množství produktu konjugační reakce mezi substrátem 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (CDNB) a konjugačním činidlem glutathionem (GSH) za vzniku konjugátu S-2,4-dinitrofenylglutathion. Reakce je katalyzovaná glutathion-S-transferasou. Vzniklý konjugát má žluté zbarvení a absorpční maximum při vlnové délce 340 nm, je detekován na spektrofotometru Tecan (Ye a Zhang 2001).

Použité roztoky:

0,1 M sodno-fosfátový pufr, pH 6,5

- navážka 1,79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ rozpustit v redestilované vodě a doplnit po rysku 50 ml; 0,1 M roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; $M_r = 325,149$ g/mol
- navážku 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rozpustit v redestilované vodě a doplnit po rysku 100 ml; 0,1 M roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M_r = 177,99$ g/mol
- smíchat přibližně v poměru 1:3 a upravit pH na 6,5

5,15 mM roztok GSH v 0,1 M Na-fosfátovém pufru, pH 6,5

- navážku 7,92 mg GSH rozpustit v 5 ml 0,1 M Na-fosfátovém pufru, pH 6,5

51,5 mM roztok CDNB v etanolu

- navážku 5,22 mg CDNB rozpustit v 0,5 ml etanolu

Roztoky byly vždy připraveny čerstvé dle počtu vzorků.

Do 6 jamek v každém sloupci mikrotitrační destičky GREINER s plochým dnem bylo napipetováno 6 μ l neředěného vzorku supernatantu a do posledních 2 jamek v každém sloupci bylo napipetováno 6 μ l 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 6,5 jako slepý vzorek. Nakonec bylo do všech jamek multikanálovou pipetou přidáno 194 μ l master mixu. Destička byla lehce protřepána a poté vložena do spektrofotometru Tecan. Absorbance byla změřena 6x v minutových intervalech při vlnové délce 340 nm.

Tab. 11: Složení master mixu na stanovení GST

Složení	Množství
	Na jednu destičku GREINER
0,1 M Na-fosfátový pufr	15,6 ml
5,15 mM GSH	4 ml
51,5 mM CDNB	0,4 ml

Koncentrace konjugovaného S-2,4-dinitrofenyl-glutathionu byla vypočítána z odečtené absorbance po 1 minutě při 340 nm s použitím molárního absorpčního koeficientu $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a délky měřené vrstvy 0,55 cm. Jednotka enzymové aktivity je definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu 1 μ molu S-2,4-dinitrofenyl-glutathionu za 1 minutu (při použití 1mM GSH a 1mM CDNB). Jednotky enzymové aktivity byly vztaženy na mg proteinu.

Výpočet enzymové aktivity GST (nmol/min/ml):

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) \cdot V_i \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s}$$

ΔA_{vz} absorbance vzorku

ΔA_{sl} absorbance slepého vzorku

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

ε molární absorpční koeficient, tj. $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,55 cm

V_s objem cytosolu, tj. 0,006m

4.2.14 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy

Principem této metody je spektrofotometrické stanovení přeměny žlutého p-nitrofenolu na bezbarvý p-nitrofenolglukuronid za katalýzy UDP-

glukuronosyltransferasy (UGT). Stanovováno je množství nezreagovaného p-nitrofenolu, které je přímo úměrné hodnotě absorbance (Mizuma a kol. 1982).

Použité roztoky:

Substrát: 2,5 mM roztok p-nitrofenolu

- $M_r = 139$ g/mol; navážku 3,5 mg p-nitrofenolu rozpustit v 10 ml redestilované vody

Konjugační činidlo: 10 mM roztok UDP-glukuronové kyseliny (UDP-GA)

- $M_r = 631$ g/mol; navážku 6,46 mg UDP-GA rozpustit v 1 ml redestilované vody

Detergent: Slovasol

- Navážku 50 mg Slovasolu rozpustit v 1 ml redestilované vody

0,5 M TRIS/HCl pufr, pH 7,4

- Navážku 0,5 g TRIS rozpustit v 10 ml redestilované vody, upravit pH 1 M HCl, pak objem doplnit na 15 ml redestilované vody a v celém objemu pufru rozpustit 24,4 mg $MgCl_2$

Deproteinizační roztok: 3% trichloroctová kyselina

Neutralizační roztok: 1 M NaOH

Po rozmražení vzorků supernatantu o předem známé koncentraci bílkoviny bylo odpipetováno potřebné množství vzorku 150 μ l a smícháno s detergentním činidlem Slovasol v poměru detergent:protein 1:2. Mikrozkušavky byly promíchány a ponechány v lednici, kde byly inkubovány po dobu 20 minut. Mezitím do stojánku v ledu byly připraveny mikrozkušavky, každý vzorek byl dělán po 4-5 paralelkách + 3 slepé vzorky. Postupně bylo do každé mikrozkušavky napipetováno dle Tab. 12.

Tab. 12: Složení mikrozkušavek

Složení	Vzorek	Slepý vzorek
0,6 M TRIS/HCl, pH 7,4	40 μ l	40 μ l
2,5 mM p-nitrofenol	20 μ l	20 μ l
10 mM UDP-GA	20 μ l	-
Mikrosomy s detergentem	20 μ l	20 μ l
Redestilovaná voda	-	20 μ l

Mikrozkušavky byly promíchány a dány do Thermomixeru, kde byly inkubovány po dobu 20 minut při teplotě 37 °C a mírném třepání 350 rpm. Po inkubaci

byly mikrozkušavky přendány zpět do ledu a do všech bylo přidáno 50 µl 3% trichloroctové kyseliny. Mikrozkušavky byly promíchány a stočeny na stolní centrifuze (5000 ot/min, 5 min).

Do mikrotitrační destičky GAMA s kulatým dnem bylo napipetováno 50 µl roztoku 1M NaOH (jamky podle počtu vzorků), do první jamky byla napipetována redestilovaná voda. Do jamek s NaOH bylo napipetováno 50 µl inkubační směsi. Nakonec byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 405 nm.

Hodnoty naměřené absorbance vzorků byly odečteny od naměřených hodnot absorbance slepých vzorků. Enzymová aktivita UGT byla vypočítána pomocí molárního absorpčního koeficientu $18,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a délky měřené vrstvy 0,55 cm. Jednotky enzymové aktivity byly vztaženy na mg proteinu.

Výpočet enzymové aktivity UGT (nmol/min/ml):

$$\text{aktivita} = \frac{(\Delta A_{sl} - \Delta A_{vz}) \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot t}$$

ΔA_{vz} absorbance vzorku

ΔA_{sl} absorbance slepého vzorku

ε molární absorpční koeficient, tj. $18,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,55 cm

t čas inkubace, tj. 20 min

4.2.15 Stanovení aktivity sulfotransferasy

Principem této metody je spektrofotometrické stanovení přeměny p-nitrofenylsulfátu na p-nitrofenol, přičemž dochází k přenosu sulfoskupiny z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfátu na 2-naftol za vzniku 2-naftylsulfátu (Frame a kol. 2000).

Použité roztoky:

50 mM draselno-fosfátový pufr, pH 6,5

- připravit 50 mM roztok K_2HPO_4 ($M_r = 174,18 \text{ g/mol}$) a KH_2PO_4 ($M_r = 136,09 \text{ g/mol}$)
- poté slévat přibližně v poměru 1:3 za stálého míchání a upravit pH 6,5

50 mM roztok MgCl_2

- navážku 0,01525 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_r = 203,30 \text{ g/mol}$) rozpustit v 1,5 ml redestilované vody

20 μ M roztok PAP

- 2 mM zamražený zásobní roztok PAP naředit 100x redestilovanou vodou

50 mM roztok p-nitrofenylsulfátu

- navážku 0,01930 g p-nitrofenylsulfátu ($M_r = 257,26$ g/mol) rozpustit 1,5 ml redestilované vody

10 mM roztok 2-naftol

- navážku 0,00144g 2-naftolu ($M_r = 144,17$ g/mol) rozpustit v 1 ml etanolu

STOP roztok: 0,25 M TRIS/HCl pufr, pH 8,7

- navážku 3,0285 g TRIS rozpustit přibližně v 80 ml redestilované vody, upravit pH 1 M HCl na 8,7; objem doplnit na 100 ml redestilovanou vodou

Roztoky byly připraveny vždy čerstvé dle počtu vzorků.

Do 6 jamek mikrotitrační destičky GAMA s kulatým dnem bylo napipetováno 10 μ l neředěného vzorku supernatantu a do posledních 2 jamek v každém sloupci bylo napipetováno 10 μ l 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 jako slepý vzorek. Nakonec bylo do všech jamek multikanálovou pipetou napipetováno 90 μ l master mixu. Destička byla lehce protřepána a byla vložena do Thermomixeru, kde byla inkubována po dobu 10 min při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo do každé jamky multikanálovou pipetou napipetováno 100 μ l stop roztoku (0,25 M TRIS/HCl pufr, pH 8,7). Destička byla lehce protřepána a vložena do spektrofotometru Tecan, kde byla změřena absorbance při vlnové délce 405 nm.

Tab. 13: Složení master mixu na stanovení SULT:

Složení	Množství	
	Na jednu destičku GAMA	Na jednu jamku destičky
50 mM K-fosfátový pufr, pH 6,5	5,9 ml	59 μ l
50 mM MgCl ₂	1 ml	10 μ l
20 μ M PAP	1 ml	10 μ l
50 mM p-nitrofenylsulfát	1 ml	10 μ l
10 mM 2-naftol	100 μ l	1 μ l

Koncentrace vzniklého produktu p-nitrofenolu byla vypočítána z odečtené absorbance při vlnové délce 405 nm s použitím molárního absorpčního koeficientu 18,2 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a délky měřené vrstvy 0,55 cm. Jednotka enzymové aktivity je definována

jako množství enzymu katalyzující vznik 1 μmol p-nitrofenolu za 1 minutu. Jednotky enzymové aktivity byly vztaženy na mg proteinu.

Výpočet enzymové aktivity SULT (nmol/min/ml):

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) \cdot V_i \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s \cdot t}$$

ΔA_{vz} absorbance vzorku

ΔA_{sl} absorbance slepého vzorku

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

ε molární absorpční koeficient, tj. $18,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,55 cm

V_s objem cytosolu, tj. 0,01 ml

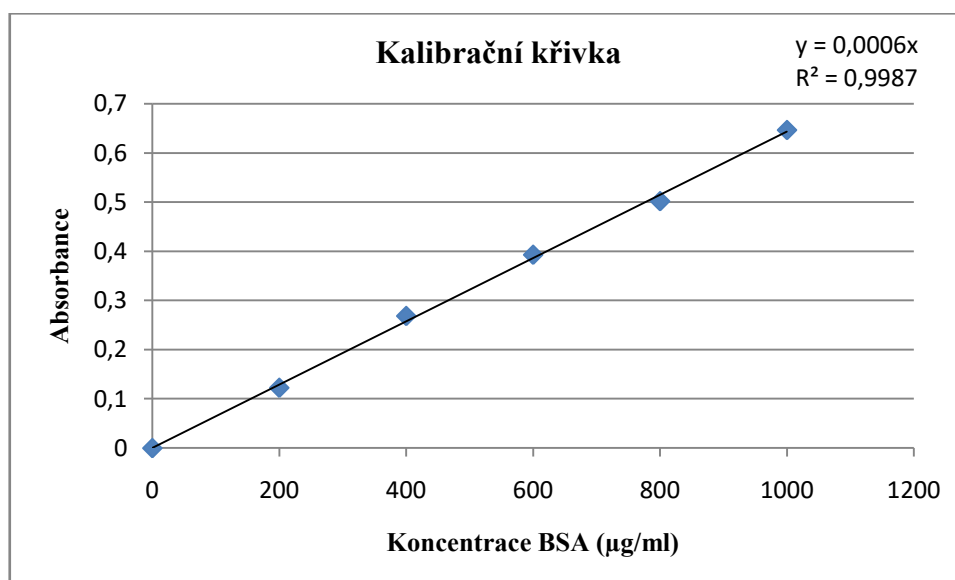
t čas inkubace, tj. 10 min

5 Výsledky

Získané výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu s hladinou významnosti $p < 0,05$ v programu Excel. Hodnoceny byly rozdíly mezi kontrolními (K) a seskviterpeny (CNER, TNER, FAR) ovlivněnými vzorky.

5.1 BCA stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody BCA (Kapitola 4.2.6). Koncentrace proteinů byla stanovena v 10000g supernatantu jaterního homogenátu připraveného z kontrolních a seskviterpeny ovlivněných jaterních řezů po dobu 8 a 24 hodin. Nejprve byla odečtena absorbance kalibračních roztoků a sestrojena kalibrační křivka popisující závislost naměřené absorbance na koncentraci bílkoviny BSA (Obrázek 12).



Obrázek 12 Graf závislosti koncentrace bílkoviny BSA na naměřené absorbanci

Naměřené hodnoty absorbance jednotlivých vzorků byly dosazeny do rovnice lineární regrese $y = 0,0006x$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9987$, vynásobeny zředěním a převedeny na jednotky mg/ml. Vypočítané hodnoty koncentrace bílkoviny (Tab. 14) byly použity pro výpočet specifické aktivity stanovovaných enzymů.

Tab.14: Koncentrace proteinů v kontrolních (K) a seskviterpeny (CNER, TNER, FAR) ovlivněných vzorcích

Vzorek	Koncentrace bílkoviny (mg/ml) ± SD
K 8	1,71 ± 0,05
CNER 8	1,81 ± 0,06
TNER 8	1,68 ± 0,03
FAR 8	1,72 ± 0,09
K 24	1,65 ± 0,09
CNER 24	1,63 ± 0,14
TNER 24	1,42 ± 0,09
FAR 24	1,62 ± 0,14

5.2 Ovlivnění aktivit biotransformačních enzymů seskviterpeny

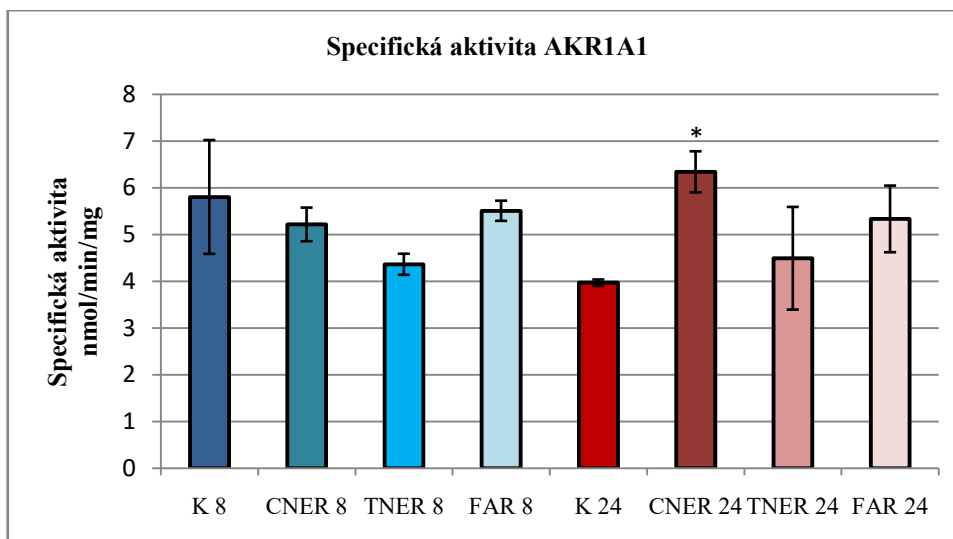
5.2.1 Vliv seskviterpenů na aktivitu AKR1A1

Stanovení specifické aktivity AKR1A1 bylo provedeno pomocí glycerinaldehydu (Kapitola 4.2.8). Z naměřených hodnot absorbance ze tří nezávislých měření byla vypočítána aktivita enzymu. Zjištěná aktivita AKR1A1 byla vztažena na mg proteinu (Kapitola 5.1, Tab. 14). Výsledné hodnoty specifické aktivity AKR1A1 jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 15) a v grafu (Obrázek 13).

Tab. 15: Specifická aktivita AKR1A1 v kontrolních (K) a v ovlivněných vzorcích

Vzorek	Specifická aktivita AKR1A1 (nmol/min/mg) ± SD
K 8	5,81 ± 1,22
CNER 8	5,22 ± 0,36
TNER 8	4,37 ± 0,23
FAR 8	5,51 ± 0,22
K 24	3,97 ± 0,07
CNER 24	6,34 ± 0,44 *
TNER 24	4,49 ± 1,10
FAR 24	5,34 ± 0,71

*Statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou (Studentův t-test, $p < 0,05$)



Obrázek 13 Specifická aktivita AKR1A1 v kontrolních a v ovlivněných vzorcích. Signifikantní změna oproti kontrole je označena * (Studentův t-test, $p < 0,05$)

Z grafu (Obrázek 13) vyplývá, že vzorky ovlivněné CNER vykazovaly po 24 hodinové inkubaci zvýšení enzymové aktivity AKR1A1 oproti kontrolním vzorkům. U ostatních vzorků nedošlo po 8 a 24 hodinové inkubaci ke staticky významnému ovlivnění enzymové aktivity AKR1A1 (Studentův t-test, $p < 0,05$).

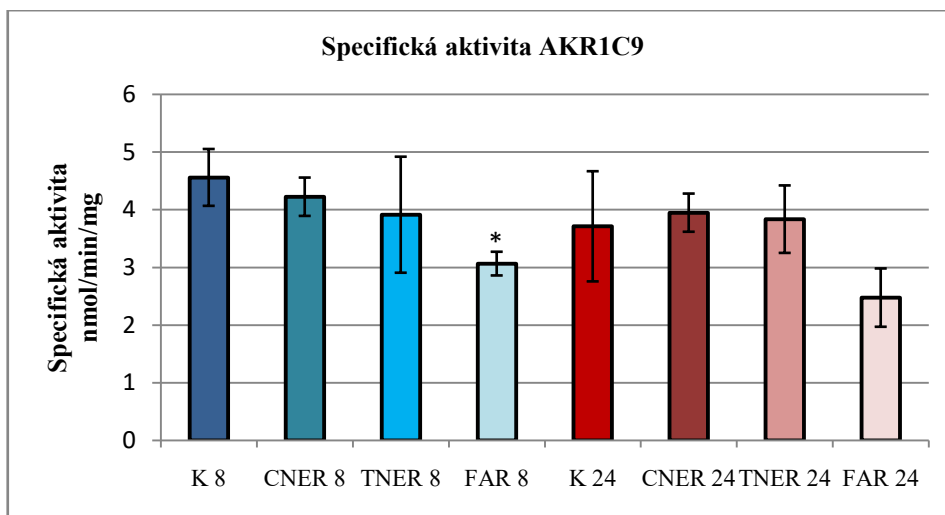
5.2.2 Vliv seskviterpenů na aktivitu AKR1C9

Stanovení specifické aktivity AKR1C9 bylo provedeno pomocí acenaftenolu (Kapitola 4.2.9). Z naměřených hodnot absorbance ze tří nezávislých měření byla vypočítána aktivita enzymu. Zjištěná aktivita AKR1C9 byla vztažena na mg proteinu (Kapitola 5.1, Tab.14). Výsledné hodnoty specifické aktivity AKR1C9 jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 16) a v grafu (Obrázek 14).

Tab. 16: Specifická aktivita AKR1C9 v kontrolních (K) a v ovlivněných vzorcích

Vzorky	Specifická aktivita (nmol/min/mg) \pm SD
K 8	4,56 \pm 0,49
CNER 8	4,23 \pm 0,33
TNER 8	3,91 \pm 1,00
FAR 8	3,07 \pm 0,21 *
K 24	3,71 \pm 0,96
CNER 24	3,95 \pm 0,33
TNER24	3,84 \pm 0,59
FAR 24	2,48 \pm 0,51

*Statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou (Studentův t-test, $p < 0,05$)



Obrázek 14 Specifická aktivita AKR1C9 v kontrolních a v ovlivněných vzorcích. Signifikantní změna oproti kontrole je označena * (Studentův t-test, $p < 0,05$)

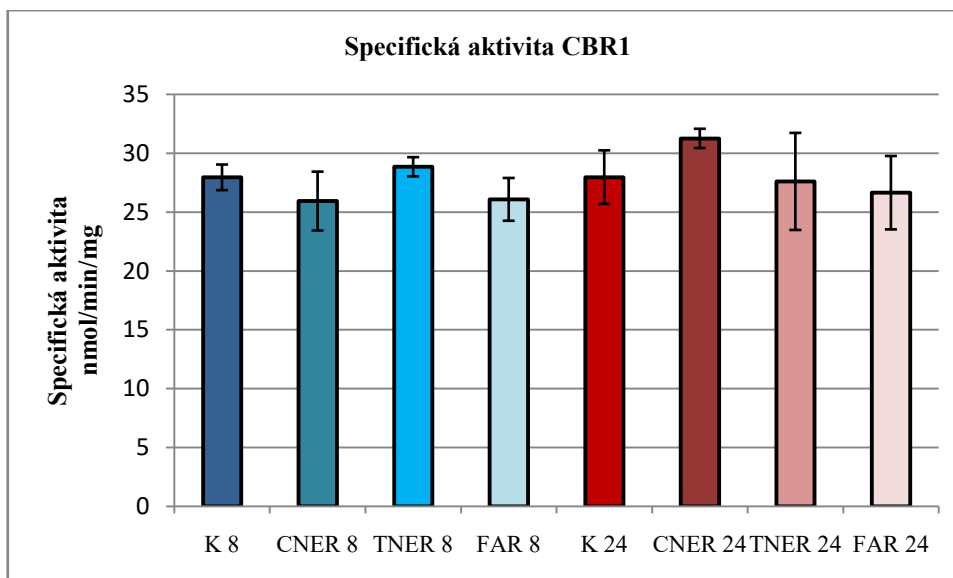
Z grafu (Obrázek 14) vyplývá, že vzorky ovlivněné FAR vykazovaly po 8 hodinové inkubaci statisticky významné snížení enzymové aktivity AKR1C oproti kontrolním vzorkům. U ostatních vzorků nedošlo po 8 a 24 hodinové inkubaci ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity AKR1C9 (Studentův t-test, $p < 0,05$).

5.2.3 Vliv seskviterpenů na aktivitu CBR1

Stanovení specifické aktivity CBR1 bylo provedeno pomocí menadionu (Kapitola 4.2.10). Z naměřených hodnot absorbance ze tří nezávislých měření byla vypočítána enzymová aktivita. Zjištěná aktivita CBR1 byla vztažena na mg proteinu (Kapitola 5.1, Tab. 14). Výsledné hodnoty specifické aktivity CBR1 jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 17) a v grafu (Obrázek 15).

Tab. 17: Specifická aktivita CBR1 v kontrolních (K) a v ovlivněných vzorcích

Vzorek	Specifická aktivita CBR1 (nmol/min/mg) \pm SD
K 8	27,95 \pm 1,09
CNER 8	25,94 \pm 2,50
TNER 8	28,85 \pm 0,81
FAR 8	26,08 \pm 1,82
K 24	27,97 \pm 2,74
CNER 24	31,26 \pm 0,82
TNER 24	27,61 \pm 4,12
FAR 24	26,65 \pm 3,12



Obrázek 15 Specifická aktivita CBR1 v kontrolních a v ovlivněných vzorcích

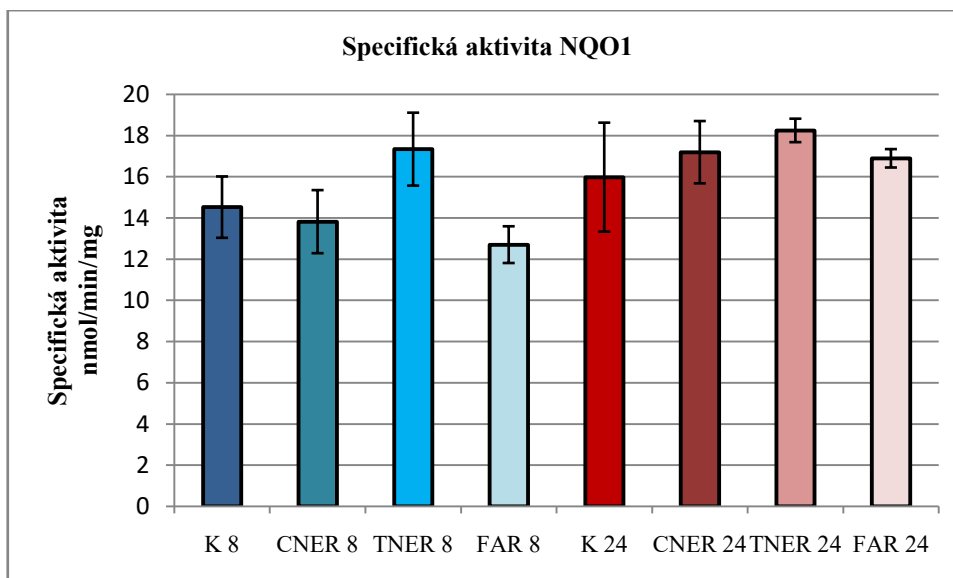
Z grafu (Obrázek 15) vyplývá, že ve vzorcích ovlivněných seskviterpeny nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity CBR1 (Studentův t-test, $p < 0,05$).

5.2.4 Vliv seskviterpenů na aktivitu NQO1

Stanovení specifické aktivity NQO1 bylo provedeno pomocí redukce cytochromu c (Kapitola 4.2.11). Z naměřených hodnot absorbance ze tří nezávislých měření byla vypočítána enzymová aktivita. Zjištěná aktivita NQO1 byla vztažena na 1 mg proteinu (Kapitola 5.1, Tab. 14). Výsledné hodnoty specifické aktivity NQO1 jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 18) a v grafu (Obrázek 16).

Tab. 18: Specifická aktivita NQO1 v kontrolních (K) a v ovlivněných vzorcích

Vzorek	Specifická aktivita NQO1 (nmol/min/mg) \pm SD
K 8	14,53 \pm 1,49
CNER 8	13,82 \pm 1,53
TNER 8	17,34 \pm 1,77
FAR 8	12,71 \pm 0,89
K 24	15,98 \pm 2,65
CNER24	17,20 \pm 1,51
TNER 24	18,25 \pm 0,57
FAR 24	16,90 \pm 0,45



Obrázek 16 Specifická aktivita NQO1 v kontrolních a ovlivněných vzorcích

Z grafu (Obrázek 16) vyplývá, že ve vzorcích ovlivněných seskviterpeny nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity NQO1 (Studentův t-test, $p < 0,05$).

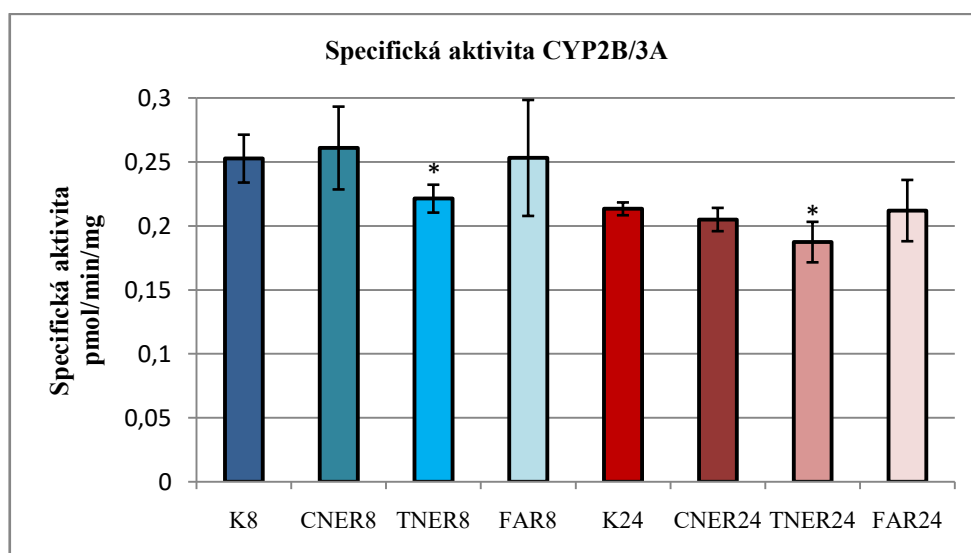
5.2.5 Vliv seskviterpenů na aktivitu isoformů cytochromu P450

Stanovení specifické aktivity CYP bylo provedeno pomocí specifického substrátu, který je charakteristický pro určitou isoformu cytochromu P450 stanovení koncentrace vznikajícího resorufinu (Kapitola 4.2.12). Ve vzorcích byla stanovována aktivita isoformů CYP1A1, CYP1A2, CYP2B/3A. Ve vzorcích byla detekována aktivita CYP2B/3A (BROD aktivita), aktivita ostatních isoformů detekována nebyla. Z naměřených hodnot absorbance ze čtyř nezávislých měření byla vypočítána enzymová aktivita. Zjištěná aktivita CYP2B/3A byla vztažena na mg proteinu (Kapitola 5.1, Tab. 14). Výsledné hodnoty specifické aktivity CYP2B/3A jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 19) a v grafu (Obrázek 17).

Tab. 19: Specifická aktivita CYP2B/3A v kontrolních (K) a v ovlivněných vzorcích

Vzorek	Specifická aktivita CYP3A4/2B (pmol/min/mg) ± SD
K 8	0,25 ± 0,02
CNER 8	0,26 ± 0,03
TNER 8	0,22 ± 0,01 *
FAR 8	0,25 ± 0,04
K 24	0,22 ± 0,01
CNER 24	0,21 ± 0,01
TNER 24	0,19 ± 0,02 *
FAR 8	0,21 ± 0,01

*Statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou (Studentův t-test, $p < 0,05$)



Obrázek 17 Specifická aktivita CYP2B/3A v kontrolních a v ovlivněných vzorcích. Signifikantní změna oproti kontrole je označena * (Studentův t-test, $p < 0,05$)

Z grafu (Obrázek 17) vyplývá, že vzorky ovlivněné TNER po 8 a 24 hodinové inkubaci vykazovaly statisticky významné snížení enzymové aktivity CYP2B/3A oproti kontrolním vzorkům. U ostatních vzorků nedošlo po 8 a 24 hodinové inkubaci ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity CYP2B/3A (Studentův t-test, $p < 0,05$).

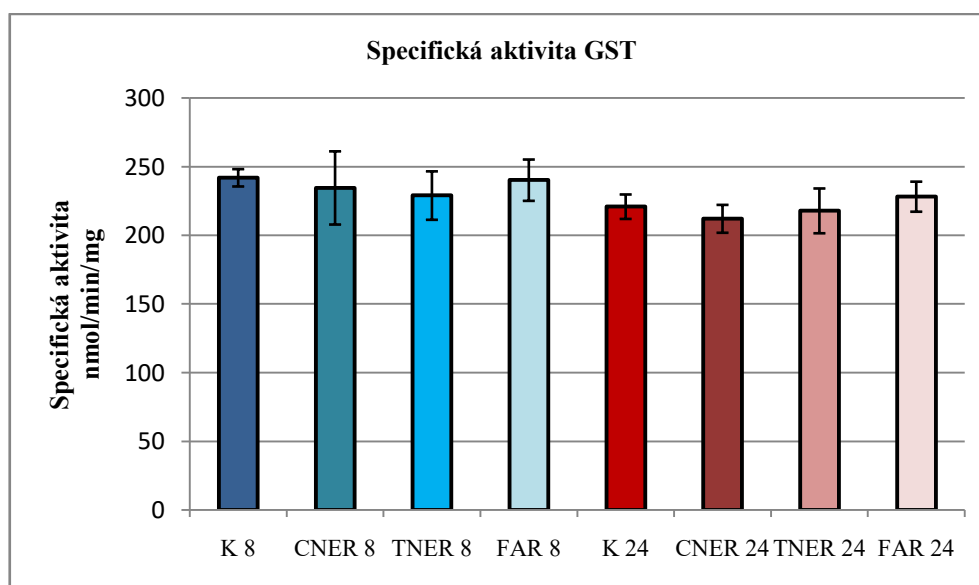
5.2.6 Vliv seskviterpenů na aktivitu GST

Stanovení specifické aktivity GST bylo provedeno pomocí reakce 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu s glutathionem (Kapitola 4.2.13). Z naměřených hodnot absorbance ze tří nezávislých měření byla vypočítána enzymová aktivita. Zjištěná aktivita GST byla

vztažena na mg proteinu (Kapitola 5.1, Tab.14). Výsledné hodnoty specifické aktivity GST jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 20) a v grafu (Obrázek 18).

Tab. 20: Specifická aktivita GST v kontrolních (K) a v ovlivněných vzorcích

Vzorek	Specifická aktivita GST (nmol/min/mg) ± SD
K 8	242,02 ± 6,31
CNER 8	234,64 ± 26,66
TNER 8	229,08 ± 17,65
FAR 8	240,28 ± 15,05
K 24	220,97 ± 8,91
CNER 24	212,15 ± 10,15
TNER 24	217,94 ± 16,31
FAR 24	228,27 ± 10,94



Obrázek 18 Specifická aktivita GST v kontrolních a v ovlivněných vzorcích

Z grafu (Obrázek 18) vyplývá, že ve vzorcích ovlivněných seskviterpeny nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity GST (Studentův t-test, $p < 0,05$).

5.2.7 Vliv seskviterpenů na aktivitu UGT

Stanovení specifické aktivity UGT bylo provedeno pomocí konjugace p-nitrofenolu s kyselinou UDP-glukuronovou (Kapitola 4.2.14). V žádném vzorku nebyla aktivita UGT detekována.

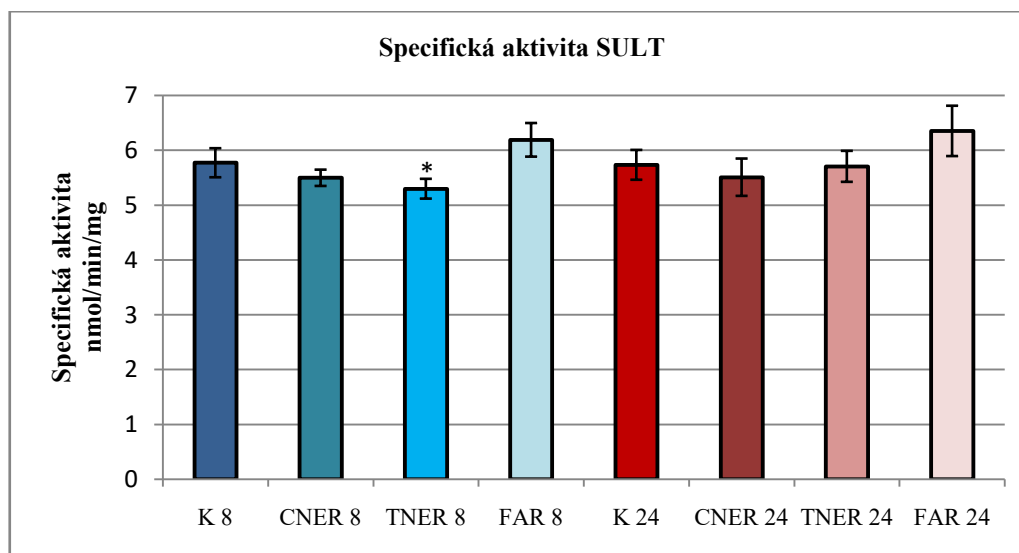
5.2.8 Vliv seskviterpenů na aktivitu SULT

Stanovení specifické aktivity SULT bylo provedeno pomocí přeměny p-nitrofenylsulfátu na p-nitrofenol (Kapitola 4.2.15). Z naměřených hodnot absorbance ze čtyř nezávislých měření byla vypočítána enzymová aktivita. Zjištěná aktivita SULT byla vztažena na mg proteinu (Kapitola 5.1, Tab. 14). Výsledné hodnoty specifické aktivity SULT jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 21) a v grafu (Obrázek 19).

Tab. 21: Specifická aktivita SULT v kontrolních (K) a v ovlivněných vzorcích

Vzorek	Specifická aktivita SULT (nmol/min/mg) \pm SD
K 8	5,77 \pm 0,26
CNER 8	5,50 \pm 0,15
TNER 8	5,30 \pm 0,18 *
FAR 8	6,19 \pm 0,31
K 24	5,74 \pm 0,27
CNER 24	5,51 \pm 0,34
TNER 24	5,71 \pm 0,28
FAR 24	6,35 \pm 0,46

*Statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou (Studentův t-test, $p < 0,05$)



Obrázek 19 Specifická aktivita SULT v kontrolních a v ovlivněných vzorcích. Signifikantní změna proti kontrole je označena * (Studentův t-test, $p < 0,05$)

Z grafu (Obrázek 19) vyplývá, že vzorky ovlivněné TNER po 8 hodinové inkubaci vykazovaly statisticky významné snížení enzymové aktivity SULT oproti kontrolním vzorkům. U ostatních vzorků nedošlo po 8 a 24 hodinové inkubaci

ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity SULT (Studentův t-test, $p < 0,05$).

6 Diskuze

Seskviterpeny jsou přírodní látky, jedná se o sekundární metabolity produkované vyššími rostlinami, ale také se nachází v houbách a bezobratlých živočiších. Řada seskviterpenů vykazuje zajímavé biologické vlastnosti, jsou využívány v tradiční medicíně, jsou součástí potravinových doplňků a kosmetických výrobků. Seskviterpeny jsou slibnými kandidáty při objevování nových léčiv. Byly u nich popsány protizánětlivé, antiparazitické, protinádorové, antibakteriální účinky. Na druhou stranu některé seskviterpeny mohou působit toxicky a mít další nežádoucí účinky, proto je nutné studovat jejich mechanismus účinku, metabolismus a vliv na biotransformační enzymy a tím na metabolismus současně podávaných léčiv. Jsou využívány pro své biologické vlastnosti samostatně nebo v kombinaci, např. s doxorubicinem, kde potencují jeho účinek (Bártíková a kol. 2014, Ambrož a kol. 2015).

Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv seskviterpenů (*cis*-nerolidolu, *trans*-nerolidolu, farnesolu) na vybrané biotransformační enzymy v ultratenkých jaterních řezech. Byla sledována aktivita enzymů I. fáze biotransformace (AKR1A1, AKR1C9, CBR1, NQO1, CYP) a II. fáze biotransformace (GST, SULT, UGT). Všechny tyto enzymy se podílí na biotransformaci řady xenobiotik (včetně léčiv), a proto jejich indukce nebo inhibice by mohla mít negativní důsledky pro pacienta.

Seskviterpeny jsou lipofilní sloučeniny s potenciálem inhibovat enzymy metabolizující léčiva. Informace o jejich potencionálních inhibičních účincích jsou však omezené. Studie byly hlavně zaměřené na cytochrom P450, jelikož je nejčastěji metabolizujícím enzymem. Deset seskviterpenů izolovaných z oddenku *Curcuma aromatica* bylo vyhodnoceno jako inhibitory cytochromu P450, např. (4S, 5S)-(+)-germakon-4,5-epoxid inhiboval některé isoformy CYP velmi silně už při koncentraci 1 μM (Bamba a kol. 2011). Další seskviterpen alantolakton vykazoval silný inhibiční účinek na aktivitu CYP3A4 v koncentraci 3,6 μM na lidské jaterní mikrosomy (Qin a kol. 2015). Seskviterpeny zederon a germakron mírně inhibovaly CYP2B6 a CYP3A4 v lidských jaterních mikrosomech (Pimkaew a kol. 2013). Cedrol, β -cedren, thujopsen, bioaktivní seskviterpeny nalezené v cedrové silici, vykazovaly inhibici některých isoform CYP v lidských jaterních mikrosomech (Jeong a kol. 2014). V další studii (Deng a kol. 2008) bylo zjištěno, že seskviterpen bilobalid obsažený v *Ginkgo biloba* má vliv na aktivitu CYP, zvyšuje aktivitu CYP3A1, -1A2, -2E1, -2B1/2 v závislosti na dávce. V diplomové práci byly stanovovány čtyři isoformy cytochromu P450 (1A1,

1A2, 2B, 3A), byla detekována jen BROD aktivita (CYP2B/3A), aktivita ostatních isoformů CYP450 nebyla detekována. Bylo zjištěno, že TNER po 8 a 24 hodinové inkubaci působil mírný pokles aktivity CYP2B/3A, ale žádný statisticky významný vliv na aktivitu při inkubaci s CNER a FAR nebyl pozorován.

Cytochrom P450 není jediným enzymem podílejícím se na I. fázi biotransformace. Na této fázi se také podílejí enzymy redukující karbonylovou nebo chinonovou skupinu. Tyto skupiny mohou podporovat oxidační stres, jehož produkty jsou považovány za významný iniciační faktor degenerativních onemocnění nebo rakoviny. Tyto reductasy vykazují široké a překrývající se substrátové specifity, mají ochrannou funkci vůči xenobiotickým karbonylům a chinonům (Špičáková a kol. 2017). Jediná studie (Špičáková a kol. 2017), která se zabývala vlivem CNER, TNER, FAR na redukční enzymy *in vitro* v lidských a potkaních subcelulárních frakcích, zjistila, že tyto seskviterpeny nevykazují žádný inhibiční účinek na aktivitu AKR1A1, AKR1C, CBR1 a NQO1. V jiné studii (Lněničková a kol. 2017) vykazoval enzym CBR1 snížení aktivity po 6 hodinách působení TNER a po 24 hodinách vykazoval zvýšení enzymové aktivity oproti kontrole, studie probíhala *in vivo* na myším modelu. Aktivita NQO1 nebyla seskviterpeny ovlivněna, u AKR1C došlo po 24 hodinách od podání myším ke zvýšení aktivity. Vlivu seskviterpenů na aktivitu redukčních enzymů se mnoho studií nezabývá, proto jsou stále předmětem ke zkoumání. V diplomové práci byly studovány redukční enzymy I. fáze biotransformace: AKR1A1, AKR1C9, CBR1, NQO1. Bylo zjištěno, že AKR1A1 po 24 hodinové inkubaci s CNER, vykazoval tento enzym zvýšení aktivity oproti kontrole. U AKR1C9 bylo pozorováno mírné snížení enzymové aktivity po 8 hodinové inkubaci s FAR. Studované seskviterpeny neměly žádný významný vliv na aktivitu CBR1 a NQO1.

Enzymy II. fáze biotransformace jsou nejméně prozkoumané z hlediska vlivu studovaných seskviterpenů. Pouze Špičáková a kol. (2017) se zabývala vlivem seskviterpenů na konjugační enzymy v subcelulárních frakcích člověka a potkana. Byl studován vliv CNER, TNER, FAR na tyto enzymy, nebyl zjištěn žádný vliv na GST, UGT, SULT. Ve studii Lněničkové a kol. (2017) byla pozorována změna aktivity SULT, došlo ke zvýšení aktivity v játrech myši po *in vivo* podání seskviterpenů. V diplomové práci nebyl vliv seskviterpenů na aktivitu konjugačního enzymu GST v jaterních řezech statisticky významný. U konjugačního enzymu SULT byl detekován mírný pokles enzymové aktivity po 8 hodinové inkubaci s TNER. Aktivita UGT nebyla

vůbec detekována. Znalost vlivu seskviterpenů na enzymy II. fáze je důležitá, protože tyto enzymy jsou zodpovědné za snížení toxicity xenobiotik.

Výsledky diplomové práce poukazují na možnost vlivu některých seskviterpenů na aktivitu biotransformačních enzymů. Pozorovaný indukční nebo inhibiční vliv na biotransformační enzymy v jaterních řezech potkana byl v některých případech signifikantní, ale z farmakologického hlediska není nebezpečný. Nutné je brát také v úvahu, že naměřené hodnoty aktivity měly relativně vysoké směrodatné odchylky. Příčinou může být ztráta aktivity už při přípravě jaterních řezů např. poškozením řezu nebo může dojít k vyplavení proteolytických enzymů, které degradují enzymy I. a II. fáze biotransformace. Výsledky, které byly získány, pocházejí z *in vitro* experimentů, tyto výsledky musí být ověřeny *in vivo*, aby mohly být potvrzeny nebo vyvráceny. Dále se musí brát v úvahu, že se pracovalo s biologickým materiálem, který pocházel od více probandů, kteří se od sebe mohli lišit. Získané výsledky je potřebné ověřit i na lidských vzorcích, aby se vyloučily mezidruhové rozdíly.

Do budoucna je nutné se věnovat studiu přírodních látek a jejich vlivu na metabolismus. Pro běžné a bezpečné užívání přírodních látek jako doplňků stravy jsou nezbytné informace o jejich působení na biotransformační enzymy. Tyto informace slouží hlavně k odhalení potencionálních interakcí mezi přírodními látkami a léčivy. Výsledky takovýchto studií jsou významné z hlediska minimalizace rizik pro pacienta a maximalizace účinků léčiv.

7 Závěr

V rámci diplomové práce byl zjištěn vliv tří seskviterpenů (*cis*-nerolidolu, *trans*-nerolidolu a farnesolu) na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů.

Z jater potkana byly vytvořeny ultratenké precizní řezy o průměru 8 mm a tloušťce 200-250 μm , které byly inkubovány se seskviterpeny po dobu 8 a 24 hodin. V ovlivněných a kontrolních řezech byla sledována aktivita enzymů I. fáze a II. fáze biotransformace.

- U AKR1A1 bylo pozorováno zvýšení enzymové aktivity po 24 hodinové inkubaci s CNER.
- U AKR1C bylo pozorováno mírné snížení enzymové aktivity po 8 hodinové inkubaci s FAR.
- U SULT bylo pozorováno snížení enzymové aktivity po 8 hodinové inkubaci TNER.
- U CYP2B/3A (BROD aktivita) bylo pozorováno mírné snížení enzymové aktivity po 8 a 24 hodinové inkubaci s TNER.

Žádná další změna aktivity oproti kontrole nebyla detekována po 8 a 24 hodinové inkubaci s vybranými seskviterpeny.

8 Seznam zkratek

AKR	aldo-ketoreduktasa
BCA	kyselina bicinchoninová
BROD	benzyloxyresorufin-O-dealkylasa
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CBR	karbonylreduktasa
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CNER	<i>cis</i> -nerolidol
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraacetát
EROD	ethoxyresorufin-O-deethylasa
FAR	farnesol
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
K	kontrolní vzorek
MAPEG	<i>membráně-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>
MROD	methoxyresorufin-O-demethylasa
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NQO 1	NADPH: chinonoxidoreduktasa 1
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
SD	směrodatná odchylka
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
SULT	sulfotranferasa
TNER	<i>trans</i> -nerolidol
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	uridindifosfát
UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa

9 Citovaná literatura

Ambrož, M.; Boušová, I.; Skarka, A.; Hanušová, V.; Králová, V.; Matoušková, P.; Szotáková, B.; Skálová, L. The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation on cancer cells. *Molecules* 2015, roč. 20, č. 8, s. 15343-15358, ISSN 1420-3049, doi: 10.3390/molecules200815343.

Ashida, H.; Fukuda, I.; Yamashita, T.; Kanazawa, K. Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett.* 2000, roč. 476, č. 3, s. 213-217, ISSN 1873-3468, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01730-0.

Bach, P.H.; Vickers, A.E.M.; Fisher, R.; Baumann, A.; Brittebo, E.; Carlile, D.J.; Koster, H.J.; Lake, B.G.; Salmon, F.; Sawyer, T.W.; Skibinski, G. The use of tissue slices for pharmacotoxicology studies; The report and recommendations of ECVAM Workshop 20. *Altern. Lab. Anim.* 1996, roč. 24, č. 6, s. 893-923, ISSN 0261-1929.

Bamba, Y.; Yun, Y.S.; Kunugi, A.; Inoue, H. Compounds isolated from *Curcuma aromatica* Salisb. Inhibit human P450 enzymes. *J. Nat. Med.* 2011, roč. 65, č. 3-4, s. 583-587, ISSN 1340-3443, doi: 10.1007/s11418-011-0507-0.

Barski, O.A.; Gabbay, K.H.; Bohren, K.M. Characterization of the human aldehyde reductase gene and promoter. *Genomics* 1999, roč. 60, č. 2, s. 188-198, ISSN 0888-7543, doi: 10.1006/geno.1999.5915

Bártíková, H.; Hanušová, V.; Skálová, L.; Ambrož, M.; Boušová, I. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Curr. Top. Med. Chem.* 2014, roč. 14, č. 22, s. 2478-2494, ISSN 1568-0266, doi: 10.2174/15680266141203120833.

Benson, A.M.; Hunkeler, M.J.; Talalay P. Increase of NAD(P)H: quinone reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980, roč. 77, č. 9, s. 5216-5220, ISSN 0027-8424.

Červenková, K.; Belejová, M.; Veselý, J.; Chmela, Z.; Rypka, M.; Ulrichová, J.; Modrianský, M.; Maurel, P. Cell suspensions, cell cultures, and tissue slices - important metabolic *in vitro* systems. *Biomed. Pap.* 2001, roč. 145, č. 2, s. 57-60, ISSN 1213-8118, doi: 10.5507/bp.2001.012.

de Graaf, I.A.M.; Olinga, P.; de Jager, M.H.; Merema, M.T.; de Kanter, R.; van de Kerkhof, E.G.; Groothuis, G.M.M. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat. Protoc.* 2010, roč. 5, č. 9, s. 1540-1551, ISSN 1754-2189, doi: 10.1038/nprot.2010.111.

de Graaf, I.A.M.; Groothuis, G.M.M.; Olinga, P. Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2007, roč. 3, č. 6, s. 879-898, ISSN 1742-5255, doi: 10.1517/17425255.3.6.879.

Deng, Y.; Bi, H.C.; Zhao, L.Z.; He, F.; Liu, Y.Q.; Yu, J.J.; Ou, Z.M.; Ding, L.; Chen, X.; Huang, Z.Y.; Zhou, S.F. Induction of cytochrome P450s by terpene trilactones and flavonoids of the *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in rats. *Xenobiotica* 2008, roč. 38, č. 5, s. 465-481, ISSN 0049-8254, doi: 10.1080/00498250701883233.

Dinkova-Kostova, T.; Talalay, P. NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, roč. 501, č. 1, s. 116-123, ISSN 0009-2797, doi: 10.1016/j.abb.2010.03.019.

Dostálek M., Janoščíková E., Juřica J., Zahradníková L. Farmakokinetika. *Praha: Grada Publishing a.s.* 2006, s. 107-138, ISSN 80-247-1464-7.

El-Kabbani, O.; Podjarny, A. Selectivity determinants of the aldose and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, roč. 64, č. 15, s. 1970-1978, ISSN 1420-682x, doi: 10.1007/s00018-007-6514-3.

Ferreira, F.M.; Palmeira, C.M.; Oliveira, M.M.; Santos, D.; Simões, A.M.; Rocha S.M.; Coimbra, M.A.; Peixoto, F. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicol. In Vitro* 2012, roč. 26, č. 2, s. 189-196, ISSN 0887-2333, doi: 10.1016/j.tiv.2011.11.009.

Fisher, R.L.; Vickers, A.E.M. Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica* 2013, roč. 43, č. 1, s. 8-14, ISSN 0049-8254, doi: 10.3109/00498254.2012.728013.

Forrest, G.L.; Gonzales B. Carbonyl reductase. *Chem. Biol. Interact.* 2000, roč. 129, č. 1-2, s. 21-40, ISSN 0009-2797, doi: 10.1016/S0009-2797(00)00196-4.

Frame, L.T.; Ozawa, S.; Nowell, S.A.; Chou, H.C.; DeLongchamp, R.R.; Doerge, D.R.; Lang, N.P.; Kadlubar, F.F. A simple colorimetric assay for phenotyping the major human thermostable phenol sulfotransferase (SULT1A1) using platelet cytosols. *Drug Metab. Dispos.* 2000, roč. 28, č. 9, s. 1063-1068, ISSN 1521-009x.

Gamage, N.; Barnett, A.; Hempel, N.; Duggleby, R.G.; Windmill, K.F.; Martin, J.L.; McManus, M.E. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci.* 2005, roč. 90, č. 1, s. 5-22, ISSN 1096-6080, doi: 10.1093/toxsci/kfj061.

Graham J.M. Homogenization of mammalian tissues. *ScientificWorldJournal* 2002, roč. 2, s. 1626-1629, ISSN 1537-744x, doi: 10.1100/tsw.2002.849.

Chan, W.K.; Tan, L.T.H.; Chan, K.G.; Lee, L.H.; Goh, B.H. Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules* 2016, roč. 21, č. 5, s. 529, ISSN 1420-3049, doi: 10.3390/molecules21050529.

Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap.* 2010, roč. 154, č. 2, s. 103-116, ISSN 1213-8118, doi: 10.5507/bp.2010.017.

Jeong, H.U.; Kwon, S.S.; Kong, T.Y.; Kim, J.H.; Lee, H.S. Inhibitory effects of cedrol, beta-cedrene, and thujopsene on cytochrome P450 enzyme activities in human liver microsomes. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 2014, roč. 77, č. 22-24, s. 1522-1532, ISSN 0098-4108, doi: 10.1080/15287394.2014.955906.

Joo, J.H.; Jetten, A.M. Molecular mechanism involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 2010, roč. 287, č. 2, s. 123-135, ISSN 0304-3835, doi: 10.1016/j.canlet.2009.05.015.

Kousalová, L.; Baranová, J.; Anzenbacher, P. Lékové interakce na úrovni cytochromu P450 - Část I. interakce na úrovni CYP3A4. *Klin. Farmakol. Farm.* 2003, roč. 17, č. 3, s. 151-157, ISSN 1212-7973.

Krumdieck, C.L. Development of a live tissue microtome: reflections of an amateur machinist. *Xenobiotica* 2013, roč. 43, č. 1, s. 2-7, ISSN 0049-8254, doi: 10.3109/00498254.2012.724727.

Lapczynski, A.; Bhatia, S.P.; Letizia, C.S.; Api, A.M. Fragrance material review on farnesol. *Food Chem. Toxicol.* 2008, roč. 46, č. 11, s. 149-156, ISSN 0278-6915, doi: 10.1016/j.fct.2008.06.046.

Lake, B.G; Price R. Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica* 2013, roč. 43, č. 1, s. 41-53, ISSN 0049-8254, doi: 10.3109/00498254.2012.734643.

Lněničková, K.; Svobodová, H.; Skálová, L.; Ambrož, M.; Novák, F.; Matoušková, P. The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol on xenobiotic-metabolizing enzymes in mice *in vivo*. *Xenobiotica* 2017, s. 1-9, ISSN 0049-8254, doi: 10.1080/00498254.2017.1398359.

Martignoni, M.; Groothuis, G.M.; de Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2006, roč. 2, č. 6, stránky s. 875-894, ISSN 1742-5255, doi: 10.1517/17425255.2.6.875.

Maté, L.; Virkel, G.; Lifschitz, A.; Ballent, M.; Lanusse, C. Hepatic and extra-hepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep. *Biochem. Pharmacol.* 2008, roč. 76, č. 6, s. 773-783, ISSN 0006-2952, doi: 10.1016/j.bcp.2008.07.002.

Miura, T.; Taketomi, A.; Nishinaka, T.; Terada, T. Regulation of human carbonyl reductase 1 (CBR1, SDR21C1) gene by transcription factor Nrf2. *Chem. Biol. Interact.* 2013, roč. 202, č. 1-3, s. 126-135, ISSN 0009-2797, doi: 10.1016/j.cbi.2012.11.023.

Mizuma, T.; Machida, M.; Hayashi, M.; Awazu, S. Correlation of drug conjugative metabolism rates between *in vivo* and *in vitro*: glucuronidation and sulfation of p-nitrophenol as a model compound in rat. *J. Pharmacobio-dyn.* 1982, roč. 5, č. 10, s. 811-817, ISSN 1881-1353, doi: 10.1248/bpb1978.5.811.

Neto, J.D.N.; de Almeida, A.A.C.; da Silva Oliveira, J.; dos Santos, P.S.; de Sousa D.P.; de Freitas, R.M. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. *Neurochem. Res.* 2013, roč. 38, č. 9, s. 1861-1870, ISSN 0364-3190, doi: 10.1007/s11064-013-1092-2.

Ohara, H.; Miyabe, Y.; Deyashiki, Y.; Matsuura, K.; Hara, A. Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver. *Biochem. Pharmacol.* 1995, roč. 50, č. 2, s. 221-227, ISSN 0006-2952, doi: 10.1016/0006-2952(95)00124-I.

Parkinson A., 2001. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxikology: the basic science of poisons. (Kaassen C.D., ed.), New York: McGraw-Hill 2001, vyd. 6, s. 133-224, ISSN 9780071124539.

Paduch, R.; Kandefler-Szerszeń, M.; Trytek, M.; Fiedurek, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2007, roč. 55, č. 5, s. 315-327, ISSN 0004-069x, doi: 10.1007/s00005-007-0039-1.

Persson, B.; Kallberg, Y. Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem. Biol. Interact.* 2013, roč. 202, č. 1-3, s. 111-115, ISSN 0009-2797, doi: 10.1016/j.cbi.2012.11.009.

Pilka, E.S.; Niesen F.H.; Lee W.H.; El-Hawari, Y.; Dunford J.E.; Kochan, G.; Wsól, V.; Martin, H.J.; Maser, E.; Oppermann, U. Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. *PLoS ONE* 2009, roč. 4, č. 10, s. 7113, ISSN 1932-6203, doi: 10.1371/journal.pone.0007113.

Pimkaew, P.; Kubleck, J.; Petsalo, A.; Jukka, J.; Suksamrarn, A.; Juvonen, R.; Auriola, S.; Piyachaturawat, P.; Honkakoski, P. Interactions of sesquiterpenes zederone and germacrene with the human cytochrome P450 systém. *Toxicol. In Vitro* 2013, roč. 27, č. 6, s. 2005-2012, ISSN 0887-2333, doi: 10.1016/j.tiv.2013.07.004.

Qin, C.Z.; Lv, Q.L.; Wu, N.Y.Y.; Cheng, L.; Chu, Y.C.; Chu, T.Y.; Cheng, Y.; Zhang, X.; Zhou, H.H. Mechanism-based inhibition of Alantolactone on human cytochrome P450 3A4 *in vitro* and activity of hepatic cytochrome P450 in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2015, roč. 168, s. 146-149, ISSN 0378-8741, doi: 10.1015/j.jep.2015.03.061.

Rižner, T.L.; Penning, T.M. Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids* 2014, roč. 79, s. 49-63, ISSN 0039-128x, doi: 10.1016/j.steroids.2013.10.012.

Ross, D.; Kepa, J.K.; Winski, S.L.; Beall, H.D.; Anwar, A.; Siegel, D. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and

genetic polymorphisms. *Chem. Biol. Interact.* 2000, roč. 129, č. 1-2, s. 77-97, ISSN 0009-2797, doi: 10.1016/S0009-2797(00)00199-X.

Saidi, S.; Luitaud, C.; Rouabhia, M. *In vitro* synergistic effect of farnesol and human gingival cells against *Candida albicans*. *Yeast* 2006, roč. 23, č. 9, s. 673-687, ISSN 1097-0061, doi: 10.1002/yea.1389.

Siegel, D.; Gustafson, D.L.; Dehn, D.L.; Han, J.Y.; Boonchoong, P.; Berliner, L.J.; Ross, D. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol. Pharmacol.* 2004, roč. 65, č. 5, s. 1238-1247, ISSN 0026-895x, doi: 10.1124/mol.65.5.1238.

Siegel, D.; Yan, Ch.; Ross, D. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem. Pharmacol.* 2012, roč. 83, č. 8, s.1033-1040, ISSN 0006-2952, doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.017.

Skálová, L.; Boušová, I. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 2011, vyd. 1. Praha: Karolinum, s. 21-79, ISSN 978-80-246-1917-0

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985, roč. 150, č. 1, s. 76-85, ISSN 0003-2697, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Sperotto, A.R.M.; Moura, D.J.; Péres, V.F.; Damasceno, F.C.; Caramão, E.B.; Henriques, J.A.P.; Saffi, J. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food Chem. Toxicol.* 2013, roč. 57, s. 57-68, ISSN 0278-6915, doi: 10.1016/j.fct.2013.03.013.

Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* 1999, roč. 93, stránky s. 229-237.

Špičáková, A.; Szotáková, B.; Dimunová, D.; Myslivečková, Z.; Kubíček, V.; Ambrož, M.; Lněničková, K.; Krasulová, K.; Anzenbacher, P.; Skálová, L. Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome P450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules* 2017, roč. 22, č. 4, s. 509, ISSN 1420-3049, doi: 10.3390/molecules22040509

Tukey, R.H.; Strassburg C.P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000, roč. 40, č. 1, s. 581-616, ISSN 0362-1642, doi: 10.1146/annurevpharmtox.40.1.581.

Xu, Ch.; Li, C.Y.T.; Kong, A.N.T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* 2005, roč. 28, č. 3, s. 249-268, ISSN 0253-6269, doi: 10.1007/BF02977789.

Ye, L.; Zhang, Y. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 2001, roč. 22, č. 12, s. 1987-1992, ISSN 1460-2180, doi: 10.1093/carcin/22.12.1987.

Zuber, R.; Anzenbacherová, E.; Anzenbacher, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J. Cell. Mol. Med.* 2002, roč. 6, č. 2, s. 189-198, ISSN 1582-1838, doi: 10.1111/j.1582-4934.2002.tb00186.x.

Internetové zdroje:

web 1: Obrázek 1 Chemická struktura farnesolu [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02101680&country=56>

web 2: Obrázek 4 Katalytický cyklus CYP450 [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~m21/thesis/node49.html>