

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Modulační účinek humulenu, karyofylenu a karyofylenoxidu na
vybrané biotransformační enzymy v lidských jaterních buňkách

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

Hradec Králové, 2018

Bc. Veronika Trnčáková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při vypracování této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Martinovi Ambrožovi, Ph.D., Ing. Petře Matouškové, Ph.D. a Mgr. Kateřině Lněničkové, Ph.D. za pomoc při experimentální práci. Chtěla bych poděkovat své rodině za podporu při studiu. Dále bych chtěla poděkovat za finanční podporu grantu GAČR 18-09946S.

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

V Hradci Králové dne 10. května 2018

.....

Bc. Veronika Trnčáková

Obsah

1	ABSTRAKT	7
2	ABSTRACT	8
3	ÚVOD.....	9
4	SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ.....	10
4.1	Terpenoidy	10
4.1.1	Seskviterpeny.....	12
4.1.2	Monocyklické seskviterpeny	13
4.1.2.1	α -Humulen.....	13
4.1.3	Bicyklické seskviterpeny	14
4.1.3.1	β -Karyofylen.....	14
4.1.3.2	β -Karyofylenoxid	16
4.2	Biotransformační enzymy	17
4.2.1	Enzymy 1. fáze biotransformace	18
4.2.1.1	Cytochromy P450	18
4.2.2	Vybrané biotransformační enzymy.....	20
4.2.2.1	CYP3A4	20
4.2.2.2	CYP2B6.....	20
4.2.2.3	CYP2C.....	20
4.2.2.4	AKR1C.....	21
4.2.2.5	CBR1	21
4.3	Jaterní řezy	22
5	CÍL PRÁCE.....	25
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
6.1	Chemikálie, přístroje, biologický materiál.....	26
6.1.1	Chemikálie	26

6.1.2	Přístroje.....	27
6.1.3	Biologický materiál.....	28
6.2	Příprava ultratenkých jaterních řezů	29
6.2.1	Příprava Krebsova – Henseleitova pufru	29
6.2.2	Příprava media William's E + glutaMAX (Gibco)	30
6.2.3	Preinkubace a inkubace ultratenkých řezů.....	32
6.3	Stanovení proteinové exprese	33
6.3.1	Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blot.....	33
6.3.1.1	Zásobní roztoky pro ředění vzorků.....	33
6.3.1.2	BCA stanovení bílkoviny	34
6.3.2	Elektroforéza a Western blot	36
6.3.2.1	Zásobní roztoky pro elektroforézu	36
6.3.2.2	Příprava gelu.....	37
6.3.2.3	Denaturující elektroforéza	38
6.3.3	Imunobloting.....	40
6.3.3.1	Zásobní roztok na imunobloting.....	40
6.3.4	Chemiluminiscenční detekce proteinů.....	41
6.3.4.1	Zásobní roztoky na detekci proteinů	41
6.4	Stanovení genové exprese	44
6.4.1	Izolace RNA Trizolem.....	44
6.4.2	Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem.....	45
6.4.3	Ošetření DNAsou.....	46
6.4.3.1	Zásobní roztoky pro ošetření DNAsou.....	46
6.4.4	Reverzní transkripce	47
6.4.4.1	Reagencie pro reverzní transkripci.....	47
6.4.5	Kvantitativní PCR v reálném čase	48
6.4.5.1	Reagencie pro kvantitativní PCR v reálném čase.....	48

7	VÝSLEDKY.....	51
7.1	Vliv humulenu, β -karyofylenu a karyofylenoxidu na expresi mRNA.....	51
7.1.1	Způsob vyhodnocení dat genové exprese	51
7.1.2	Vliv délky inkubace studovaných látek na genovou expresi.....	54
7.1.3	Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi AKR1C	55
7.1.4	Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi CBR1	56
7.1.5	Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi CYP2C.....	57
7.1.6	Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi CYP3A4.....	58
7.1.7	Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi CYP2B6.....	59
7.2	Vliv humulenu, β -karyofylenu a karyofylenoxidu na proteinovou expresi	60
7.2.1	Způsob vyhodnocení dat proteinové exprese.....	60
7.2.2	Vliv HUM, KAR a CAO na proteinovou expresi AKR1C3.....	62
7.2.3	Vliv HUM, KAR a CAO na proteinovou expresi CBR1	63
7.2.4	Vliv HUM, KAR a CAO na proteinovou expresi CYP2C	65
7.2.5	Vliv HUM, KAR a CAO na proteinovou expresi CYP3A4.....	66
7.2.6	Srovnání interindividuální variability v proteinové expresi	68
8	DISKUZE.....	69
9	ZÁVĚR.....	74
10	SEZNAM TABULEK	77
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	78

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Bc. Veronika Trnčáková

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

Název diplomové práce: Modulační účinek humulenu, karyofylenu a karyofylenoxidu na vybrané biotransformační enzymy v lidských jaterních buňkách

Seskviterpeny jsou látky přírodního původu, produkované zejména vyššími rostlinami. Nachází se především v doplňcích stravy a léčivech přírodního původu. Charakteristická je pro tyto látky velká strukturní rozmanitost. Byly u nich popsány také protizánětlivé, antiparazitární a antikancerogenní účinky. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký účinek mají seskviterpeny α -humulen (HUM), β -karyofylen (KAR) a β -karyofylenoxid (CAO) na genovou a proteinovou expresi vybraných enzymů I. fáze biotransformace, kterými byly karbonylreduktasa 1 (CBR1), aldoketoreduktasa 1C (AKR1C) a několik isoformů cytochromu P450 (CYP), konkrétně CYP3A4, CYP2B6 a CYP2C.

Účinek seskviterpenů na genovou a proteinovou expresi enzymů byl studován v ultratenkých lidských jaterních řezech (průměr 8 mm, tloušťka 150-180 μ m). Jaterní vzorky pocházely z resekce od pěti lidí obou pohlaví a věku 58 až 69 let. Jaterní řezy byly inkubovány 24 hodin se studovanými látkami (HUM, KAR, CAO) v 10 μ M koncentraci ve 12 jamkové destičce a v atmosféře pneumoxidu (95% O₂/5% CO₂). Expze mRNA jednotlivých enzymů byla stanovena pomocí kvantitativní PCR a proteinová expze metodou Western blotu.

HUM signifikantně snížil expresi mRNA CBR1 a AKR1C v jednom vzorku. Proteinová expze CBR1 byla vlivem HUM snížena ve všech vzorcích, zatímco expze AKR1C3 byla ve třech vzorcích významně zvýšená. Výsledky této práce ukázaly, že účinky studovaných seskviterpenů nejsou konzistentní a odrážejí interindividuální variabilitu mezi jednotlivými dárci jaterních vzorků.

2 ABSTRACT

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

Bc. Veronika Trnčáková

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

Title of diploma thesis: Modulatory effect of humulene, caryophyllene and caryophyllene oxide on selected biotransformation enzymes in human liver cells

Sesquiterpenes are substances of natural origin, produced mainly by higher plants. They are mainly found in food supplements and natural medicines. Large structural diversity is a feature of these substances. The anti-inflammatory, antiparasitic and anti-cancer effects were also reported. The aim of this diploma thesis was to investigate the effect of selected sesquiterpenes, α -humulene (HUM), β -caryophyllene (KAR) and β -caryophyllene oxide (CAO), on gene and protein expression of selected phase I drug-metabolizing enzymes, which were carbonyl reductase 1 (CBR1), aldo/keto reductase 1C (AKR1) and several cytochrome P450 isoforms, namely CYP3A4, CYP2B6 and CYP2C.

The effect of sesquiterpenes on the gene and protein expression of enzymes was studied using precision-cut human liver slices (8 mm diameter, 150-180 μ m thickness). Liver samples were received from hepatic surgery of five subjects of both sexes and at 58-69 years of age. Liver slices were incubated with studied compounds (HUM, KAR, CAO) at 10 μ M concentration in a 12-well plate in a pneumoxide atmosphere (95% O₂/5% CO₂) for 24 hours. The mRNA and protein expression of individual enzymes was detected using quantitative PCR and Western blot, respectively.

HUM caused significant inhibition in CBR1 and AKR1C mRNAs in one liver sample. Protein expression of CBR1 was remarkably inhibited by HUM in all liver samples, while that of AKR1C3 was markedly increased in three samples. The results of this work showed that effects of studied sesquiterpenes are inconsistent, and they reflected rather inter-individual variability among liver donors.

3 ÚVOD

Každý organismus se během svého života dostává do kontaktu s xenobiotiky, neboli cizorodými látkami, které nemají žádnou fyziologickou funkci, neslouží ani jako zdroj energie ani pro výstavbu endogenních látek. Mezi xenobiotika můžeme zařadit například léčiva, potravinová aditiva, kosmetické produkty, stimulanty a návykové látky, polutanty a kontaminanty životního prostředí. Jsou to tedy látky jak přírodního, tak i syntetického původu.

Obecným principem metabolismu xenobiotika je změna jeho struktury s cílem zamezit jeho vstupu do dalších orgánů a tkání, snížit jeho potenciální toxicitu a usnadnit jeho eliminaci. Změnou struktury vznikají nové látky (metabolity), které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, biologickou aktivitu i chování v organismu. Proto je velmi důležité, abychom identifikovali vznikající metabolity u léčiv nebo potravinových doplňků. Poznání enzymů, které jsou za metabolismus xenobiotik zodpovědné, a faktorů, které tyto enzymy ovlivňují, má velký význam pro předpověď nežádoucích účinků a interakcí.

V současnosti vzrůstá konzumace přírodních doplňků, ve kterých se mohou nacházet flavonoidy, terpenoidy a další skupiny látek. Seskviterpeny se mohou vyskytovat v lidské výživě, přírodní medicíně a doplňcích stravy. U těchto skupin látek zatím nebylo dostatečně prozkoumáno, zdali nemají nežádoucí vliv na biotransformační enzymy v lidském organismu. Již řadu let se na Farmaceutické fakultě provádí výzkum přírodních látek, jejich vlastností a také vlivu na biotransformační enzymy. Zjistilo se, že mají protizánětlivé, antiparazitární a antikancerogenní účinky (Skálová et al. 2017).

Ve své experimentální práci jsem se zaměřila na terpenoidy, konkrétně seskviterpeny a jejich vliv na vybrané biotransformační enzymy, kterými byly karbonylreduktasa 1, aldoketoreduktasa 1C a tři isoformy cytochromu P450 (CYP), konkrétně CYP 3A4, CYP 2B6 a CYP 2C. Pro stanovení genové exprese jsem využila metodu quantitative real-time PCR (qPCR) a pro stanovení proteinové exprese metodu Western blot.

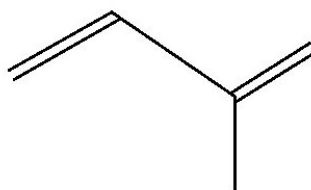
4 SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

Už dlouho je známo, že mnoho rostlinných materiálů uvolňuje při destilaci směsi voňavých, kapalných látek zvané silice. Od dávné historie jsou tyto látky využívány jako medikamenty, koření nebo voňavky. Z chemického hlediska jsou tyto silice směsi převážně isoprenoidních lipidů nazývaných terpenoidy (McMurry 2015).

4.1 Terpenoidy

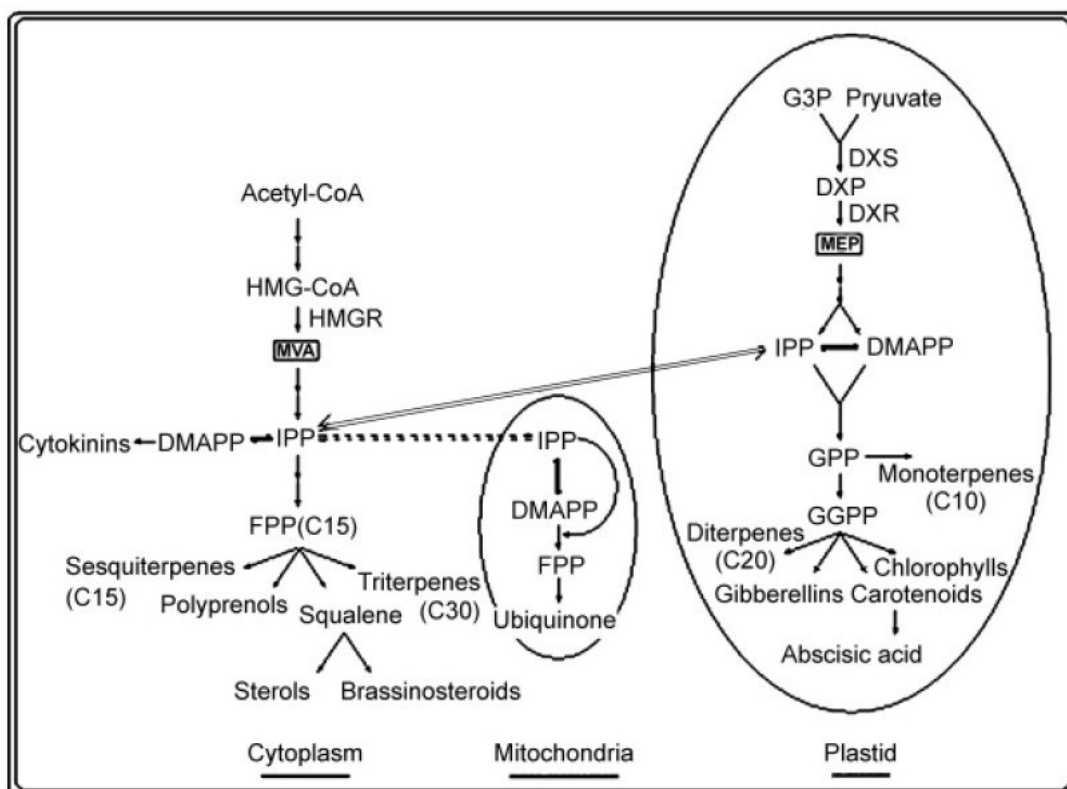
Všechny rostliny syntetizují terpenoidy nezbytné pro jejich růst a vývoj. Patří mezi ně například fotosyntetické pigmenty, regulátory růstu a steroidy. Terpenoidy jsou největší skupinou látek, nacházejících se v rostlinách (15 – 20 000 identifikovaných látek).

Jejich biosyntetický původ je v mevalonátu. Z hlavních biosyntetických reakčních drah sekundárního metabolismu je právě terpenoidní cesta nejvhodnější k vytvoření neuvěřitelně strukturní rozmanitosti a složitosti, která tyto sloučeniny charakterizuje. Jsou složeny z pětiuhlíkatých isoprenových jednotek (Obr. 1), které umožňují další navázání funkčních skupin a cyklizaci. Isopren se v přírodě vyskytuje ve formě isopentenylidifosfátu (IPP) nebo jeho isomeru dimethylallyldifosfátu (DMAPP). Podle počtu isoprenových jednotek rozeznáváme hemiterpeny (1 isoprenová jednotka, C₅), monoterpeny (2 isoprenové jednotky, C₁₀), seskviterpeny (3 isopreny, C₁₅), diterpeny (4 isopreny, C₂₀), sesterterpeny (5 isoprenů, C₂₅), triterpeny (6 isoprenů, C₃₀), tetraterpeny (8 isoprenů, C₄₀) a polyterpeny (C > 40). Sloučeniny C₁₀ a C₁₅ jsou často označovány jako „nižší terpenoidy“ a společně se nazývají silice. Sloučeniny s C₂₀ a více uhlíky jsou označovány jako „vyšší terpenoidy“. Pryskyřice se skládají z netěkavých terpenoidů (di- nebo tri-) a těkavých terpenoidů (mono- a seskvi-) (Langenheim 1994, Dewick 2002).



Obrázek 1 - Isopren (2-methylbuta-1,3-dien)

Terpenoidy jsou odvozeny od univerzálního prekursoru isopentenylidifosfátu (IPP) a jeho isomeru dimethylallyldifosfátu (DMAPP), které vznikají ve vyšších rostlinách dvěma nezávislými drahami, které jsou lokalizované v oddělených buněčných kompartmentech (Obr. 2). V cytosolu vzniká IPP v mevalonátové dráze, která začíná kondenzací acetyl-CoA, zatímco v plastidech je IPP tvořen z pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu. Ve druhé fázi syntézy terpenů kondenzují prenyltransferasy DMAPP s jednou nebo více molekulami IPP systémem „hlava-pata“ za vzniku geranylidifosfátu (GPP, C₁₀), farnesyldifosfátu (FPP, C₁₅) respektive geranylgeranylidifosfátu (GGPP, C₂₀), což jsou přímé prekurzory monoterpenů, seskviterpenů respektive diterpenů. FPP a GGPP se mohou spojovat systémem „hlava-hlava“ za vzniku prekurzorů karotenoidů (dehydroaskvalen, askvalen nebo fytoen), sterolů, hopanoidů a rostlinných hormonů gibberelinů. Isoprenoidy mohou sloužit též k post-translační modifikaci proteinů, která hraje významnou úlohu v buněčné signalizaci, nebo z nich může prostřednictvím cyklizace vznikat ohromné množství terpenoidů (Cheng 2007, Dewick 2002, Oldfield a Lin 2012).

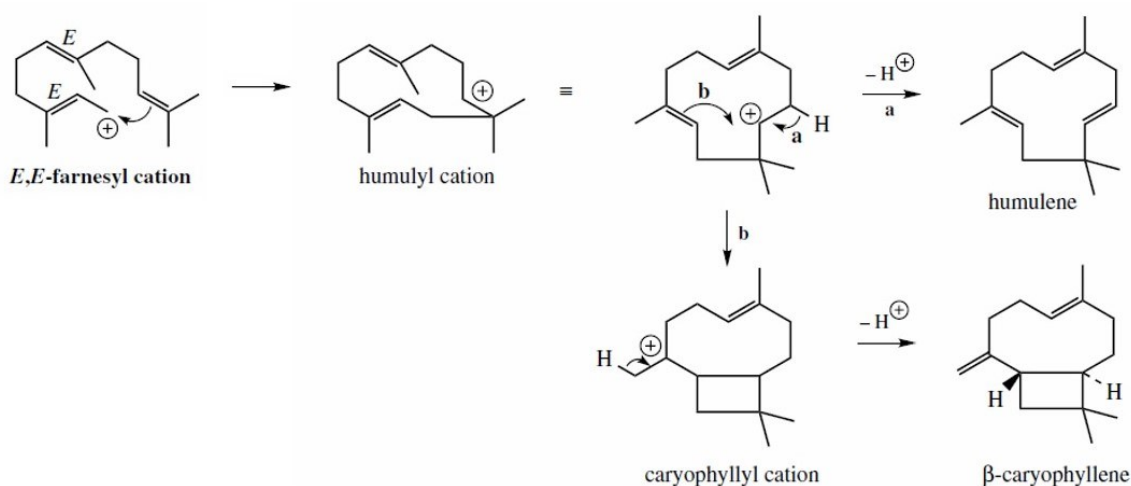


Obrázek 2 - Syntéza isoprenoidů v rostlinné buňce (převzato z Cheng 2007)

4.1.1 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou sekundární metabolity produkované vyššími rostlinami, houbami a bezobratlými živočichy. Mají protizánětlivé, antiparazitární a antikancerogenní účinky (Ambrož et al. 2015).

Tyto sloučeniny vznikají z FPP, který je strukturním základem lineárních i cyklických seskviterpenů. Vzhledem k délce řetězce FPP a počtu dvojných vazeb v jeho molekule stoupá počet možných cyklizačních módů, jejichž výsledkem je ohromné množství vznikajících mono-, bi- a tricyklických sloučenin. Příklad biosyntézy cyklických seskviterpenů je uveden v Obr. 3. Struktura 11-uhlíkatého humulylového kationtu může být buď zachována jako v případě monocyklického humulenu, nebo je modifikována za vzniku bicyklického karyofylylového kationtu, základu β -karyofylenu (Dewick 2002).

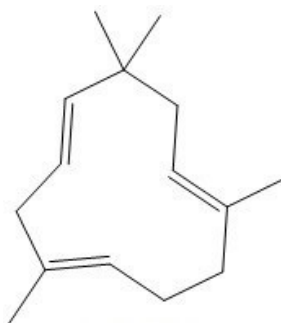


Obrázek 3 - Biosyntéza humulenu a β -karyofylenu (převzato z Dewick 2002)

4.1.2 Monocyklické seskviterpeny

4.1.2.1 α -Humulen

α -Humulen (Obr. 4) je monocyklický seskviterpen se třemi nekonjugovanými dvojnými vazbami, chemický název je *trans,trans,trans*-2,6,6,9-tetramethyl-1,4,8-cyklodekatrien.



Obrázek 4 – α -humulen

Tato látka se vyskytuje v silicích celé řady rostlin. Můžeme ho najít v chmelu otáčivém (*Humulus lupulus*, *Cannabaceae*), podle kterého také dostal název. Pepř černý (*Piper nigrum*, *Piperaceae*) nebo konopí seté (*Cannabis sativa*, *Cannabaceae*) jsou dalšími rostlinami, kde se α -humulen vyskytuje (Sell 2003).

Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*; *Lamiaceae*) je známá již stovky let, používá se v přírodní medicíně díky svým léčebným účinkům. Bylo zjištěno, že hlavními složkami, které jsou zodpovědné za antibakteriální, antimykotické a protizánětlivé účinky, jsou terpenoidy a fenoly. Seskviterpeny α -humulen a β -karyofylen byly hlavními složkami silice šalvěje lékařské, které měly schopnost inhibovat růst nádorových buněk (El Hadri et al. 2010).

Cordia verbenacea (*Boraginaceae*) je keř, vyskytující se na pobřeží Brazílie v oblasti Atlantického lesa. Jeho části se používají v tradiční medicíně díky jeho antirevmatickým, protizánětlivým a analgetickým účinkům. Obsahové látky izolované ze silice tohoto keře vykazovaly po perorálním podání významné inhibiční účinky v různých *in vivo* experimentálních modelech zánětu. Bylo zjištěno, že α -humulen byl schopný snížit tvorbu edému tlapek myši a potkanů, které byly vyvolané karagenanem, a to už po prvním podání. U potkanů s intradermálně podaným karagenanem snížilo systémové podání α -humulenu tvorbu silných prozánětlivých cytokinů tumor-nekrotizujícího faktoru α a interleukinu 1β , snížilo rovněž expresi indukovatelné syntasy oxidu dusnatého

a cyklooxygenasy. Jeho protizánětlivé účinky byly srovnatelné s působením dexamethasonu u těchto zvířat (Fernandes et al. 2007).

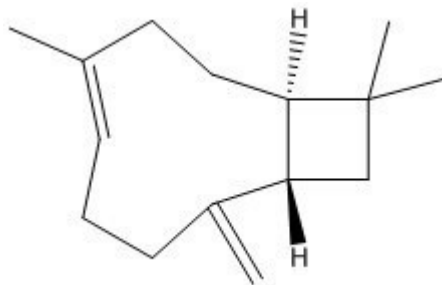
Spolu s β -karyofylenem je součástí silice z jedle balzámové (*Abies balsamea*, *Pinaceae*), u níž bylo prokázáno, že za cytotoxicitu silice je částečně zodpovědný právě α -humulen. Hlavním účinkem α -humulenu je indukce intracelulární deplece glutathionu a zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku, které mohou být příčinou jeho cytotoxicity (El Hadri et al. 2010; Dewick 2002; Legault a Pichette 2007).

Na subcelulárních frakcích získaných z lidských a potkaních jater se zkoušel inhibiční účinek α -humulenu, β -karyofylenu a β -karyofylenoxidu vůči vybraným enzymům I. a II. fáze biotransformace. Ani jeden z těchto seskviterpenů ve 100 μ M koncentraci neměl žádný nebo jen velmi slabý inhibiční vliv na aldo-ketoreduktasu 1A a 1C, NADPH:chinoxidoreduktasu 1, karbonylreduktasu 1, glutathion-S-transferasu, UDP-glukuronosyltransferasu a sulfottransferasu. Jen CYP1A2 (měřeno pomocí EROD) a CYP3A/2B (měřeno pomocí BROD) byly těmito látkami inhibovány a to v lidských i potkaních vzorcích. Hodnoty IC_{50} se v případě BROD pohybovaly v rozmezí 1,83 až 3,79 μ M, v případě EROD se tyto seskviterpeny jevily jako slabé nebo středně silné inhibitory (Nguyen et al. 2017).

4.1.3 Bicyklické seskviterpeny

4.1.3.1 β -Karyofylen

β -karyofylen (Obr. 5) je bicyklický seskviterpen se dvěma nekonjugovanými dvojnými vazbami, jeho chemický název je *trans*-(1*R*,9*S*)-8-methylen-4,11,11-trimethylbicyklo[7.2.0]undec-4-en. Jeho strukturním izomerem je humulen.



Obrázek 5 – β -karyofylen

β -Karyofylen má silnou dřevěnou vůni, používá se jako přídatná látka v kosmetickém a potravinářském průmyslu. Byl schválen k aromatizaci potravin Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) a Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Tento seskviterpen vykazuje nízkou rozpustnost ve vodě, ale je schopný interagovat s lipidovou dvojvrstvou buněčných membrán (Fidyt et al. 2016).

Je jednou z hlavních aktivních složek v řadě rostlin, které se využívají jako koření. Najdeme ho například v silicích z hřebíčku (*Syzygium aromaticum*; *Myrtaceae*), skořice (*Cinnamomum zeylanicum*; *Lauraceae*), bazalky (*Ocimum basilicum*; *Lamiaceae*), černého pepře (*Piper nigrum*; *Piperaceae*), konopí (*Cannabis sativa*; *Cannabaceae*), levandule (*Lavandula angustifolia*; *Lamiaceae*), oregana (*Origanum vulgare*; *Lamiaceae*) a rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*; *Lamiaceae*). β -Karyofylen vykazuje protizánětlivé, antioxidační, antibiotické a antikancerogenní účinky (Fidyt et al. 2016; Legault a Pichette 2007).

Byl také popsán jeho lokálně anestetický účinek. *In vitro* snižoval elektricky evokované kontrakce a *in vivo* byl jeho anestetický účinek prokázán spojivkovým testem u králíků. Karyofylenoxid byl neúčinný jak v *in vitro* tak v *in vivo* testech. Lokálně anestetická aktivita β -karyofylenu je závislá na jeho struktuře. V silicích se většinou vyskytuje ve směsi s γ -karyofylenem a α -karyofylenem (Dewick 2002; Ghelardini et al. 2001).

V lidských jaterních mikrosomech byl studován inhibiční účinek několika terpenů včetně β -karyofylenu na hydroxylaci midazolamu, což je substrát pro CYP3A4. Stanovená hodnota IC₅₀ pro tento seskviterpen (1,28 mM) však ukazuje na velmi slabý inhibiční potenciál β -karyofylenu vůči tomuto enzymu (Zhang a Lim 2008). V publikaci Nguyen et al. (2017) byla hodnota IC₅₀ pro tuto látku vůči CYP2A4/5 (substrát midazolam) stanovena na 104 μ M.

4.1.3.2 β -Karyofylenoxid

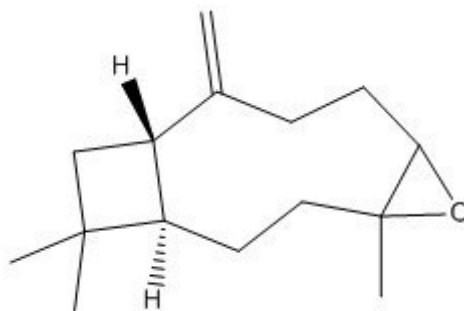
Systematický název je (1*R*,4*R*,6*R*,10*S*)-9-methylen-4,12,12-trimethyl-5-oxatricyklo[8.2.0.0_{4,6}]dodekan. Podobně jako β -karyofylen i β -karyofylenoxid (Obr. 6) můžeme najít v přírodních zdrojích, například v bazalce (*Ocimum basilicum*; *Lamiaceae*), šalvěji (*Salvia glutinosa*; *Lamiaceae*) a hřebíčku (*Syzygium aromaticum*; *Myrtaceae*).

β -Karyofylenoxid má také vůni po dřevu a používá se jako aditivum v potravinářství. Stejně jako β -karyofylen byl schválen FDA a EFSA k aromatizaci potravin. Metabolismus β -karyofylenoxidu ještě není dostatečně popsán (Fidyt et al. 2016).

U β -karyofylenoxidu byly prokázány analgetické a protizánětlivé účinky na myších, u kterých byl účinek β -karyofylenoxidu o dávce 25 mg/kg srovnatelný s aspirinem (Chavan et al. 2010).

Tento oxidovaný terpenoid je znám pro své antimykotické, protizánětlivé a antikancerogenní účinky. Používá se jako konzervační látka v potravinách, léčivech a kosmetice. Antimykotické účinky byly zkoumány na plátcích získaných z ovčích kopyt, které měly simulovat lidské nehty. Kopyta byla nakažena houbou *Trichophyton mentagrophytes*. Pro porovnání byly použity antimykotické látky ciklopiroxolamin a sulkonazol, které mají odlišnou strukturu. β -Karyofylenoxid dosahoval podobné účinnosti jako použitá antimykotika (Yang et al. 2000).

β -Karyofylenoxid vykazoval nejsilnější inhibiční účinek vůči CYP1A2 (EROD) a CYP3A/2B (BROD) v subcelulárních frakcích získaných z lidských a potkaních jater. Tato látka inhibovala CYP3A/2B v lidských i potkaních mikrozomech nekompetitivně, zatímco CYP1A2 v lidských mikrozomech inhibovala kompetitivně a v potkaních mikrozomech nekompetitivně (Nguyen et al. 2017).



Obrázek 6 - β -karyofylenoxid

4.2 Biotransformační enzymy

Biotransformační enzymy mění chemickou strukturu xenobiotika s cílem omezit jeho vstup do dalších orgánů a tkání, omezit jeho interakci s biomakromolekulami a urychlit jeho eliminaci z organismu. Změnou chemické struktury vznikají tzv. metabolity, které jsou hydrofilnější než parentní látka. Míra i způsob absorpce, distribuce, metabolismu i eliminace každého xenobiotika v organismu závisí na jeho struktuře a také na enzymové výbavě organismu. Metabolismus xenobiotik zahrnuje transportní procesy a nejrůznější biotransformační reakce. Reakce biotransformace bývají rozděleny do dvou fází. První fáze biotransformace se označuje jako konverze a zahrnuje především reakce oxidační, redukční a hydrolytické. Druhou fází biotransformace zahrnují reakce konjugační, při kterých vzniklý metabolit (v některých případech i parentní látka) reaguje s endogenní sloučeninou (např. UDP-glukuronová kyselina, glutathion, aminokyseliny glycin a taurin). Pokud je metabolit vznikající v 1. fázi biotransformace dostatečně hydrofilní, pak nemusí podstupovat konjugaci s endogenními látkami a může být přímo vyloučen. Transport xenobiotika a jeho metabolitů můžeme označit jako třetí fázi metabolismu xenobiotik (Skálová et al. 2017).

Aktivita enzymu závisí na rychlosti jeho syntézy, rychlosti jeho degradace, koncentraci substrátů, reakčních podmínkách (pH, teplota atd.), přítomnosti a koncentraci kofaktorů a modulátorů (inhibitorů a aktivátorů). Nejčastěji dochází ke zvýšení aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika účinkem induktoru, který zvýší rychlost exprese příslušného genu. Naopak ke snížení aktivity vede přítomnost určitého inhibitoru, který se váže na enzym. Mezi inhibitory můžeme zařadit ionty, anorganické nebo organické sloučeniny nejrůznější povahy. Nespecificky působí těžké kovy jako Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+} a jiné. Specifické inhibitory účinkují pouze na jednu skupinu enzymů nebo jeden enzym. Podle síly vazby můžeme inhibitory rozdělit na reverzibilní a irreverzibilní. Podle enzymové kinetiky můžeme inhibici dělit na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšenou (Skálová et al. 2017).

Inhibice biotransformačních enzymů P450 je příčinou mnoha farmakokinetických lékových interakcí, kde může při současném podání dvou léčiv inhibice enzymu jedním léčivem snížit biotransformaci druhého léčiva (Correira a de Montellano 2005).

4.2.1 Enzymy 1. fáze biotransformace

4.2.1.1 Cytochromy P450

Enzymová klasifikace EC 1.14.14.1. Jako prostetickou skupinu má hem. Koenzymem je NADPH (NADH). Cytochromy P450 (CYP) patří do široké nadrodiny hemoproteinů, které v redukovaném stavu a při vazbě oxidu uhelnatého vykazují v UV-VIS spektru typické maximum při 450 nm. CYP mají významnou úlohu v metabolismu xenobiotik a jsou rovněž významnými enzymy v metabolismu některých eobiotik (steroidů, mastných kyselin či prostaglandinů) (Zimniak a Waxman 1993).

Tyto enzymy byly objeveny v roce 1958. Vyskytují se v neobvykle vysokém počtu isoform. Nachází se v prokaryotních i eukaryotních organismech. V současné době je známo několik tisíc genů kódujících cytochromy P450. V lidském genomu bylo identifikováno 35 isoform, z nichž 18 isoform je schopno metabolizovat xenobiotika. CYP se vyskytují prakticky ve všech tkáních (kůže, mozek, svaly, cévy, placenta, nadledvinky, varlata, vaječníky, mléčná žláza), ale nejhojnější zastoupení mají v játrech, gastrointestinálním traktu, plicích a ledvinách (Skálová et al. 2017).

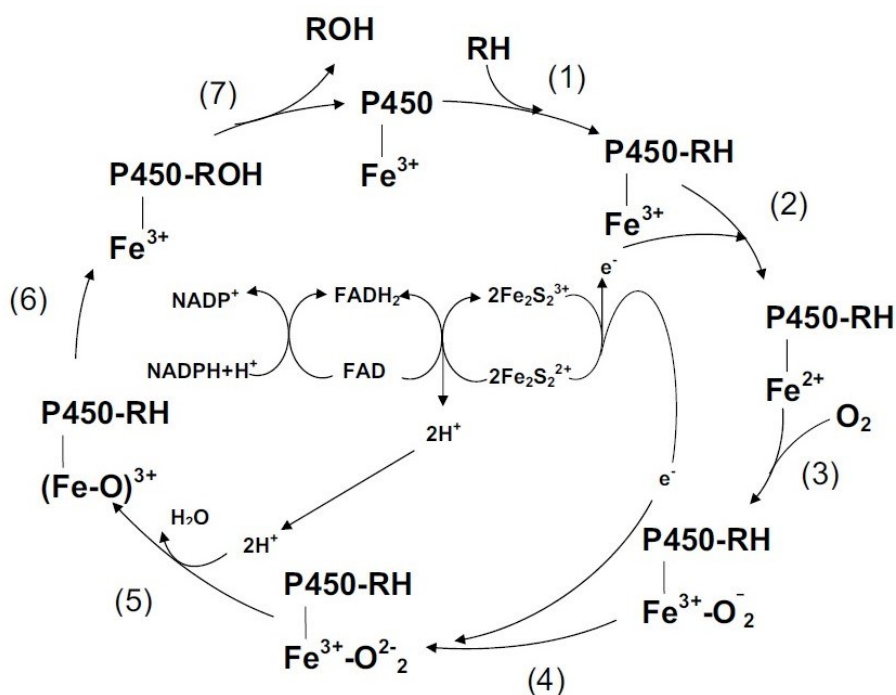
Nadrodinu CYP můžeme rozdělit na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci apoproteinu na rodiny, podrodiny a jednotlivé isoformy. Jednotlivé isoformy se od sebe liší aminokyselinovou sekvencí, z čehož vyplývají i jejich odlišné vlastnosti.

U prokaryot se CYP nacházejí v rozpustné formě v cytosolu, zatímco u vyšších organismů jsou lokalizovány hlavně na hladkém endoplazmatickém retikulu a v membránách mitochondrií. Eukaryotní CYP mají strukturu relativně kompaktního trojbokého hranolu, který je orientován směrem do cytosolu a ukotven na membráně (Manikandan a Nagini 2018).

Cytochrom P450 patří mezi monooxygenasy, což jsou enzymy, které váží vzdušný kyslík a štěpí jeho molekulu. Jeden kyslíkový atom zabudovávají do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody (Skálová et al. 2017). Typická monooxygenasová reakce katalyzovaná CYP:



Katalytický cyklus CYP (Obr. 7) probíhá uspořádaným mechanismem a skládá se z několika navazujících kroků. Vazba substrátu do aktivního místa CYP vytěsňuje molekulu vody a dojde ke změně spinu atomu Fe^{3+} z nízkospinového stavu (LS) do vysokospinového stavu (HS), což vyvolá interakci s redoxní složkou. Komplex Fe^{3+} -CYP-substrát je redukován elektronem přeneseným z NADPH na Fe^{2+} -CYP-substrát (redukce je nutná, protože komplex Fe^{3+} -CYP-substrát nemůže vázat kyslík), následně dochází k vazbě O_2 a vzniká stabilní komplex $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$, který je přenosem druhého elektronu z NADPH redukován na $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{2-}$. Interakce O_2^{2-} s dvěma protony z okolního rozpouštědla vyvolá rozštěpení vazby O-O. Vzniká tak H_2O a komplex $(\text{Fe-O})^{3+}$, který je schopný vytrhnout atom H ze substrátu a vytvořit tak $\text{FeOH}^{3+}\text{-R}^{\bullet}$. Hydroxylová skupina z $\text{FeOH}^{3+}\text{-R}^{\bullet}$ je přemístěna do molekuly substrátu a vzniká hydroxylovaný produkt. Uvolnění produktu z aktivního místa enzymu obnoví původní Fe^{3+} -CYP, který se může účastnit metabolismu další molekuly substrátu (Manikandan a Nagini 2018).



Obrázek 7 - Katalytický cyklus CYP (převzato z Manikandan a Nagini 2018)

4.2.2 Vybrané biotransformační enzymy

4.2.2.1 CYP3A4

Nejvýznamnější izoformou CYP z hlediska metabolismu léčiv je CYP3A4. Vyskytuje se především v játrech a ve střevě. V menším množství jej můžeme nalézt v ledvinách, placentě, plicích a mozku. Mezi jeho substráty patří mnoho nejrůznějších struktur a pravděpodobně se podílí na metabolismu až 50% všech léčiv užívaných v humánní medicíně. Mezi různými jedinci je jeho aktivita velmi variabilní. Příčinou je výrazná indukovatelnost a značná citlivost k inhibičnímu působení složek potravy. Exprese CYP3A4 je regulována přes pregnanový X receptor (PXR), mezi jehož ligandy patří rifampicin nebo dexamethason. Mezi jeho inhibitory řadíme makrolidová antibiotika, lovastatin, grapefruitový džus, chinin atd. Induktory jsou barbituráty, fenytoin, rifampicin, dexamethason a karbamazepin (Skálová et al. 2007).

4.2.2.2 CYP2B6

Členové podrodiny CYP2B metabolizují širokou škálu endogenních substrátů, jako jsou steroidy, mastné kyseliny, a xenobiotika jako jsou léky, toxiny a karcinogeny. V poslední době je isoformě CYP2B6 věnováno více pozornosti, než dříve. Zjistilo se, že se významně podílí na metabolismu léčiv, jako je cyklofosamid, tamoxifen, bupropion, diazepam a další. CYP2B6 se nachází v játrech, ale můžeme ho v menší míře najít i v ledvinách, střevě, děloze, makrofázích a lymfocytech. CYP2B6 vykazuje velkou interindividuální variabilitu (Lang 2001; Skálová et al. 2007).

4.2.2.3 CYP2C

Enzymy z podrodiny CYP2C jsou u lidí zastoupeny 4 isoformami: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. Pro metabolismus léčiv je důležitá zejména isoforma CYP2C9. V buňce se nachází na hladkém endoplazmatickém retikulu. Zastoupení má v játrech. Mezi substráty CYP2C patří warfarin, tolbutamid, antihypertenziva ze skupiny sartanů, nesteroidní antiflogistika a některá antiepileptika. Mezi inhibitory můžeme

zařadit například sulfafenazol, amiodaron, flukonazol. Mezi induktory patří barbituráty, rifampicin a steroidy (Goldstein a de Morais 1994; Skálová et al. 2017).

4.2.2.4 AKRIC

Redukce je opačným pochodem než oxidace. Zahrnuje ztrátu atomu kyslíku nebo adici dvou atomů vodíku. Většinu reduktas aldehydů a ketonů můžeme zařadit do jedné ze tří nadrodin, a to nadrodiny aldoketoreduktas (AKR), dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem a dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem.

Aldoketoreduktasy představují nadrodinu cytosolických oxidoreduktas, které se vyskytují ve většině živých organismů. Jsou tkáňově specifické a jako kofaktor mají NADPH. U člověka bylo identifikováno 15 AKR. Jsou to AKR1A1 (aldehydreduktasa), AKR1B1, 1B10 a 1B15 (aldosareduktasy), AKR1C1, 1C2, 1C3 a 1C4 (hydroxysteroiddehydrogenasy), AKR1D1, AKR1E2, AKR6A3, 6A5 a 6A9, AKR7A2 a 7A3 (aflatoxinreduktasy).

I když podrodina čtyř lidských AKR1C genů sdílí 86% homologii, jednotlivé enzymy se od sebe liší svými biochemickými vlastnostmi. Všechny 4 enzymy byly lokalizovány v jaterní tkáni, ale jejich extrahepatální distribuce je odlišná. Zatímco AKR1C4 je pouze jaterní enzym, 1C2 a 1C3 jsou exprimovány v prostatě a prsní tkáni. Podrodina 1C hraje zásadní roli při deaktivaci protinádorového léčiva doxorubicinu (Skálová et al. 2017).

4.2.2.5 CBR1

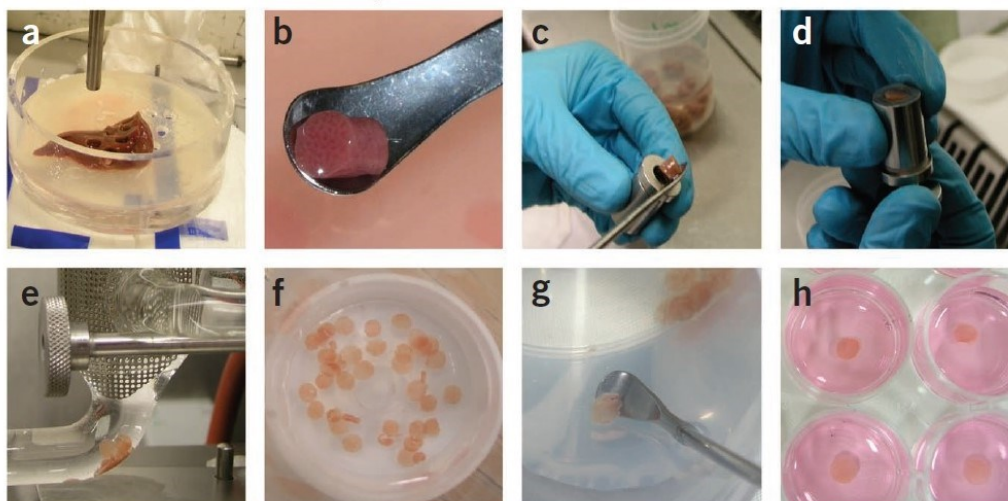
Karbonylreduktasa 1 je jedna z nejdůležitějších cytosolických reduktas katalyzující NADPH-dependentní redukci rozličných endogenních i xenobiotických aldehydů, chinonů a ketonů. U člověka je exprimována ve většině tkání. Vysoké hladiny byly nalezeny především v jaterní tkáni, placentě a CNS (centrální nervové soustavě), což ukazuje na ochrannou úlohu těchto enzymů proti toxickým karbonylům. Mezi substráty CBR můžeme zařadit prostaglandiny, steroidy, *o*-chinony, *p*-chinony, doxorubicin, daunorubicin a další léčiva (Skálová et al. 2017; Lal et al. 2008).

4.3 Jaterní řezy

Játra jsou hlavním orgánem zodpovědným za eliminaci různých endogenních a exogenních sloučenin z organismu. Mechanismy těchto procesů byly zkoumány na různých *in vitro* modelech, jako jsou izolovaná perfundovaná játra, jaterní řezy, izolované hepatocyty, membránové vesikuly, mikrosomy či izolované proteiny (Olinga et al. 1998).

Tkáňové řezy se používají v biochemii již několik desetiletí zejména k farmakologickému studiu metabolismu léčiv a toxikologie. Dříve se řezy krájely ručně. Relativně nízká reprodukovatelnost a omezená životaschopnost takto připravených tkáňových řezů zabránila širšímu využití této metody. Výroba automatizovaného kráječe (Krumdieckův kráječ), schopného krájení reprodukovatelných tkáňových řezů s definovanou tloušťkou, významně pomohla pokroku v této oblasti. Tkáňové řezy se používají jako miniaturní *in vitro* model zkoumaného orgánu, protože obsahují všechny buňky tkáně v jejich přirozeném prostředí se zachováním integrity tkáně pro zkoumání metabolismu (de Graaf et al. 2010; Parrish et al. 1995).

Příprava a inkubace řezů je velmi jednoduchá a rychlá (Obr. 8). Řezy lze získat z různých tkání jednoho organismu, různých druhů zvířat nebo z lidských tkání od zdravých nebo léčených jedinců. To umožňuje srovnání mezi různými orgány a druhy. Experimentální podmínky jsou u jaterních řezů mnohem snadněji reprodukovatelné ve srovnání s perfundovanými orgány. V jaterních řezech se studované látky metabolizují pomaleji, než je tomu u suspenze hepatocytů. Jaterní řezy mohou být inkubovány po dobu tří až pěti dní, přičemž se snižuje hladina cytochromů P450. Připravené plátky mohou být zamrazeny pro další použití, což nám umožňuje dlouhodobou práci s tkání z jednoho zdroje a také se snižuje počet usmrcených zvířat (Červenková et al. 2001).



Obrázek 8 – a) vykrojení válečků b)-d) přenos do kráječe e) nakrájené jaterní řezy f)-h) přenos řezů do inkubačních destiček (převzato z de Graaf et al. 2010)

Jaterní řezy se využívají především ke studiu hepatotoxicity a metabolismu látek. Z čerstvých jater se pomocí speciálního válcového vykrajovače (Obr. 9) připravují válečky, z těch se pak krájí ultratenké plátky na automatickém kráječi (Obr. 10). Tkáňové válečky jsou umístěny do otvoru v kráječi a shora jsou zatíženy malým pístem. To zajistí tkáň tak, aby se nemohla posunout, a nasměruje ji kolmo k čepeli mikrotomu. Tkáň, která se při krájení deformuje a je křehká nebo dutá, zaléváme do agarosy (Krumdieck 2013).

Životnost řezů se udává od 24 do 96 hodin. Inkubace probíhá ve 12ti jamkové destičce pod atmosférou pneumoxidu (95% O₂ a 5% CO₂) (de Graaf et al. 2010; Parrish et al. 1995; Zimmermann et al. 2009).



Obrázek 9 - Mechanický kráječ tkáňových válečků (převzato z Krumdieck 2013)



Obrázek 10 - Tkáňový mikrotom (převzato z Krumdieck 2013)

Kráječ válečků i mikrotom jsou ponořeny do média, které minimalizuje poškození tkáně při krájení. Teplota média má být od 2 do 4 °C. Proud média nám také usnadňuje přenos vytvořených řezů do kádinky (Krumdieck 2013).

Faktorem, který může značně ovlivnit výsledek experimentu s jaterními řezy je interindividuální variabilita. Genetické rozdíly jsou vždy přítomné, i kdybychom řezy připravili a inkubovali za optimálních podmínek. Interindividuální variabilita je zodpovědná za rozdílný metabolismus látek v řezech, různou reakci na léčiva a kontaminanty životního prostředí (Fisher a Vickers 2012).

5 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, jak vybrané seskviterpeny ovlivňují proteinovou a genovou expresi vybraných biotransformačních enzymů v tkáňových řezech. K dosažení vytýčeného cíle bylo třeba:

- Připravit ultratenké tkáňové řezy z lidských jater získaných od dárců
- Inkubovat řezy s vybranými mono- a bicyklickými seskviterpeny (α -humulen, β -karyofylen a β -karyofylenoxid)
- Stanovit proteinovou expresi CYP3A4, CYP2C, AKR1C3 a CBR1 pomocí Western blottingu
- Stanovit genovou expresi CYP3A4, CYP2B6, CYP2C, AKR1C3 a CBR1 pomocí qPCR

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Chemikálie, přístroje, biologický materiál

6.1.1 Chemikálie

- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Dithiotreitol (DTT)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)
- Etylen-glykol-bis(β -aminoethylether)-tetraoctová kyselina (EGTA)
- Fenylmethansulfonylfluoridu (PMSF)
- Gentamycin
- hovězí sérový albumin BSA 20%
- Laurylsíran sodný (SDS)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)
- N,N' – methylen–bisakrylamid (bis AA)
- Roztok bicinchoninové kyseliny
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- Triton X–100
- Tween 20
- α -humulen
- β -karyofylen
- β -karyofylenoxid
- ostatní běžné chemikálie čistoty p.a.

6.1.2 Přístroje

- Analytické váhy Scaltec SBC 22
- BioRad TransBlot Turbo
- Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Biofuge Stratos
- CO₂ inkubátor Hera cell
- Hlubokomrazící box Jouan
- Laboratorní váhy Sartorius CP225D
- Laminární box BioAir AURA 2000 M.A.C.
- Magnetická míchačka
- Nanodrop 2000 – Thermo Scientific
- PCR cyklér MJ mini BioRad
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200
- Thermomixer Comfort Eppendorf
- Tkáňový kráječ Krumdieck Tissue Slicer MD4000
- Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls Bandelin HD 2070
- Vodní lázeň Memmert
- WTW pH metr ino Lab pH level 2

6.1.3 Biologický materiál

Biologickým materiálem použitým pro experimenty byla lidská játra od dárců obou pohlaví a ve věku 58 až 69 let. Biologický materiál pochází z resekce jater, která byla provedena na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Tabulka 1 - Popis souboru dárců

Pacient č.	Pohlaví	Věk (roky)	Diagnóza	Komorbidity
1	♂	69	Kolorektální karcinom	Arteriální hypertenze
2	♂	63	Kolorektální karcinom	Arteriální hypertenze, hyperurikemie, diabetes mellitus 2. typu
3	♂	58	Cholangiocelulární karcinom	Arteriální hypertenze, hyperurikemie, hypercholesterolemie
4	♀	67	Kolorektální karcinom	Arteriální hypertenze, deprese
5	♀	65	Kolorektální karcinom	Arteriální hypertenze, porucha glukózové tolerance, hyperlipidémie

6.2 Příprava ultratenkých jaterních řezů

6.2.1 Příprava Krebsova – Henseleitova pufru

Všechny složky uvedené v Tab. 2 jsem rozpustila v redestilované vodě a upravila pH na hodnotu 7,4 pomocí HCl. Na jedna játra jsem spotřebovala přibližně 1 litr Krebsova-Henseleitova pufru (K-H pufr). Jako poslední složku jsem vždy přidávala chlorid vápenatý kvůli riziku vykrystalizování uhličitánů z pufru.

Tabulka 2 - Příprava Krebsova – Henseleitova pufru

	Mr (g/mol)	c (mM)
chlorid sodný (NaCl)	58,44	150,53
síran hořečnatý ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	246,48	1,10
chlorid draselný (KCl)	74,56	3,92
hydrogenuhlíčan sodný (NaHCO_3)	84,01	25,00
chlorid vápenatý (CaCl_2)	147,02	1,36
dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	138,00	1,01
D – glukosa	180,16	24,98
HEPES	238,31	9,00

6.2.2 Příprava media William's E + glutaMAX (Gibco)

Komerčně dodávané William's E suplementované GlutaMAXem (stabilizovaná forma L-glutaminu – L-alanyl-L-glutamin) jsem v laminárním boxu obohatila o gentamycin (výsledná koncentrace 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a L-glukosu (výsledná koncentrace 25 mM) podle tab. 3. Takto obohacené medium jsem sterilně přefiltrovala přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm .

Tabulka 3 - Příprava media William's E + glutaMAX

Suplement	Mr	100 ml	200 ml	500 ml	1000 ml
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin	477,6	100 μl	200 μl	500 μl	1000 μl
L-glukosa	180,16	0,448 g	0,896 g	2,24 g	4,48 g

Rozložený Krumdieckův kráječ (Obr. 11) MD4000 jsem ostříkala 70% lihem, zakryla alobalem a umístila do chladicí místnosti. Do chladicí místnosti jsem dala také připravený K-H pufr a médium.

V den experimentu jsem nechala vychlazený K-H pufr s D–glukózou provzdušnit pneumoxidem (95% O₂ /5% CO₂) zhruba jednu hodinu. Suplementované médium William's E + glutaMAX jsem nechala přehřát na 37°C asi jednu hodinu předem. Kráječ poskládala, naplnila okysličeným K-H pufrem a vyzkoušela, jestli vše funguje. Kráječ jsem připojila k vodní lázni s termostatem a nechala jsem kráječ chladit vodou temperovanou na 4°C. Připravila jsem si ták s ledem, kádinkou na řezy, Petriho miskou s filtračním papírem na přípravu válečků z jater. Nachystala jsem si box s ledem, kádinku na játra, nůžky, pinzetu, roušku a ochranné brýle. Vzorek jater jsem ihned vložila do kádinky se studeným okysličeným K-H pufrem. Vykrajovačem o průměru 8 jsem vykrojila pravidelné válečky, které jsem umístila do nástavce v kráječi. Z nich pak Krumdieckův kráječ krájel řezy o tloušťce přibližně 150–180 μm. Po ukončení krájení jsem pufr z přístroje vypustila, opláchla a nechala rozložený uschnout.



Obrázek 11 - Kráječ na ultratenké řezy

6.2.3 Preinkubace a inkubace ultratenkých řezů

Do 12-jamkové desky jsem napipetovala 1,3 ml suplementovaného William's E média bez testované látky. Řezy co nejrychleji přemístíme pomocí kopistky do jamek, vždy jeden řez do jedné jamky. Samotné inkubaci s látkami předcházela preinkubace řezů v médiu, která probíhala v inkubátoru, který byl připojen na přívod pneumoxidu. V inkubátoru byla třepačka s horizontálním pohybem, na kterou jsem desky s řezy položila. Během preinkubace i inkubace byla třepačka nastavená na 80 rpm. Po 60 minutách preinkubace jsem rychle odpipetovala médium a nahradila jej stejným objemem média s požadovanou koncentrací testovaných látek (α -humulen, β -karyofylen, β -karyofylenoxid, rifampicin, β -naftoflavon). Výsledná koncentrace látek v médiu byla 10 μ M. Všechny látky jsem rozpustila v dimethylsulfoxidu (DMSO). U kontrolních vzorků jsem do média přidala dimethylsulfoxid tak, aby výsledná koncentrace byla 0,1%. Inkubace probíhala při 37°C v atmosféře pneumoxidu. Řezy jsem inkubovala pro danou látku a čas v triplicátu. Inkubaci jsem ukončila v předem daných intervalech (2h a 24h). Řezy jsem následně rozdělila do 1,5 ml (vždy jeden řez ve zkumavce), které obsahovaly buď 0,5 ml Trizolu (genová exprese) nebo 0,2 ml lyzačního pufru s inhibitory proteas (proteinová exprese) a dala zamrazit na -80°C.

6.3 Stanovení proteinové exprese

6.3.1 Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blot

6.3.1.1 Zásobní roztoky pro ředění vzorků

Zásobní roztok 4 × SDS vzorkového pufru pro denaturující elektroforézu jsem připravila podle tab. 4 a uchovávala jsem ho v mrazáku při -20°C.

Tabulka 4 - 4 × SDS vzorkový pufr

Složka	Výsledná koncentrace	Pipetované/navážované množství
1 M Tris/HCl pH 6,8	200 mM	4 ml
85% glycerol	40%	9,41 ml
SDS	6%	1,2 g
DTT	0,2 M	0,617 g
bromfenolová modř	0,3%	0,1 g
redest. voda		20 ml

Lyzační pufr

Zásobní lyzační pufr jsem připravila podle tab. 5 a uchovávala jsem ho v mrazáku při -20°C. Před použitím jsem k 13 ml zásobního lyzačního pufru přidala 130 µl směsi inhibitorů proteas a 130 µl 100 mM fenylmethansulfonylfluoridu (PMSF). Roztok 100 mM PMSF jsem připravila rozpuštěním navážky 17,42 mg PMSF v ethanolu. Takto upravený lyzační pufr jsem uchovávala v lednici.

Tabulka 5 - Lyzační pufr

Složka	Výsledná koncentrace	Pipetované/navážované množství
1 M Tris/HCl pH 7,4	50 mM	50 ml
NaCl	150 mM	8,766 g
85% glycerol	10%	117,65 ml
100% Triton X-100	1%	10 ml
EDTA	2 mM	0,58 g
EGTA	2 mM	0,76 g
β - glycerolfosfát	40 mM	8,52 g
fluorid sodný	50 mM	2,09 g
pyrofosfát sodný	10 mM	4,46 g
dithiotreitol	2 mM	0,3085 g
vanadičnan sodný	200 μ M	0,03678 g
H ₂ O		doplnit objem na 1 l

Řezy v 1,5 ml mikrozkušavkách jsem homogenizovala pomocí homogenizačních tyčinek krouživým pohybem po zkumavce. Z každého triplikátu jsem vytvořila směsný vzorek. Homogenát jsem nechala stát na ledu asi 20 minut. Následně jsem vzorky zcentrifugovala 10 minut při 13 000 otáčkách za minutu v centrifuze předchlazené na 4°C. Po centrifugaci jsem odebrala supernatant a zamrazila ho na -80°C do dalšího použití. Ve vzorcích jsem následně stanovila koncentraci proteinu pomocí metody s bicinchoninovou kyselinou (BCA).

6.3.1.2 BCA stanovení bílkoviny

Principem této metody je reakce proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^{1+} , která vytváří v prostředí kolem pH 10 stabilní modrofialový komplex s BCA. Intenzita vzniklého zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku. Absorbance se měří při 562 nm.

Pracovní roztok A – NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH

Pracovní roztok B – 4% CuSO₄ · 6H₂O

Pracovní roztok C připravíme smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50 :1.

Kalibrační přímka

Do 6 mikrozkušavek jsem napipetovala roztoky podle tabulky 6.

Tabulka 6 - Kalibrační přímka

	koncentrace (µg/ml)	0,1 - % roztok BSA (µl)	destilovaná 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

Vzorky jsem naředila 20x destilovanou vodou. Postupně jsem do mikrotitrační destičky pipetovala:

kalibrační přímka- 10 µl bílkoviny ze zkumavek 1 – 6 v oktaplikátu

200 µl pracovního roztoku C

vzorky – 10 µl vzorku bílkoviny v oktaplikátu

200 µl pracovního roztoku C

Mikrotitrační destičku jsem následně protřepala na stole a nechala ji inkubovat v termomixéru při 37°C po dobu 30 minut za stálého třepání 500 rpm.

Po 30 minutách jsem změřila absorbanci na přístroji Tecan. Jakmile jsem měla změřenou koncentraci bílkoviny ve vzorcích, vypočítala jsem naředění jednotlivých vzorků lyzačním pufrem s inhibitory proteas a zásobním vzorkovým pufrem (4x SDS) tak, aby měly koncentraci 1µg/µl a SDS tvořilo ¼ z celkového objemu. Naředěné vzorky jsem denaturovala při 95°C po dobu 5 minut a po zchlazení na pokojovou teplotu jsem je nanášela na gel. Takto připravené vzorky můžeme používat opakovaně, uchováváme je v mrazáku při – 20°C (Smith et al. 1985).

6.3.2 Elektroforéza a Western blot

Western blot je biochemická technika, která se využívá k identifikaci specifických proteinů v komplexní směsi vzorků. Probíhá kombinací elektroforézy a imunoanalýzy. Poprvé byla popsána v roce 1979 a stala se velmi využívanou metodou v biochemickém výzkumu (Jin & Kennedy 2015).

6.3.2.1 Zásobní roztoky pro elektroforézu

4 M HCl - Do 150 ml redestilované vody jsem nalila 88 ml konc. HCl a doplnila vodou do 250 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

AA + bis AA - Připravený 40% roztok v lednici, Sigma

1,5 M Tris – HCl pufr, pH 8,8 – Navážila jsem 18,5 g Trisu. Přidala jsem 75 ml redestilované vody a umístila na magnetickou míchačku. Na pH metru jsem upravila pH pomocí 4 M HCl a doplnila na 100 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

0,5 M Tris – HCl pufr, pH 6,8 – Navážila jsem 6 g Trisu. Přidala jsem 75 ml redestilované vody a míchala jsem na magnetické míchačce. Upravila jsem pH pomocí 4 M HCl a doplnila do 100 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

10% SDS – Navážila jsem 10 g SDS. Rozpustila jsem SDS v 80 ml redestilované vody a doplnila v odměrné baňce na 100 ml. Roztok jsem uchovávala při laboratorní teplotě.

Koncentrovaný elektrodový pufr – Navážila jsem 72 g glycinu, 15 g Trisu, 5 g SDS. Rozpustila jsem v 900 ml redestilované vody. Upravila pH na 8,3 pomocí 4 M HCl. Doplnila v odměrné baňce do 1000 ml a rozdělila do 100 ml plastových nádobek a dala zamrazit.

Isobutanol nasycený vodou – Smíchala jsem čistý isobutanol s redestilovanou vodou. V horní vrstvě je isobutanol nasycený vodou. Roztok jsem uchovávala v lednici.

10% APS – 25 mg persíranu amonného jsem rozpustila ve 250 μ l redestilované vody. Roztok jsem připravila těsně před použitím.

6.3.2.2 Příprava gelu

Nachystala jsem si nalévací stojánek, skla, skla se spacerem, spony, hřeben. Skla a hřebeny jsem důkladně umyla saponátem, opláchla redestilovanou vodou a lihomethanolem a nechala oschnout. Sklo a sklo se spacerem jsem přiložila k sobě a spojila je sponami. Spojená skla jsem přiložila na gumovou podložku v nalévacím stojánku, přitlačila a přichytila vrchním kolíkem. Mezi takto připravená skla jsem pipetovala roztok na separační gel (Obr. 12), který jsem připravila podle tab. 7.

Tabulka 7 - Příprava separačního gelu

	10% - 2 gely; 1,5 mm
redestilovaná voda	9,8 ml
pufr 1,5 M Tris – HCl pH 8,8	5 ml
roztok AA + bis AA	5 ml
10% SDS	0,2 ml
iniciace polymerace	
roztok APS	200 μ l
TEMED (v digestoři)	16 μ l



Obrázek 12 - Stojánky s gely

Roztok na separační gel jsem lehce promíchala a ihned pipetou nanasla mezi skla do výšky zhruba 4,5 cm od spodního okraje. Opatrně jsem separační gel převrstvila asi 200 μ l isobutanolu nasyceného vodou, abych zabránila nadměrnému odpařování vody z povrchu gelu. Gel jsem nechala polymerovat asi jednu hodinu. Poté jsem opatrně slila isobutanol a vysušila prostor mezi skly filtračním papírem, který se však nesmí dotknout gelu. Následně jsem si namíchala roztok na zaostřovací gel podle tabulky 8.

Tabulka 8 - Příprava zaostřovacího gelu

	4% - 2 gely; 1,5 mm
redestilovaná voda	6,42 ml
pufr 0,5 M Tris – HCl pH 6,8	2,5 ml
roztok AA + bis AA	0,98 ml
10% SDS	0,1 ml
iniciace polymerace	
roztok APS	200 μ l
TEMED (v digestoři)	16 μ l

Roztok jsem lehce promíchala a opatrně napipetovala mezi skla na spodní gel až po horní okraj kratšího skla. Pod úhlem 45° jsem mezi skla zasunula hřeben až po drážky. Gel jsem nechala polymerovat přes noc v lednici.

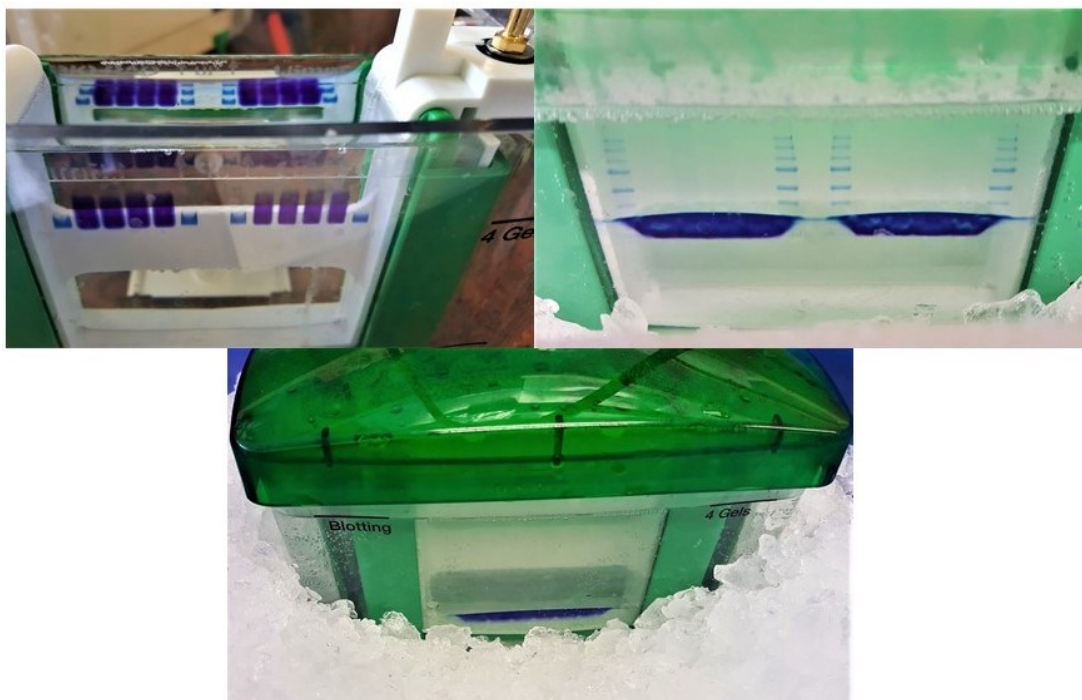
6.3.2.3 Denaturující elektroforéza

Naředěné vzorky jsem dala na 5 minut denaturovat při 95 °C. Poté jsem dala vzorky zchladit na led. Gely jsem vytáhla ze stojánku, opláchla pod tekoucí vodou a opatrně z nich vytáhla hřebeny. Do jamek jsem nalila destilovanou vodu, aby gel nevyschl. Připravila jsem si stojánek na elektroforézu, z jamek jsem vylila vodu a z každé strany stojánku na elektroforézu jsem skla přitlačila na těsnění jedno sklo s gelem kratší částí dovnitř, vnitřní část stojánku se skly jsem zasunula do vnější části stojánku na elektroforézu a přitáhla sponami. Stojánek jsem vložila do vaničky. Do vnitřního elektrodového prostoru jsem nalila elektrodový pufr tak, aby byl ponořen celý gel a zkontrolovala jsem, jestli nepodtéká. Pufr z vnitřní části jsem po skončení elektroforézy

vyčila a vždy použila nový pufr. Do vnějšího elektrodového prostoru jsem nalila elektrodový pufr, který může být použitý.

Denaturované a zchlazené vzorky jsem promíchala a pomocí pipety jsem opatrně napipetovala do jamek 25 μ l vzorku. Do krajních jamek jsem napipetovala asi 7 μ l molekulového standardu. Vaničku jsem přiklopila víčkem, umístila ji do nádoby s ledem a připojila ke zdroji. Nastavila jsem napětí na 90 V, a nechala jsem vzorky separovat až do chvíle, kdy dosáhly rozhraní zaostřovacího a separačního gelu. Pak jsem nastavila napětí na 150 V a nechala jsem elektroforézu doběhnout, až čelo doputovalo po spodní okraj gelu (Obr. 13).

Vypnula jsem zdroj a stojánek vytáhla z vaničky. Elektrodový pufr z vnitřní části vyčila do výlevky a z vnější části jsem nalila do lahve a uchovávala ho v lednici. Povolila jsem spony, vytáhla skla s gelem, pomocí zelených klínek jsem rozevřela skla. Gel jsem odřízla od spacerů a odstranila jsem zaostřovací gel. Všechny součásti elektroforézy jsem důkladně umyla, osušila a uklidila.



Obrázek 13 - Nanesení a putování vzorků v gelu

6.3.3 Imunobloting

6.3.3.1 Zásobní roztok na imunobloting

Blotovací pufr – Navážila jsem 6,06 g Trisu a 28,8 g glycinu. Rozpustila v 500 ml redestilované vody. Přidala jsem 400 ml methanolu a doplnila v odměrné baňce na 2000 ml. Přelila jsem roztok do 1 l lahve a uchovávala v lednici.

Pracujeme v rukavicích. Oříznutý gel z předchozího kroku a nitrocelulóзовou membránu jsem vložila asi na 20 minut do blotovacího pufru v plastové krabičce s víčkem. Těsně před blotováním jsem namočila do blotovacího pufru i silný filtrační papír. Propisovací tužkou jsem si označila jednotlivé membrány.

Blotování probíhalo v přístroji BioRad TransBlot Turbo. Vysunula jsem šuplík z přístroje a začala jsem skládat blotovací sendvič směrem odspodu nahoru (proud jde odshora směrem dolů). Dolů jsem vložila 1 silný filtrační papír, pak membránu, gel, který jsem uhladila rukama, aby mezi ním a membránou nevznikly bubliny, a nahoru jsem položila silný filtrační papír. Opatrně jsem přiložila víčko na blotovací šuplík a uzamkla ho kolečkem. Šuplík jsem vložila do přístroje a zapnula tlačítkem na boku přístroje. Na obrazovce jsem vybrala *List* → *BioRad defined* → *2 MINI* či *1 MIDI*, v menu jsem pak vybrala 1,5 mm gel a přenastavila čas na 20 minut. Metodu jsem spustila tlačítkem *Run* a vybrala *A:Run* či *B:Run* nebo oboje, podle toho, kde jsou gely umístěny.

Po skončení přenosu jsem vytáhla šuplík, odemkla ho a sundala opatrně víčko. Nadzvedla jsem filtrační papír a podívala jsem se, zda se barva z molekulového standardu přenesla na membránu. Šuplíky jsem opláchla destilovanou vodou a nechala uschnout. Na membrány jsem si poznačila propisovací tužkou nejvýraznější proužky markeru – 25, 37, 50, 75 kDa (Towbin et al. 1979; Laemmli 1970).

6.3.4 Chemiluminiscenční detekce proteinů

6.3.4.1 Zásobní roztoky na detekci proteinů

0,1 M Tris pufr, pH 8,0 – Navážila jsem 12,11 g Trisu. Rozpustila v 800 ml redestilované vody a upravila pH na 8,0 pomocí 4 M HCl. Doplnila jsem redestilovanou vodou do 1000 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

TBST – Navážila jsem 8,77 g NaCl, rozpustila v 300 ml redestilované vody. Přidala jsem 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M Tris pufru, pH 8,0. Doplnila jsem v baňce na 1000 ml. Roztok jsem uchovávala lednici.

Primární protilátky – Zásobní protilátku jsem zředila dle instrukcí výrobce TBST pufrům s 1% BSA. Skladovala jsem v mrazáku. Před použitím jsem protilátku včas vytáhla a rozmrazila.

Sekundární protilátky – Zásobní protilátku jsem zředila podle instrukcí výrobce TBST pufrům s 1% BSA. Skladovala jsem v mrazáku.

Membránu jsem pinzetou přenesla do plastové misky s víčkem. Pomocí žiletky jsem membrány rozřezala na proužky podle pozice proteinů, které chceme detekovat, a vložila do 50 ml plastových zkumavek s redestilovanou vodou. Ty jsem umístila na roller mixer, kde byly po celou dobu inkubace. Membrány jsem 3× opláchla.

Mezitím jsem si připravila roztok 5% mléka v TBST pufru, které jsem nalila do 50 ml zkumavek s membránami a nechala jsem membrány blokovat alespoň 2 hodiny.

Poté jsem mléko slila a membránu opláchla redestilovanou vodou a nechala ji okapat na papír. Následně jsem do zkumavek s membránou nalila primární protilátku a inkubovala přes noc v chladicí místnosti.

Druhý den jsem přelila primární protilátku zpět do zkumavky a dala ji zamrazit pro další použití. Následně jsem oplachovala membrány TBST pufrům asi 4 × 15 min.

Dále jsem pokračovala inkubací membrány se sekundární protilátkou 1 hodinu. Následně jsem oplachovala membrány TBST pufrům 4 × 15 min.

Pro detekci jsem použila substrát *Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent*, protože jsem používala sekundární protilátky s navázanou křenovou peroxidázou. Substrát jsem v čase potřeby připravila smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1.

V temné komoře jsem si připravila fotomisky s vývojkou a ustalovačem, 2 krabičky s destilovanou vodou, krabičku s 3% kyselinou citronovou, kazetu, RTG filmy, fotopinzetu, nůžky, eurofolii, pipetu, špičky, koš, zkumavku, substrát, krabičku, papírové utěrky, popisovač a rukavice. Přenesla jsem tam také míchačku se vzorky (Obr. 14).



Obrázek 14 - Temná komora pro vyvolání filmů

Z 50 ml plastové zkumavky jsem přenesla proužky membrány s vybraným proteinem do plastové krabičky a napipetovala na ně substrát tak, aby byla pokryta celá plocha membrány. Nechala jsem membrány inkubovat 5 minut. Mezitím jsem si nachystala potřebný počet filmů, které jsem rozstříhala podle velikosti proužků membrán. Filmy jsem brala za hrany, nedotýkala jsem se ploch a pokládala je pouze do kazety. Nastříhala jsem si eurofolii, do které jsem vložila proužky membrány a odstranila jsem přebytečný substrát. Membrány zabalené ve folii jsem vložila do kazety a na ně položila film. Kazetu jsem opatrně zavřela, aby se neposunuly filmy, a nechala jsem film exponovat po dobu 3 až 15 minut v závislosti na intenzitě fluorescence.

Ihned po expozici jsem film ponořila celý do vývojky a sledovala jsem, až se na membráně začaly tvořit proužky. Film jsem ihned vytáhla a ponořila do 3% kyseliny citronové. Film jsem pak opláchla destilovanou vodou a ponořila do ustalovače. Nechala jsem ho tam asi 1 minutu a opláchla destilovanou vodou. Film jsem vytáhla a nechala osušit, popsala a uschovala. Membrány ve folii jsem dala do mrazáku a vše ostatní jsem uklidila.

Při znovupoužití membrány nejprve rozmrazíme (asi 5 minut), opláchneme v TBST pufri 4×15 minut, dáme na 2 hodiny do mléka a dále pokračujeme podle návodu.

6.4 Stanovení genové exprese

Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (qPCR) využívá fluorescenční sondy, které nám umožní sledování amplifikačních produktů během každého cyklu PCR reakce. Tato metoda je jednoduchá, specifická a citlivá (Bustin 2005).

6.4.1 Izolace RNA Trizolem

Trizol je specifická směs fenolu a guanidiniisothiokyanátu, která umožňuje selektivní izolaci celkové RNA (tRNA, rRNA, mRNA, microRNA) z malého množství tkání či buněk. Při izolaci RNA zůstává zachovaná integrita během homogenizace tkáně. Přídavkem chloroformu a následným stočením se rozdělí směs na vodnou a organickou fázi, přičemž RNA bude v horní vodné fázi. Následné selektivní vysrážení RNA pomocí isopropanolu umožní izolaci čisté RNA.

Těsně před izolací RNA jsem ošetřila pracovní plochu detergentem RNaseZAP, a vychladila centrifugu na 4°C. Homogenizaci jsem prováděla pomocí kuličkového homogenizátoru. Kuličky jsem přidala dávkovačem do zkumavek ke vzorku a nechala je homogenizovat 40 s při 6 m/s. Vzorky jsem vytáhla a nechala stát při laboratorní teplotě 5 minut. Přidala jsem 100 µl chloroformu a třepala 15 sekund v ruce (celý stojánek najednou). Nechala jsem vzorky stát další 2-3 minuty při laboratorní teplotě. Pak jsem je stočila v centrifuze vychlazené na 4°C, 15 minut při 12 000g. Opatrně jsem přepipetovala horní vodnou fázi (cca 2 x 100 µl) do nových, popsaných 1,5 ml zkumavek. Nesmíme se dotknout špičkou pipety mezifáze ani dolní organické fáze, protože by mohlo dojít ke kontaminaci vzorku genomovou DNA a proteiny. K přepipetované horní fázi jsem přidala 250 µl isopropanolu a intenzivně v ruce protřepala. Nechala jsem vzorky stát při laboratorní teplotě 10 minut. Naředila jsem si absolutní ethanol DEPC vodou na 75% ethanol. Vzorky jsem stočila v centrifuze 10 minut při 4°C a 12 000g. Zkumavky jsem dala do rotoru tak, aby byly všechny stejně otvíráním ke středu. Po stočení jsem ihned slila supernatant, omyla peletu 0,5 ml 75% ethanolu. Vzorky jsem protřepala v ruce a dala je stočit na centrifuze 5 minut, 7 500g, 4°C. Skleněnou pipetou s vytaženým koncem jsem odstranila supernatant tak, abych neodsála i peletu, která může být průhledná. Usušila

jsem peletu na vzduchu zhruba 10 minut, až začala zprůhledňovat. Pak jsem přidala 40 μ l DEPC vody (záleží na velikosti pelety, 20 pro neviditelnou peletu, 50 pro pěkně viditelnou peletu) a promíchala na vortexu. Nechala jsem vzorky stát asi 5 minut při laboratorní teplotě a pak jsem je promíchala ještě jednou a dala jsem je do ledu.

6.4.2 Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem

Nachystala jsem si vzorky, pipetu na malé objemy, špičky, redestilovanou vodu, buničinu, kádinku na odpad, USB – flash disk a fix. Zapnula jsem počítač, otevřela program NanoDrop a jako první jsem odklopila páčku a napipetovala 2 μ l vody na očištění. Páčku přístroje jsem přiklopila a dala změřit. Spodní i horní hrot jsem otřela buničinou. Otevřela se tabulka, kde jsem přepnula na měření RNA. Nanesla jsem 2 μ l vody jako blank a změřila. Vodu jsem otřela buničinou a zamíchala vzorek, který jsem pipetovala na spodní hrot. Do počítače jsem napsala název vzorku a změřila jsem koncentraci RNA. Takto jsem následně změřila všechny vzorky. Z NanoDropu jsem exportovala celou tabulku s údaji, kterou jsem si uložila na USB - flash disk.

Důležité údaje, které vyčteme z tabulky:

- 1) koncentrace
- 2) čistota I (kontaminace proteiny) – poměr absorbancí A260(DNA)/A280(proteiny) by měl být > 1,8
- 3) čistota II (kontaminace fenolem) – hodnota by se měla blížit 2, ale většinou je kolem 1

Vzorky jsem následně buď uložila do hlubokomrazícího boxu na -80°C pro pozdější zpracování, nebo jsem u nich provedla ošetření DNAsou.

6.4.3 Ošetření DNAsou

6.4.3.1 Zásobní roztoky pro ošetření DNAsou

0,5 M EDTA pH 8,0 – Navážila jsem 18,61 g EDTA, rozpustila v cca 80 ml DEPC vody, přidala 2 g NaOH. Měřila jsem pH a postupně přidávala NaOH, dokud se EDTA nerozpustila (kolem pH 8). Doplnila jsem vodou na 100 ml.

0,1 M EDTA pH 8,0 – naředila jsem ze zásobního roztoku 0,5 M 1:4

DEPC H₂O – redestilovaná voda ošetřená diethylpyrokarbonátem (DEPC) 0,1%, protřepala jsem a nechala stát přes noc a zklávovala 120°C na 20 minut.

DNAsa a DNase pufr

Ošetření vzorků RNA DNAsou, která selektivně štěpí pouze DNA, slouží k odstranění případné kontaminace vzorků genomovou DNA.

Z koncentrace RNA jsem si vypočítala, v kolika mikrolitrech vzorku mám 10 µg RNA a kolik musím přidat vody. Pak jsem si naředila DNAsu pufrům v poměru 1:3 podle počtu vzorků (+ 1-2 navíc).

Připravila jsem si reakční směs o celkovém objemu 30 µl do 0,5 ml zkumavek:

10 µg RNA (přepočítat podle změřené koncentrace)

x µl DEPC vody (dopočítat do objemu 26 µl)

4 µl naředěné DNAsy

Vzorky jsem promíchala, mírně stočila a nechala inkubovat v termomixéru Eppendorf 25 minut při 37°C s třepáním 500 rpm. Pak jsem přidala 1,5 µl 0,1 M EDTA a inkubovala jsem vzorky 10 minut při 75°C (inaktivace DNAsy). Vzorky jsem vytáhla z termomixéru do ledu a přidala jsem ke každému 18,5 µl DEPC vody (celkový objem vzorků je 50 µl).

Výsledná koncentrace ošetřené RNA je 0,2 µg/µl. Takto ošetřená RNA je připravena na reverzní transkripci. Vzorky uchováváme v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

6.4.4 Reverzní transkripce

6.4.4.1 Reagencie pro reverzní transkripci

Reverzní transkriptáza – ProtoScript II, Superscript II

Reakční pufr – dodáván spolu s reverzní transkriptázou

DTT – 10 x, dodáván s RT

Směs dNTP – koncentrace se liší u každého výrobce, 5 mM

RNaseIN – inhibitor RNase

Olionukleotidy – náhodné hexamery – N6

DEPC H₂O

RNA je reverzní transkriptázou převedena na jedno řetězcovou cDNA (complementary DNA) s použitím jednoho primeru.

- 1) Přípravila jsem si směs do 0,2 ml zkumavek, pipetovala jsem kapičky na stěnu, 2 zkumavky pro každý vzorek – jedna na reverzní transkripci a jedna na noRT (kontrola, bez přidávané RT)
 - 1 μ l náhodných hexamerů
 - 5 μ l RNA ředěné na 0,2 μ g/ μ l
- 2) Vzorky jsem zamíchala na vortexu a stočila.
- 3) Zapnula jsem PCR cyklér (MJ mini BioRad), vložila jsem vzorky, zaklapla víko a dotáhla jsem ho zeleným kolečkem. Z menu jsem vybrala metodu PMCDNA a spustila jsem *RUN*. V PCR cykléru se vzorky předehejí 5 minut na 65°C, potom jsem zmáčkla na cykléru *pause*, povolila jsem zelené kolečko, otevřela cyklér a vyndala zkumavky do mrazícího stojánku.

- 4) Během zahřívání jsem si připravila mastermixy RT a noRT dle počtu vzorků (+1-2 navíc) podle tabulky 9.

Tabulka 9 – Složení mastermixů RT + a noRT

RT +	noRT
4 µl pufr 5x	4 µl pufr 5x
2 µl DTT	2 µl DTT
4 µl dNTPs	4 µl dNTPs
0,5 µl RT	-
3,5 µl H ₂ O	4 µl H ₂ O

- 5) Ochlazené vzorky z mrazícího stojánku jsem stočila a do jedné sady přidala 14 µl mastermixu RT+ a do druhé sady RNA 14 µl mastermixu noRT, zamíchala jsem vzorky na vortexu a stočila.
- 6) Vzorky jsem dala zpátky do cykléru a zmáčkla *enter*. Při použití náhodných hexamerů se vzorky nejdříve zahřejí 10 minut na 25°C, pak 50 minut na 42°C (syntéza cDNA) a 5 minut na 80°C (denaturace RT).
- 7) Po reakci jsem do směsi přidala 80 µl redestilované vody, čímž jsem zředila připravenou cDNA 5× a do následných PCR reakcí jsem přidala 5 µl ředěné cDNA. Takto připravenou cDNA uchováváme při -20°C.

6.4.5 Kvantitativní PCR v reálném čase

6.4.5.1 Reagencie pro kvantitativní PCR v reálném čase

Směs SYBR Green I – 2x koncentrovaný, obsahuje DNA polymerasu, dNTPs, pufr a SGI

Forward primer – ředěný na koncentraci 5 µM

Reverse primer - ředěný na koncentraci 5 µM

redestilovaná voda

ředěná cDNA (1:4)

- 1) Do 0,5 ml mikrozkušavek jsem napipetovala – mastermix pro cílový gen a mastermix pro referenční gen (Tab. 10)
- 2) Příprava qPCR směsi při finální koncentraci primerů 250 nM probíhala podle tabulky 10. Příklad výpočtu mastermixu pro stanovení 12 vzorků v duplikátech: $12 \times 2 = 24 + 1 \times \text{NTC}$ (no template control – místo cDNA je voda) kontrola a 1 vzorek počítáme navíc kvůli pipetovací chybě – 26x.

Tabulka 10 - SYBR qPCR Master Mix

	250 nM	250 nM	250 nM
	1X	pro x reakcí ref. gen	pro x reakcí cíl. gen
voda	4,20	109,2	75,6
2 X SG mix	10,00	260,0	180
F primer	0,4	10,4	7,2
R primer	0,4	10,4	7,2
smíchat master mix a pipetovat 15 µl do jamek destičky			
cDNA	5,00	-	-
celkem	20,00	-	-

X= 26

X= 18

- 3) Směs mastermixu jsem rozpipetovala do jamek PCR destičky po 15 µl.
- 4) Přidala jsem 5 µl ředěné cDNA v duplikátech, pro NTC jsem pipetovala 5 µl vody. noRT cDNA jsem dělala jen pro referenční gen a jen jednou.
- 5) Destičku jsem uzavřela lepící folií, sklepla roztok dolů a dala stočit v centrifuze.
- 6) Destičku jsem umístila do PCR cykléru a spustila program Quant Studio 6.
- 7) Data jsem exportovala do Excelu, výpočet jsem provedla podle metody „comparative Ct“ (Nolan et al. 2006; Schmittgen et al. 2008).

V Tab. 11 uvádím nukleotidové sekvence použitých primerů.

Tabulka 11 - Sekvence použitých primerů

Gen	Forward primer	Reverse primer
CYP3A4	CCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGG	CTGGTGTTCTCAGGCACAGA
CYP2B6	CAGCTTCCGAGGGTACATCA	AGGATTGAAGGCGTCTGGTT
CYP2C	TTTGGGATGGGGAAGAGGAG	GGAGCACAGCCCAGGAT
CBR1	TTGGTACCCGAGATGTGTGC	CTTGGGGTTTTATTAGAGGGAG
AKR1C	ATGAGGAGCAGGTTGGACTG	GCTTTGAAGTGTAGAATATGTCTTCT

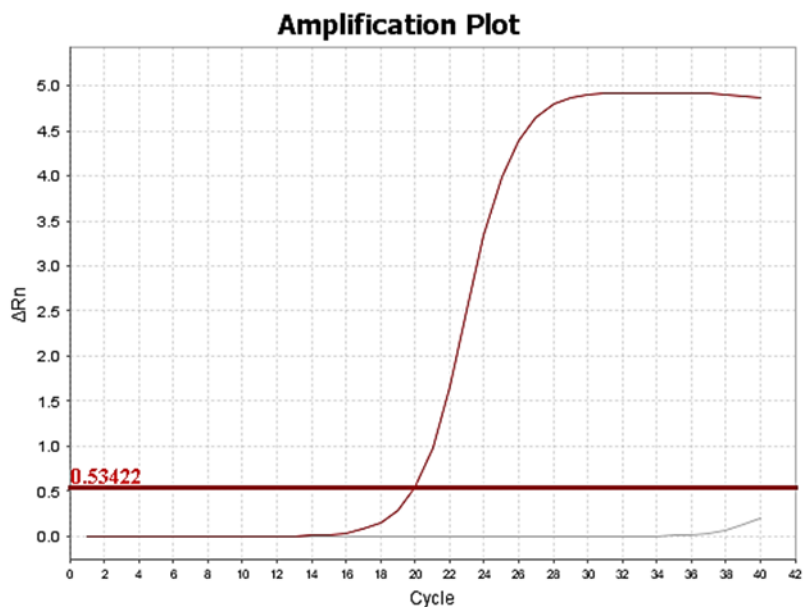
7 VÝSLEDKY

7.1 Vliv α -humulenu, β -karyofylenu a β -karyofylenoxidu na expresi mRNA vybraných biotransformačních enzymů

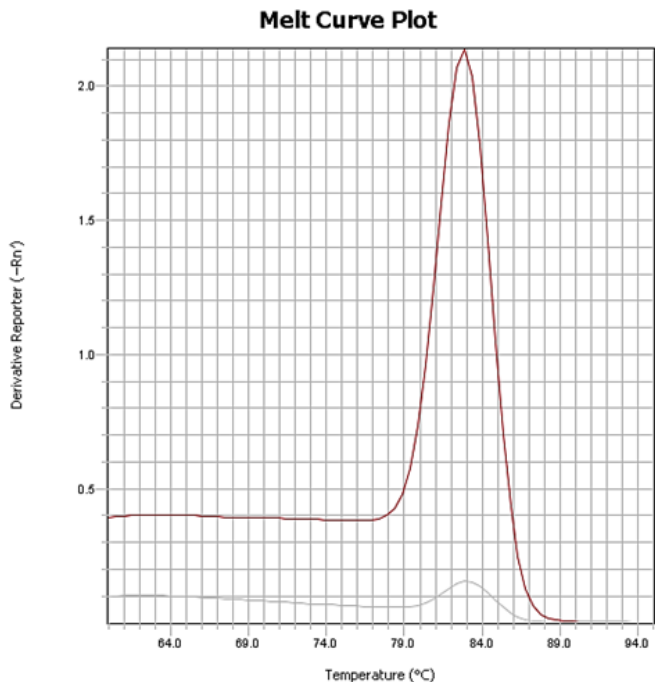
Pomocí qPCR jsem sledovala vliv tří vybraných seskviterpenů na expresi mRNA tří isoform cytochromu P450 (CYP3A4, CYP2B6 a CYP2C), karbonylreduktasy 1 a aldoketoreduktasy 1C3. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 2 hod a 24 hod. Jaterní řezy, které představují pozitivní kontroly, byly inkubovány za stejných podmínek s 10 μ M rifampicinem nebo 10 μ M β -naftoflavonem. Do kontroly, která nebyla ovlivněna žádnou látkou, jsem přidala stejné množství DMSO, jaké obsahovaly všechny ostatní vzorky (studované látky i pozitivní kontroly byly rozpuštěny v DMSO). Genovou expresi jsem stanovovala jen u vzorků, které obsahovaly pozitivní kontroly (RIF a BNF), tedy u člověka 1, 2 a 5.

7.1.1 Způsob vyhodnocení dat genové exprese

U dat získaných z qPCR jsem nejprve u každé sady primerů zkontrolovala amplifikační křivky a křivky tání. Nejprve jsem zjistila, jestli je v NTC kontrole přítomný produkt. Produkt v NTC kontrole značí vznik primer-dimerů. Akceptovat se dají vzorky, kde rozdíl mezi Ct hodnotou NTC kontroly a Ct hodnotou vzorků představuje minimálně pět cyklů. Dále jsem zkontrolovala, že křivky tání vzorků mají pouze jeden pík. Přítomnost primer-dimerů by ovlivnila i křivku tání NTC kontroly, kde by vznikl produkt s jinou teplotou tání, než mají specifické produkty. Vyhovující amplifikační křivka a křivka tání jsou uvedeny v Obr. 15 a Obr. 16.



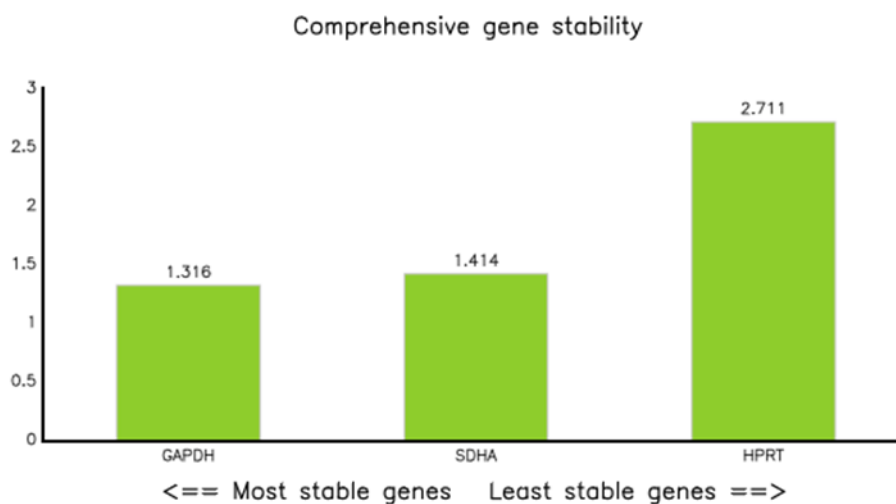
Obrázek 15 - Vyhovující amplifikační křivka. Horizontální šedá křivka představuje NTC kontrolu, ve které nevznikají primer-dimery. Hyperbolická křivka červené barvy reprezentuje vzorek. Horizontální červená přímka je prahová hodnota (tzv. „threshold“ linie) pro odečet Ct hodnot.



Obrázek 16 - Vyhovující křivka tání. Spodní šedá křivka je NTC kontrola a červená křivka s výrazným píkem je vzorek.

Pokud vzorky splňovaly výše uvedená kritéria, pak jsem přistoupila k vyhodnocení genové exprese. Data získaná z programu Quant Studio 6 Flex Software jsem vyhodnotila v programu Microsoft Excel. Použila jsem metodu „Comparative Ct“, kde jsem nejprve vypočítala průměr Ct hodnot jednotlivých duplikátů, a pak jsem z rovnice $2^{(-\Delta Ct)}$ provedla samotný výpočet. V této rovnici ΔCt představuje rozdíl mezi průměrnou Ct hodnotou stanovovaného genu a referenčního genu.

Kromě sledovaných genů jsem stanovovala expresi referenčních genů. Ty slouží jako vnitřní kontrola a používají se k relativní kvantifikaci mRNA. Nejprve jsem však musela ověřit, jestli studované seskviterpeny nebo pozitivní kontroly neovlivňují expresi vybraných referenčních genů. Stanovila jsem proto expresi tří často používaných referenčních genů: glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (GAPDH), hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy (HPRT) a podjednotky A sukcinátdehydrogenasy (SDHA). Výsledné Ct hodnoty jsem vložila do webového programu RefFinder, pomocí něhož jsem určila nejstabilnější gen (Obr. 17). Stabilita GAPDH a SDHA byla srovnatelná a jako referenční gen jsem nakonec použila jejich geometrický průměr.



Obrázek 17 - Výběr nejvhodnějšího referenčního genu pomocí programu RefFinder.

Při vyhodnocování vlastních vzorků jsem míře exprese v kontrolních vzorcích (vzorky, které nebyly inkubovány s žádnou látkou) přiřadila hodnotu 1,0 a k ní jsem pak vztahovala hodnoty exprese naměřené u ovlivněných vzorků (vzorků inkubovaných se seskviterpeny nebo u pozitivních kontrol). Studované látky v některých případech zvýšily expresi daného genu (indukce) proti kontrole, v jiných ji snížily (inhibice). Expresi všech sledovaných genů jsem stanovovala u tří lidí a každá látka byla inkubována se třemi

jaterními řezy z každého člověka. Pro vizualizaci změn v genové expresi jsem ze získaných výsledků vytvořila grafy, v nichž je uveden průměr a směrodatná odchylka ze tří biologických replikátů (tři řezy z jednoho člověka).

7.1.2 Vliv délky inkubace studovaných látek na genovou expresi vybraných enzymů

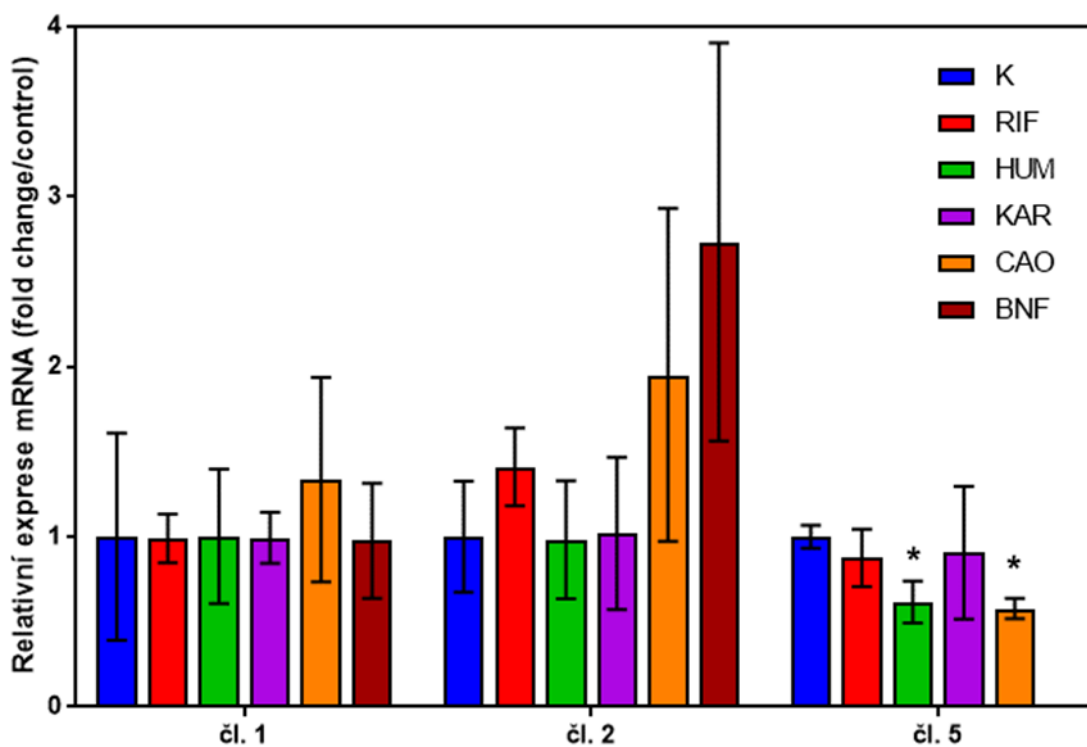
Na začátku experimentů jsem stanovila genovou expresi vybraných biotransformačních enzymů v jaterních řezech, které byly se studovanými látkami inkubovány po dobu 2 hodin při 37°C. Nejprve jsem u člověka 1, 2 a 5 porovnávala průměry Ct hodnot u referenčních genů GAPDH a SDHA v čase 2 hodiny a 24 hodin. Zjistila jsem, že u všech tří lidí a obou referenčních genů došlo k výraznému posunu Ct hodnot (Tab. 12). Vzhledem k tomu, že Ct hodnoty referenčních genů byly v čase 2 hodiny příliš vysoké a nebylo by tedy možné vyhodnotit genové exprese méně exprimovaných genů (např. CYP2C), tak jsem stanovovala genovou expresi vybraných biotransformačních enzymů už jen v čase 24 hodin.

Tabulka 12 - Změny v průměrné hodnotě Ct hodnot referenčních genů

Referenční gen	Člověk č.	Doba inkubace		Posun Ct hodnot (počet cyklů)
		2 hod	24 hod	
GAPDH	1	29,81	21,75	8,06
	2	24,99	20,31	4,68
	5	30,84	18,73	12,11
SDHA	1	neměřeno	25,69	
	2	30,06	27,78	2,28
	5	35,93	23,58	12,35

7.1.3 Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi AKR1C

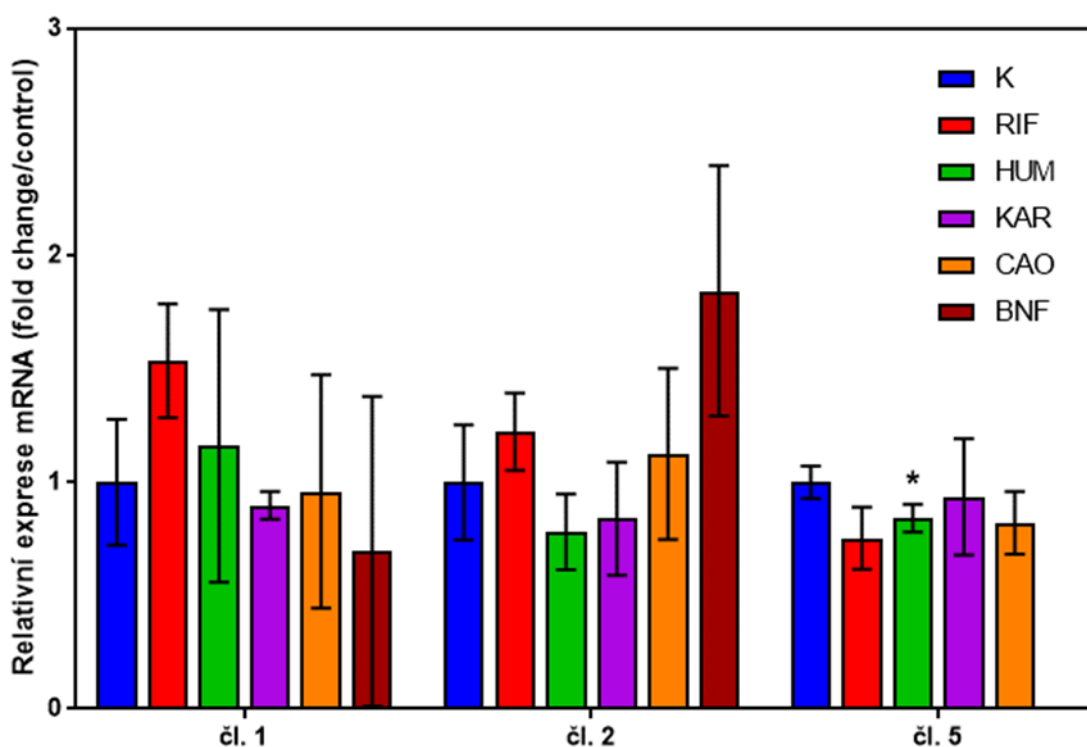
Primer pro qPCR byl navržen tak, aby se vázal na sekvence všech čtyř lidských AKR1C enzymů. Na Obr. 18 je uveden vliv HUM, KAR a CAO na expresi AKR1C. Mezi jednotlivými lidmi jsou patrné určité interindividuální rozdíly v účinku seskviterpenů i pozitivních kontrol. Zatímco u člověka 1 neměly studované látky ani RIF a BNF vliv na expresi AKR1C, tak u člověka 5 způsobily HUM a CAO statisticky významnou inhibici exprese těchto enzymů. U člověka 2 jsem pozorovala mírné zvýšení exprese AKR1C vyvolané působením RIF, CAO a BNF, ale díky velké variabilitě dat nejsou tyto účinky statisticky významné.



Obrázek 18 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi AKR1C. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze tří biologických replikátů. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).

7.1.4 Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi CBR1

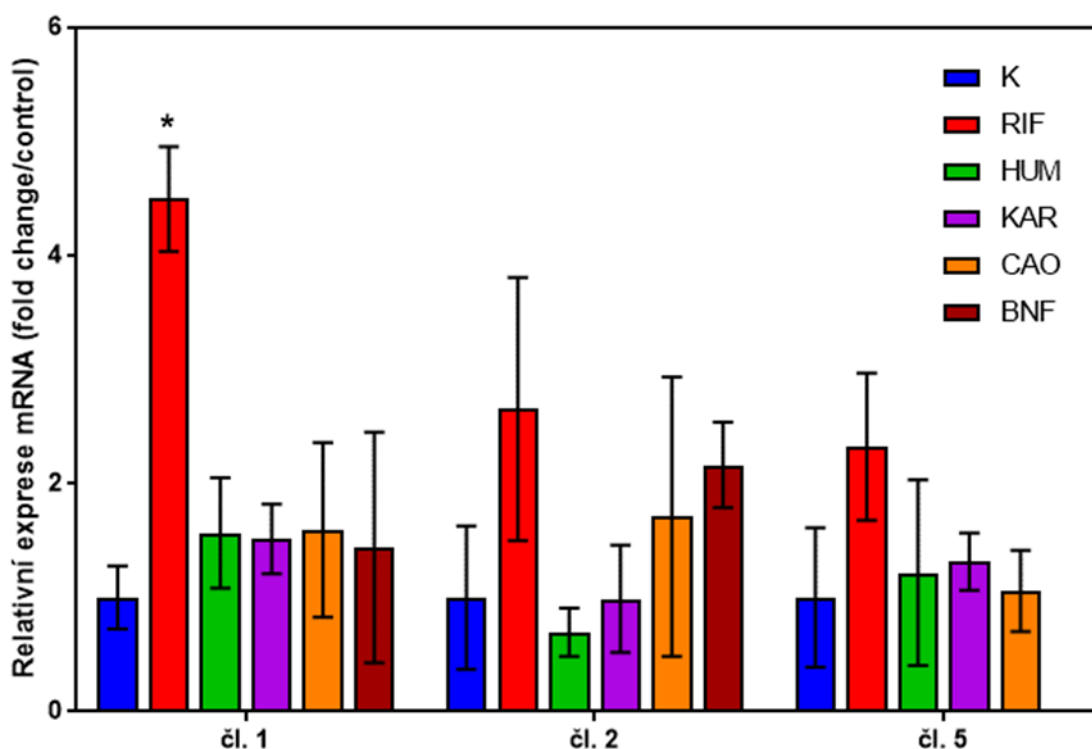
Na Obr. 19 je uveden vliv HUM, KAR a CAO na expresi CBR1. V tomto případě byl navržený primer specifický pouze pro sekvenci CBR1 a další lidské karbonylreduktasy nevázal. Jedinou statisticky významnou změnou bylo snížení exprese CBR1 u člověka 5 vyvolané HUM. Rovněž v případě CBR1 se zdá, že HUM, KAR a CAO nemají na genovou expresi tohoto enzymu velký vliv. Mírné zvýšení exprese CBR1 způsobené RIF respektive BNF u člověka 1 respektive 2 bylo nesignifikantní.



Obrázek 19 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi CBR1. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze tří biologických replikátů. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).

7.1.5 Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi CYP2C

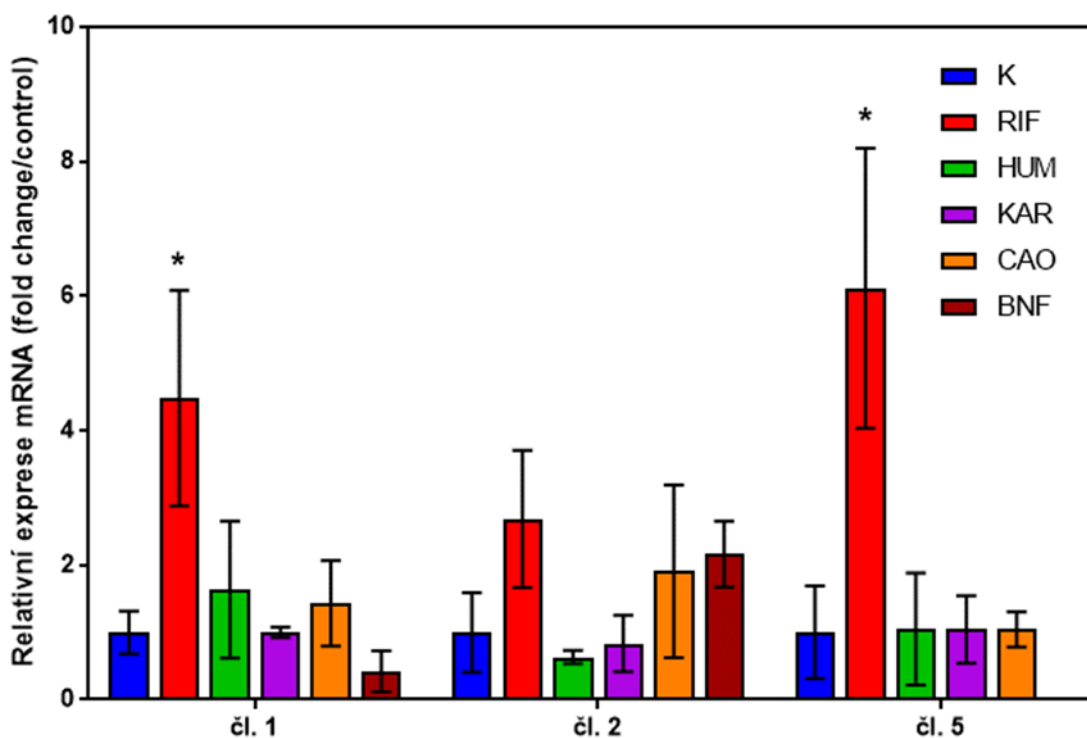
Na Obr. 20 je uveden vliv HUM, KAR a CAO na expresi CYP2C. Použitý primer byl schopen zachytit všechny čtyři lidské isoformy CYP2C, tedy CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. I když účinek seskviterpenů nebyl statisticky významný, tak lze ve výsledcích nalézt určité zvýšení exprese CYP2C. V případě člověka 1 zvýšily všechny tři seskviterpeny expresi CYP2C o 51-59 %, u člověka 2 o 71 % v případě CAO a u člověka 5 o 32 % v případě KAR. RIF zvyšoval expresi CYP2C u všech lidí, ale statisticky význam byl jeho účinek jen u člověka 1.



Obrázek 20 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi CYP2C. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze tří biologických replikátů. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).

7.1.6 Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi CYP3A4

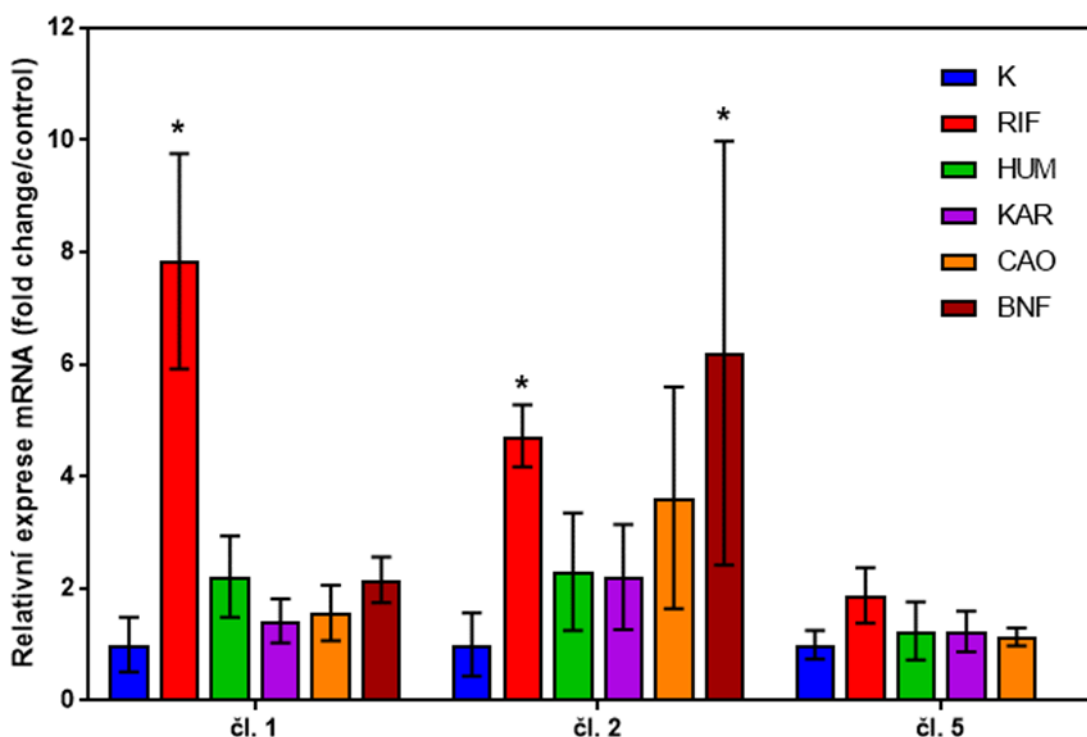
Nejvýznamnější lidskou isoformou CYP, která metabolizuje xenobiotika, je CYP3A4. RIF je známým induktorem tohoto enzymu. Na Obr. 21 je uveden vliv HUM, KAR a CAO na expresi CYP3A4. U všech tří lidí vyvolal RIF indukci exprese CYP3A4, kdy se exprese genu zvýšila 2,7 - 6,1krát proti kontrole, ale jen u člověka 1 a 5 byl tento účinek statisticky významný. Ze studovaných seskviterpenů zvyšovaly expresi CYP3A4 HUM (člověk 1) a CAO (člověk 1 a 2) a to o 64 % v případě HUM a o 43 % (člověk 1) a 91 % (člověk 2) v případě CAO, ale jejich účinek byl nesignifikantní. U člověka 2 zvýšil expresi CYP3A4 rovněž BNF.



Obrázek 21 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi CYP3A4. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze tří biologických replikátů. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).

7.1.7 Vliv HUM, KAR a CAO na genovou expresi CYP2B6

Největší účinek všech studovaných látek na genovou expresi jsem zaznamenala u CYP2B6. Na Obr. 22 je uveden vliv HUM, KAR a CAO na expresi CYP2B6. RIF způsobil až osminásobnou indukci exprese tohoto genu (člověk 1). U člověka 2 jsem zaznamenala signifikantní zvýšení exprese u RIF a BNF. HUM, KAR a CAO sice neměly díky větším odchylkám mezi biologickými replikáty statisticky významný vliv, ale ve výsledcích lze vyzorovat zvýšení exprese CYP2B6 u HUM, KAR i CAO u člověka 1 a 2 (1,4 – 3,6krát).



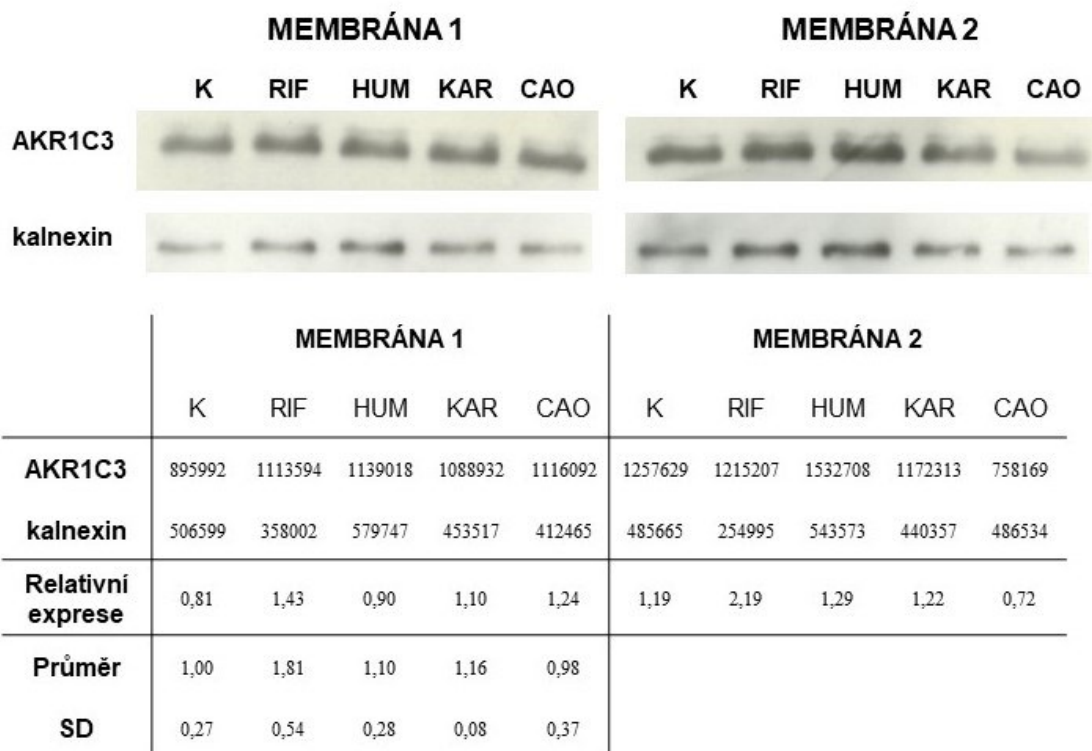
Obrázek 22 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi CYP2B6. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze tří biologických replikátů. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).

7.2 Vliv α -humulenu, β -karyofylenu a β -karyofylenoxidu na proteinovou expresi vybraných biotransformačních enzymů

Pomocí denaturující elektroforézy s následným Western blotem jsem sledovala vliv tří vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi dvou isoform cytochromu P450 (CYP3A4 a CYP2C), karbonylreduktasy 1 a aldoketoreduktasy 1C3. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci (HUM, KAR, CAO, RIF a BNF) při 37°C po dobu 24 hod. Proteinovou expresi jsem stanovovala u všech vzorků, tedy i těch které neobsahovaly pozitivní kontroly RIF a BNF (člověk 3 a 4).

7.2.1 Způsob vyhodnocení dat proteinové exprese

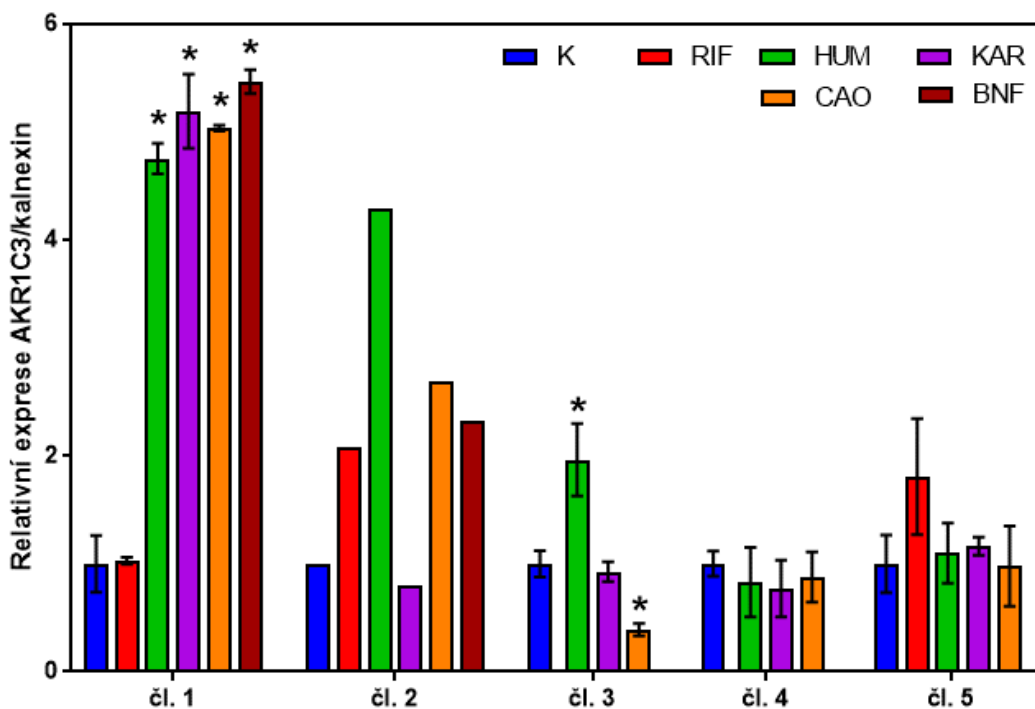
Po elektroforéze a Western blottingu jsem membrány vystavila chemiluminiscenční detekci na film. Získané filmy jsem pomocí přístroje GelDoc XR naskenovala do počítače a denzitu jednotlivých proužků jsem vyhodnotila v programu Image Studio Lite Ver 5.2. Provedla jsem relativní kvantifikaci studovaných proteinů a denzitu proužků jsem vztáhla na denzitu proužku proteinu kalnexin. Jedná se o protein endoplasmatického retikula, který je v buňkách konstitutivně exprimován. Ve svých experimentech jsem ho používala jako kontrolu nanášení pro cytosolické i mikrosomální enzymy, protože jaterní řezy byly po inkubaci se studovanými látkami zpracovány na tkáňový homogenát, ve kterém jsou přítomné jak cytosolické, tak mikrosomální enzymy. Pro každý stanovovaný enzym jsem provedla opakování, takže jsem měla dva bloty pro každý enzym i pro kalnexin. Pak jsem dělala poměr intenzity signálu vybraného enzymu k intenzitě signálu kalnexinu ze stejného blotu. Při vyhodnocování vlastních vzorků jsem míře exprese v kontrolních vzorcích (vzorky, které nebyly inkubovány s žádnou látkou) přiřadila hodnotu 1,0 a k ní jsem pak vztahovala hodnoty exprese naměřené u ovlivněných vzorků (vzorků inkubovaných se seskviterpeny nebo u pozitivních kontrol). Následně jsem udělala průměr a směrodatnou odchylku z vypočítaných relativních expresí daného enzymu ze dvou blotů. Ukázka získaných blotů a jejich kvantifikace jsou uvedeny v Obr. 23. V následujících sekcích uvádím už jen výsledky relativní kvantifikace proteinové exprese.



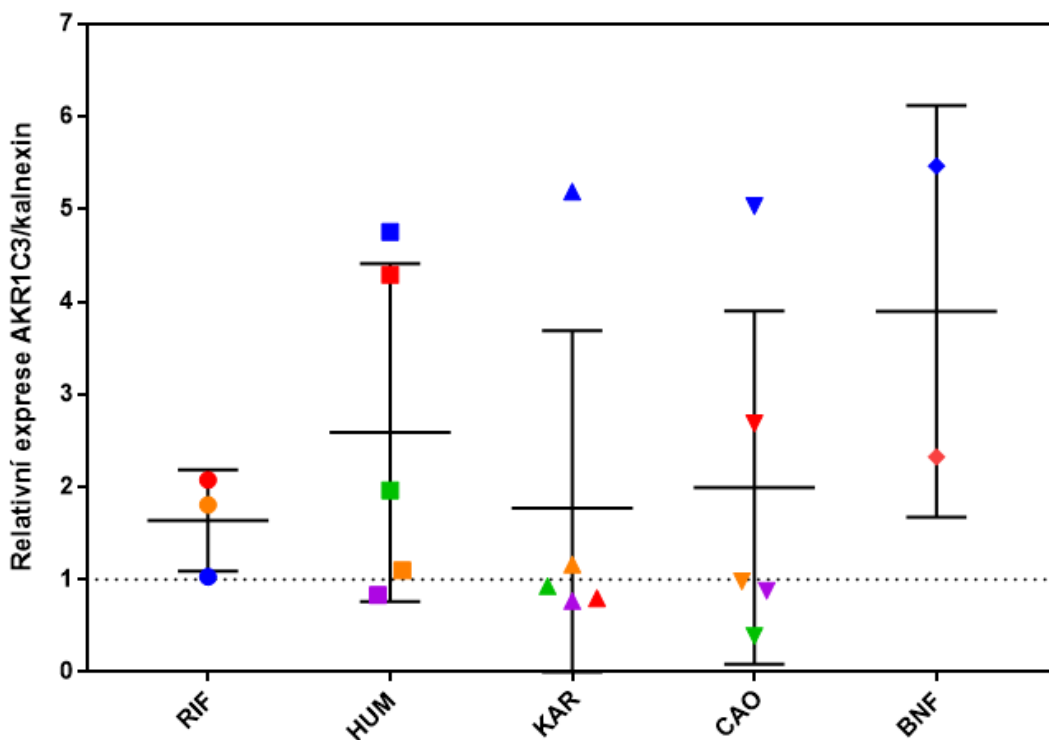
Obrázek 23 - Ukázka blotů pro AKR1C3 a kalnexin a následná relativní kvantifikace proteinové exprese AKR1C3 ze člověka 5.

7.2.2 Vliv HUM, KAR a CAO na proteinovou expresi AKR1C3

Největší indukční účinek studovaných seskviterpenů na proteinovou expresi AKR1C3 jsem zaznamenala u člověka 1, kde HUM, KAR a CAO zvýšily expresi proteinu 4,8 – 5,2krát ve srovnání s kontrolou. U tohoto člověka měl velký indukční účinek rovněž BNF (Obr. 24). U člověka 4 HUM zvýšil expresi AKR1C3 dvakrát, zatímco CAO ji snížil o 61,1 %. V případě člověka 2 se nepodařilo vyhodnotit intenzitu signálu z druhého blotu, proto prezentuji jen výsledek z prvního blotu bez směrodatné odchylky. Souhrnný graf působení seskviterpenů na expresi proteinu AKR1C3 u všech pěti vzorků jater je uveden v Obr. 25.



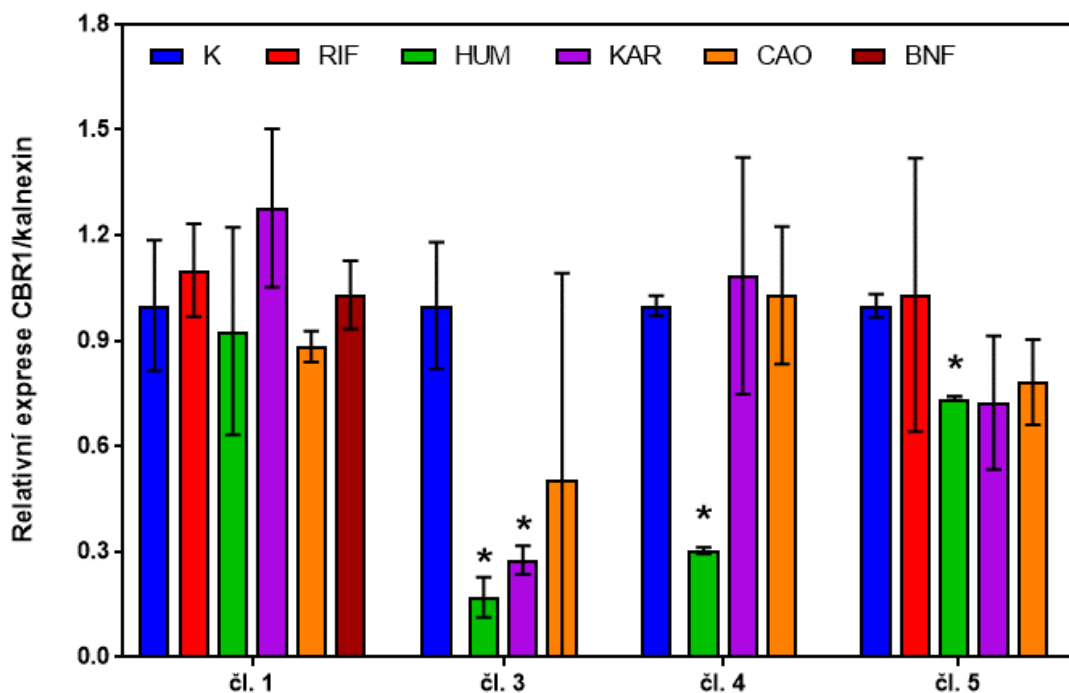
Obrázek 24 - Vliv seskviterpenů na proteinovou expresi AKR1C3. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze dvou měření \pm S.D. s výjimkou čl. 2, kde se jedná o jedno měření. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).



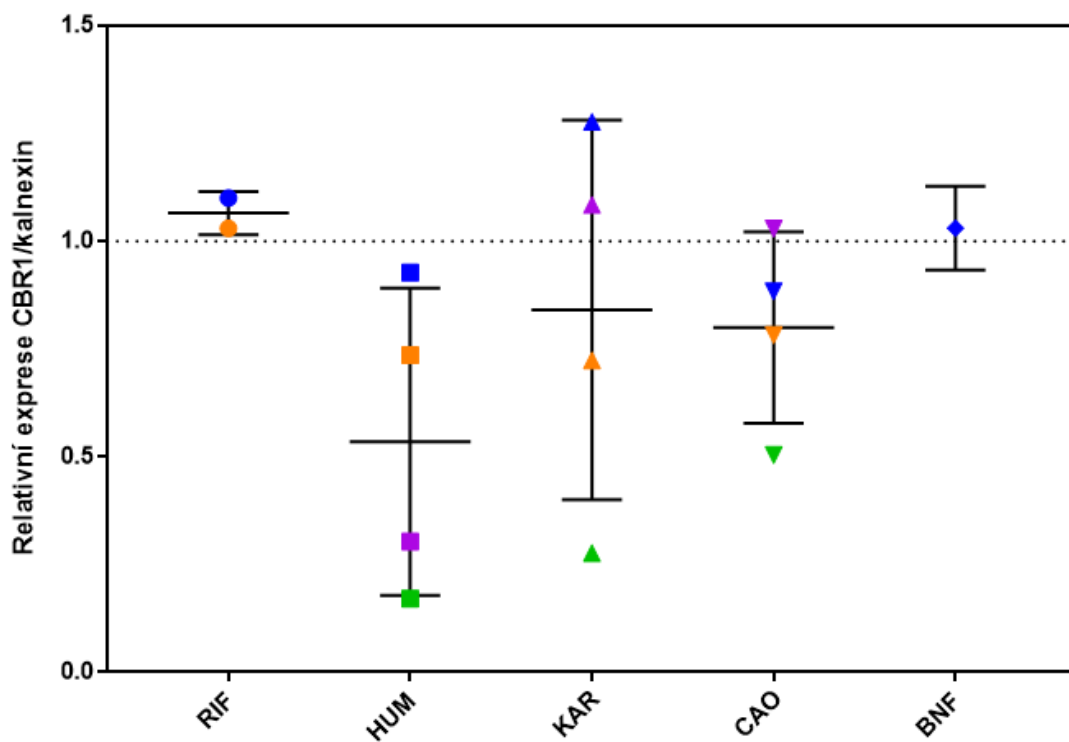
Obrázek 25 - Souhrnný graf vlivu seskviterpenů na proteinovou expresi AKR1C3 v pěti vzorcích lidských jater. Body se shodnou barvou pocházejí ze stejného jaterního vzorku.

7.2.3 Vliv HUM, KAR a CAO na proteinovou expresi CBR1

V případě proteinové exprese CBR1 se opakovaně nepodařilo stanovit expresi tohoto proteinu ve vzorcích z člověka 2. Ve třech vzorcích jsem zaznamenala statisticky významný inhibiční účinek HUM a v jednom případě též u KAR (Obr. 26). HUM snižoval expresi CBR1 o 69,7 %, 82,9 % respektive 26,4 % u člověka 3, 4 respektive 5. KAR způsobil inhibici proteinové exprese u člověka 4 o 72,3 %. V případě člověka 5 nebyl inhibiční účinek KAR a CAO signifikantní a pohyboval se v rozmezí 21,8 – 27,6 %. Souhrnný graf působení seskviterpenů na expresi proteinu CBR1 u čtyř vzorků jater je uveden v Obr. 27.



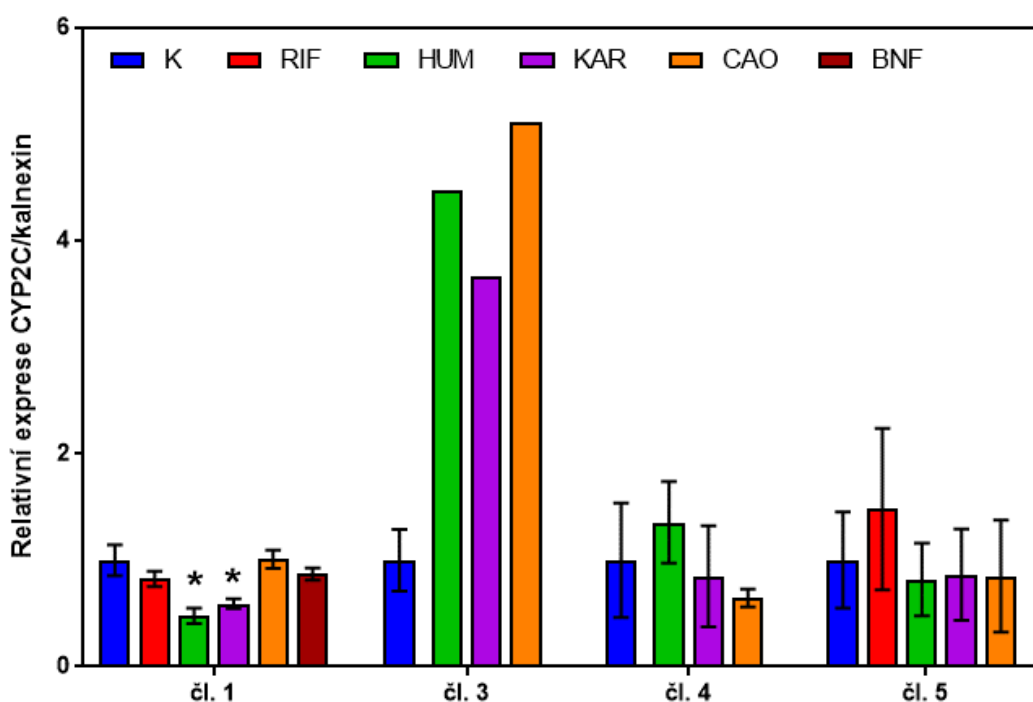
Obrázek 26 - Vliv seskviterpenů na proteinovou expresi CBR1. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze dvou měření \pm S.D. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).



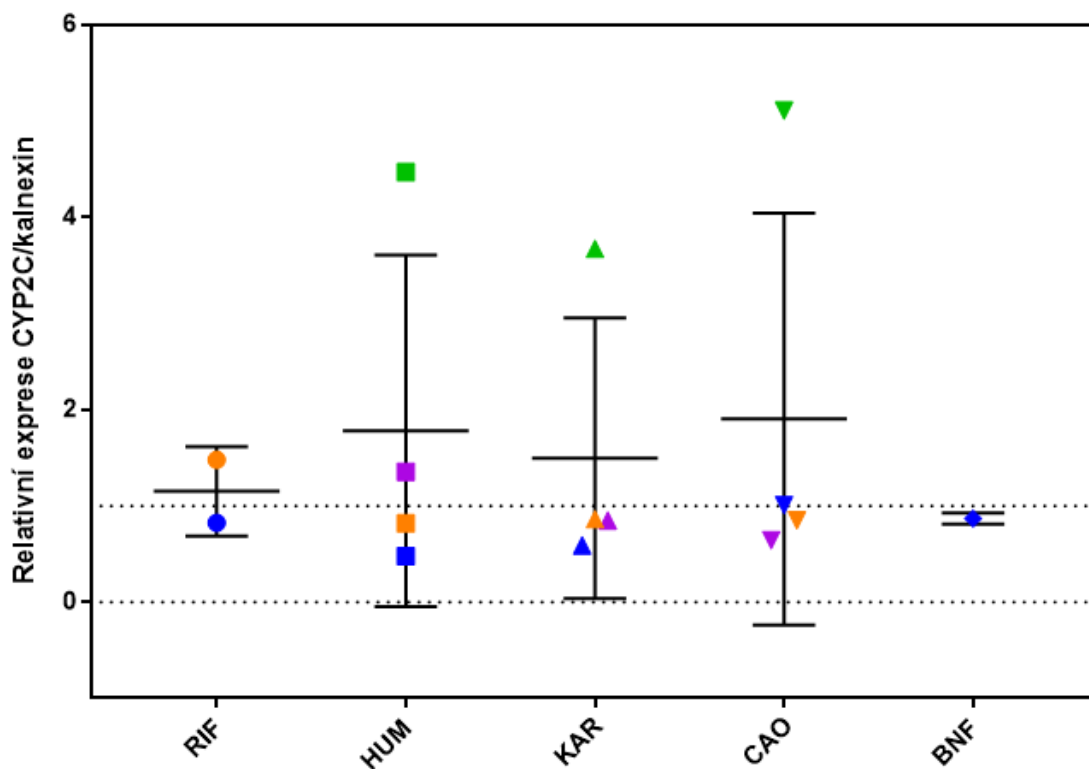
Obrázek 27 - Souhrnný graf vlivu seskviterpenů na proteinovou expresi CBR1 ve čtyřech vzorcích lidských jater. Body se shodnou barvou pocházejí ze stejného jaterního vzorku.

7.2.4 Vliv HUM, KAR a CAO na proteinovou expresi CYP2C

V případě CYP2C byla použita protilátka, která je schopná se vázat na všechny čtyři lidské isoformy tohoto cytochromu. Na expresi proteinu CYP2C měly statisticky významný vliv jen HUM a KAR ve vzorcích z člověka 1, kde došlo ke snížení proteinové exprese o 40,9 – 52,3 % ve srovnání s kontrolou (Obr. 28). V případě proteinové exprese CYP2C se opakovaně nepodařilo stanovit expresi tohoto proteinu ve vzorcích z člověka 2 a ve druhé membráně z člověka 3. U člověka 3 jsem zaznamenala indukční účinek všech tří seskviterpenů, ale ten nelze statisticky vyhodnotit. Souhrnný graf působení seskviterpenů na expresi proteinu CYP2C u čtyř vzorků jater je uveden v Obr. 29.



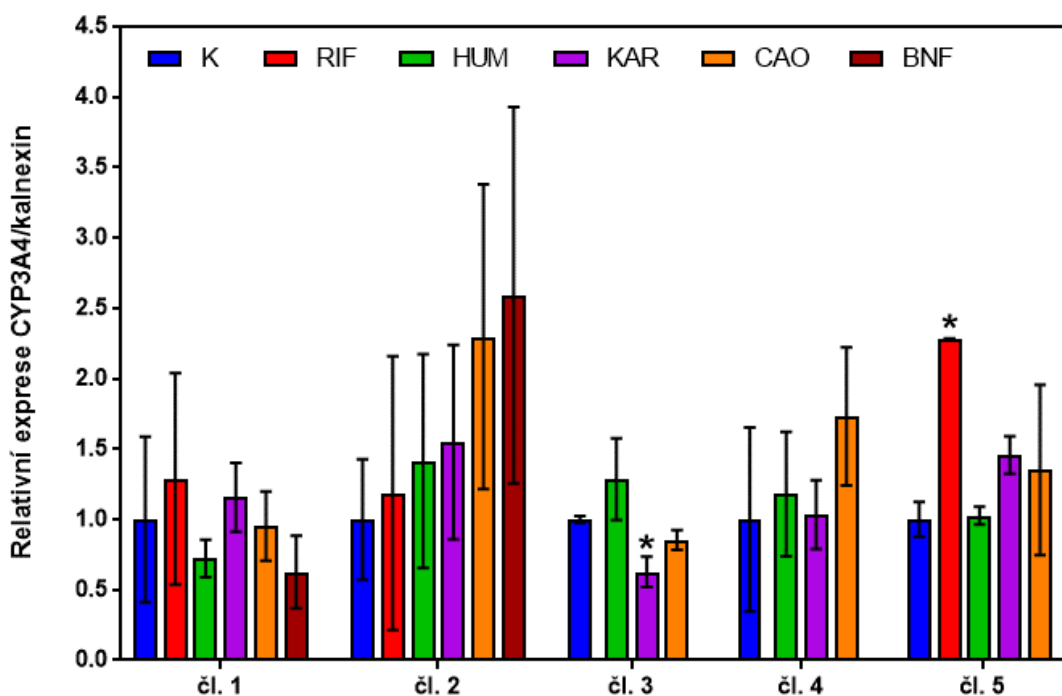
Obrázek 28 - Vliv seskviterpenů na proteinovou expresi CYP2C. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze dvou měření \pm S.D. s výjimkou čl. 3, kde se jedná o jedno měření. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).



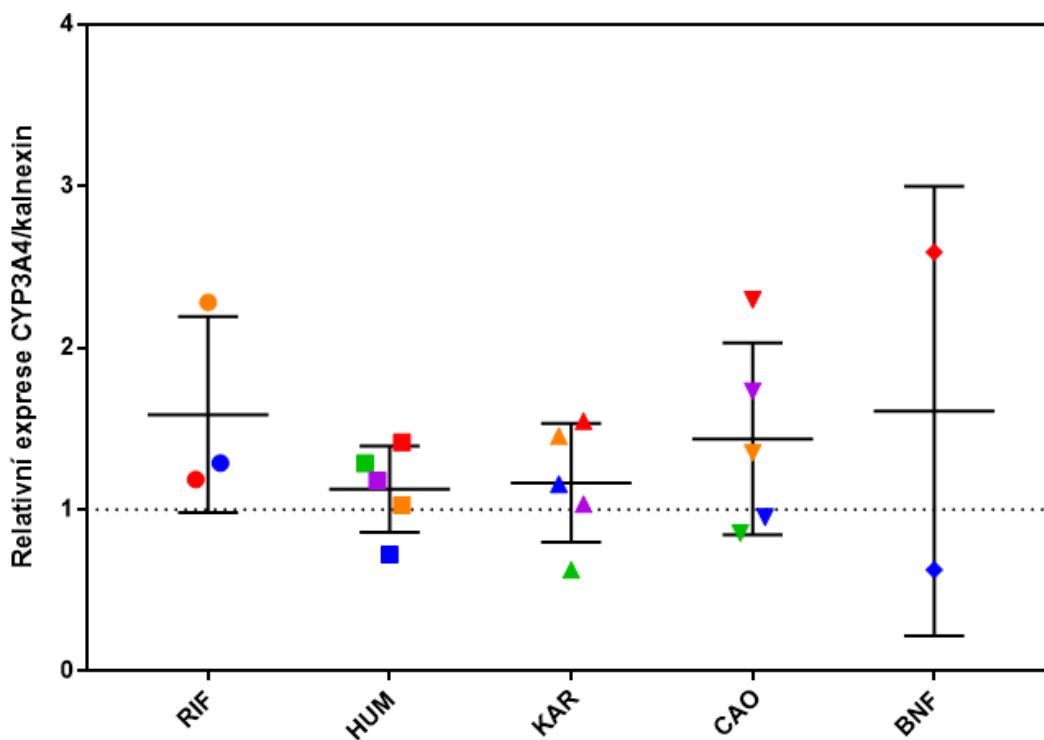
Obrázek 29 - Souhrnný graf vlivu seskviterpenů na proteinovou expresi CYP2C ve čtyřech vzorcích lidských jater. Body se shodnou barvou pocházejí ze stejného jaterního vzorku.

7.2.5 Vliv HUM, KAR a CAO na proteinovou expresi CYP3A4

RIF je známý a silný induktor CYP3A4, ale v případě ovlivnění proteinové exprese tohoto enzymu jsem pozorovala indukční účinek RIF pouze u člověka 5, kde se exprese CYP3A4 zvýšila 2,28krát proti kontrole (Obr. 30). Ze studovaných seskviterpenů se projevil inhibiční účinek KAR a částečně i CAO u člověka 4. KAR signifikantně snížil proteinovou expresi o 37,2 % ve srovnání s kontrolou, zatímco CAO jen 14,6 % a tento účinek nebyl statisticky významný. Vliv seskviterpenů na expresi proteinu CYP3A4 v dalších jaterních vzorcích nebyl díky velké variabilitě dat statisticky významný. Souhrnný graf působení studovaných seskviterpenů na expresi proteinu CYP3A4 u pěti vzorků jater je uveden v Obr. 31.



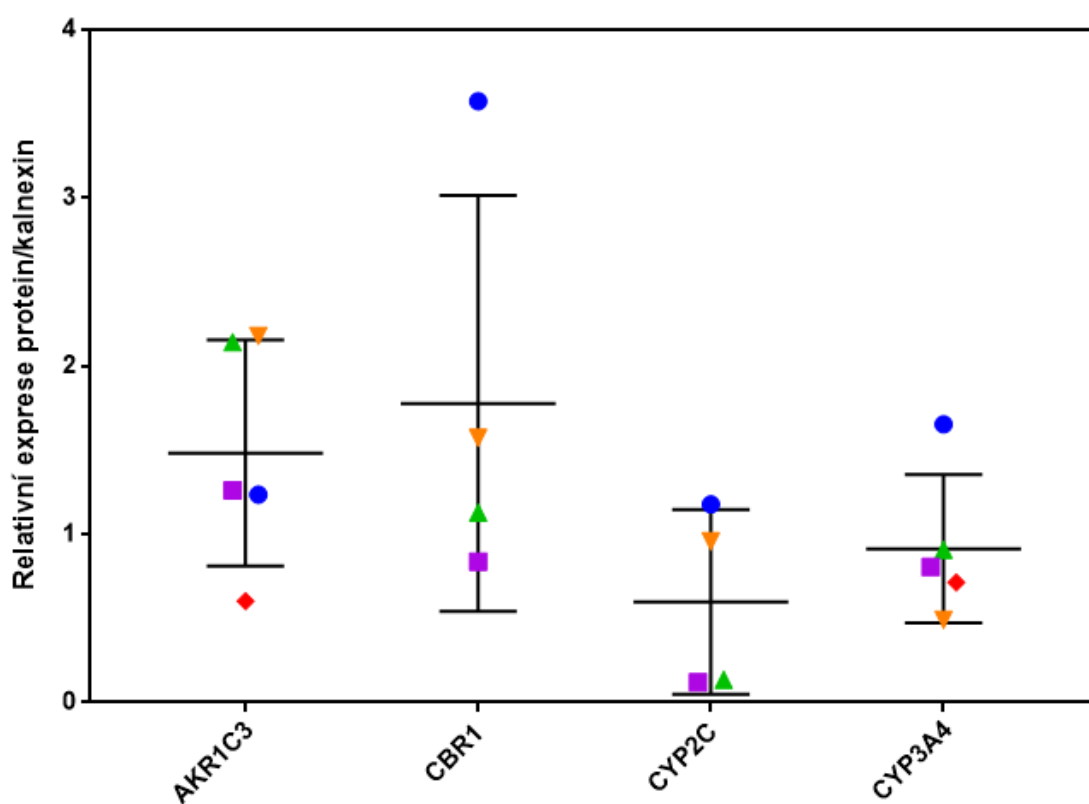
Obrázek 30 - Vliv seskviterpenů na proteinovou expresi CYP3A4. Jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v 10 μ M koncentraci při 37°C po dobu 24 hodin. Každý bod představuje průměr ze dvou měření \pm S.D. * signifikantně se liší od kontroly (Studentův t-test, $p < 0,05$).



Obrázek 31 - Souhrnný graf vlivu seskviterpenů na proteinovou expresi CYP3A4 v pěti vzorcích lidských jater. Body se shodnou barvou pocházejí ze stejného jaterního vzorku.

7.2.6 Srovnání interindividuální variability v proteinové expresi studovaných enzymů

Mezi jednotlivými jaterními vzorky jsem pozorovala velkou interindividuální variabilitu v proteinové expresi. Proto jsem vypracovala souhrnný graf proteinové exprese jednotlivých enzymů v kontrolních vzorcích (Obr. 32). Z grafu je patrné, že k největší variabilitě docházelo u CBR1 a CYP2C, u kterých dosahoval variační koeficient 69,5 % a 91,9 %. U AKR1C3 a CYP3A4 byl variační koeficient podobný a dosahoval 45,3 % a 48,2 %.



Obrázek 32 - Interindividuální variabilita relativní proteinové exprese studovaných enzymů v kontrolních vzorcích. Body se shodnou barvou pocházejí ze stejného jaterního vzorku.

8 DISKUZE

V současné době se zvýšila obliba v používání přírodních přípravků, alternativní medicíny a doplňků stravy, ve kterých se vyskytují i seskviterpeny. Zjistilo se, že určité seskviterpeny mohou mít vliv na některé biotransformační enzymy, které metabolizují xenobiotika včetně léčiv. Tyto látky proto mohou ovlivnit metabolismus a účinek současně podaných léčiv. Tyto účinky ještě nebyly dostatečně prozkoumány, a proto by měly pokračovat studie, které popisují metabolismus a interakce těchto látek s biotransformačními enzymy v organismu.

Z dřívějších studií je známo, že některé seskviterpeny mohou ovlivňovat aktivitu a expresi biotransformačních enzymů *in vitro* a *in vivo* (Nguyen et al. 2017, Špičáková et al. 2017, Lněničková et al. 2017, Nakamura et al. 2004). Lineární seskviterpeny *cis*-nerolidol, *trans*-nerolidol a farnesol signifikantně inhibovaly aktivitu podrodin CYP1A, CYP2B a CYP3A v lidských i potkaních jaterních mikrozomech. Aktivita karbonyl-redukujících ani konjugačních enzymů nebyla těmito látkami ovlivněna (Špičáková et al. 2017).

Cyklické seskviterpeny α -humulen, β -karyofylen a β -karyofylenoxid významně inhibovaly aktivitu CYP 1A2 (měřeno pomocí EROD) a CYP3A/2B (měřeno pomocí BROD), zatímco na aktivitu AKR1A, AKR1C, CBR1, NADPH:chinonoxidoreduktasy 1, UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy a glutathion-S-transferasy v lidských a potkaních jaterních mikrozomech neměly tyto látky vliv. Nejsilnějším inhibitorem CYP3A/2B byl β -karyofylenoxid (Nguyen et al. 2017).

In vivo studii provedené na myších vyvolalo jednorázové p.o. podání β -karyofylenoxidu a *trans*-nerolidolu zvýšení aktivity a exprese mRNA CYP2C, CYP2C a CYP3A v játrech a tenkém střevě, zvýšení aktivity AKR1C, CBR1 a sulfotransferasy v játrech a snížení aktivity NADPH:chinonoxidoreduktasy 1 v tenkém střevě (Lněničková et al. 2017).

Oxidovaný analog α -humulenu zerumbon aktivoval prostřednictvím transkripčního faktoru Nrf2 expresi enzymů II. fáze biotransformace v potkaních jaterních buňkách RL34. V důsledku aktivace Nrf2 došlo k následnému zvýšení hladiny proteinu glutathion-S-transferasy, glutathionreduktasy, NADPH:chinonoxidoreduktasy 1 a hemoxygenasy a také ke zvýšení aktivity glutathion-S-transferasy (Nakamura et al. 2004).

Kurkuma vonná (*Curcuma aromatica*; *Zingiberaceae*), která se používá v Indii, Číně, Japonsku a Jihovýchodní Asii jako koření, ochucovadlo, barvivo a prostředek lidové medicíny, má protizánětlivé, antioxidační a antikancerogenní účinky. Již dříve bylo zjištěno, že látky obsažené v tomto koření jako jsou kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin inhibují některé isoformy CYP, UDP-glukuronosyltransferasu a sulfottransferasu v lidských jaterních mikrosomech (Volak et al. 2008).

V další studii bylo z rostliny *Curcuma aromatica* vyizolováno 10 seskviterpenů a 2 kurkuminoidy a byl studován jejich inhibiční účinek vůči několika isoformám CYP. Nejsilnějším inhibitorem CYP byl demethoxykurkumin. Jeden z vyizolovaných seskviterpenů, (4S,5S)-(+)-germakron-4,5-epoxid, vykazoval srovnatelnou inhibiční aktivitu vůči lidským CYP3A4, CYP1A2 a CYP2C9 s kurkuminoidy (Bamba et al. 2011).

Genová exprese (přepis genetické informace z DNA do proteinu) je regulována na několika úrovních. Mezi nejdůležitější regulační mechanismy patří regulace transkripčními faktory a nukleárními receptory, epigenetická regulace, stabilizace nebo degradace mRNA, regulace na úrovni degradace proteinu v proteasomu (Skálová et al. 2017).

Nejdůležitějším mechanismem genové regulace enzymů 1. a 2. fáze biotransformace je transkripční regulace prostřednictvím nukleárních receptorů. Nukleární receptory jsou proteiny, které po navázání ligandu v cytoplazmě aktivují transkripční kaskádu dějů, která spouští expresi cílových genů v jádře. Transkripční regulace genové exprese biotransformačních enzymů a lékových transportérů probíhá především prostřednictvím receptoru pro aromatické uhlovodíky (AhR), pregnanového X receptoru (PXR), konstitutivního androstanového receptoru (CAR) a glukokortikoidního receptoru (GR). PXR společně s CAR regulují celou řadu genů

kódujících pro enzymy 1. a 2. fáze biotransformace a lékové transportéry. K nejdůležitějším z nich patří hlavní forma cytochromu P450 zapojená do metabolismu léčiv a to CYP3A4. K ligandům PXR náleží farmaka z celé řady terapeutických skupin, některé toxiny ale i endogenní steroidy. Mezi látky ovlivňující PXR patří například fenobarbital, haloperidol, rifampicin, lovastatin, tamoxifen a jako inhibitor působí ketokonazol. CAR reguluje také enzymy 1. a 2. fáze biotransformace, podílí se na metabolismu endogenních látek, jako jsou bilirubin, žlučové kyseliny, steroidní hormony a mastné kyseliny. Látky ovlivňující CAR jsou statiny, fenobarbital, valproát a mezi inhibitory patří například androstanol a klotrimazol. GR se podílí na transkripční regulaci CYP2C9, CYP2B6 a CYP3A4. Některá xenobiotika interagují s PXR a CAR a ovlivňují tak expresi jimi regulovaných enzymů (Skálová et al. 2017).

Ve své diplomové práci jsem jako pozitivní kontroly používala rifampicin (10 μ M) a β -naftoflavon (10 μ M). Rifampicin aktivuje PXR a tak indukuje CYP3A4 (Li a Chiang 2006).

U člověka však byla popsána i přímá aktivace genu pro CYP2B6 rifampicinem, o níž se předpokládá, že je zprostředkována receptorem CAR (Goodwin et al. 2001). Díky mezikomunikaci („cross-talk“) s dalšími jadernými faktory regulují PXR a CAR řadu běžných genů. Rifampicin je schopen indukovat i CYP2C, ale s výrazně menší účinností, než je tomu v případě indukce CYP3A (Handshin a Meyer 2003).

Ve svých experimentech jsem zaznamenala indukci mRNA CYP3A4 vyvolanou rifampicinem, ale také zvýšení exprese mRNA CYP2B6 a CYP2C, což je v souladu s daty prezentovanými v literatuře. β -Naftoflavon je známým induktorem zejména CYP1A1 a CYP1A2 (Meunier et al. 2000). Ve svých výsledcích jsem zaznamenala u jednoho vzorku jater signifikantní indukci CYP2B6, AKR1C a CBR1 vyvolanou β -naftoflavonem. Významný vliv na proteinovou expresi studovaných enzymů jsem v případě rifampicinu zaznamenala jen u CYP3A4 a jen u jednoho jaterního vzorku.

Účinek cyklických seskviterpenů HUM, KAR a CAO na transkripci a translaci biotransformačních enzymů zatím nebyl příliš studován. V mé práci pouze HUM vykazoval signifikantní inhibiční účinek na expresi mRNA CBR1 a AKR1C a CAO na expresi mRNA AKR1C a to jen u jednoho vzorku jater. Proteinovou expresi studovaných enzymů nejvíce ovlivnil HUM, který významně snížil množství proteinu CBR1 (tři jaterní vzorky) a CYP2C (jeden vzorek) a signifikantně zvýšil množství proteinu AKR1C3 (3

vzorky). U dalších dvou seskviterpenů jsem zaznamenala inhibiční účinek u CYP3A4, CYP2C a CBR1 (všechny KAR, vždy jeden vzorek) a AKR1C3 (CAO, jeden vzorek).

Cyklické seskviterpeny zederon a germakron významně aktivovaly lidské jaderné receptory PXR a CAR a v primární kultuře lidských hepatocytů indukovaly expresi mRNA CYP2B6 a CYP3A4, zatímco jejich účinek na expresi mRNA CYP1A2 byl velmi slabý. Tyto látky pak působily jako silné inhibitory lidských rekombinantních enzymů CYP2B6, CYP2C9 a CYP2C19 a rovněž inhibovaly aktivitu CYP2B6 a CYP3A4 v lidských jaterních mikrozomech (Pimkaew et al. 2013).

Při *in vivo* experimentech na myších byla 24 hodin po *p.o.* aplikaci *trans*-nerolidolu pozorována signifikantní indukce mRNA CYP2B, CYP3A11 a CYP3A25 v játrech, zatímco podání CAO vyvolalo inhibici exprese mRNA CYP2B (Lněničková et al. 2017).

Metabolismus xenobiotik ovlivňuje celá řada faktorů, ať už fyziologických nebo patologických. Tyto faktory dělíme na interindividuální a intraindividuální. Mezi interindividuální faktory, které zůstávají během života jedince neměnné, patří živočišný druh, genetické faktory a pohlaví. Mezi intraindividuální faktory patří věk, hormonální vlivy, těhotenství, biologické rytmy, stres, onemocnění, výživa, indukce a inhibice enzymů.

Geneticky podmíněné rozdíly v metabolismu léčiv se zjistí tehdy, když se ve velké skupině lidí, kteří dostávají stejnou dávku farmaka ve stejných intervalech, vyskytnou jedinci s mimořádnou odpovědí na dané léčivo. Léčivo je buď odbouráváno extrémně pomalu a vzniká tak nebezpečí jeho toxického působení, nebo je naopak léčivo metabolizováno příliš rychle a není tak dosaženo terapeutických hladin. V lidské populaci jsou genetické rozdíly v biotransformaci xenobiotik až 6× častější než u jiných živočišných druhů. Genetický polymorfismus byl prokázán u většiny biotransformačních enzymů. CYP2B6 metabolizuje některé pesticidy, chemoterapeutika a antidepresiva. Z velkého množství polymorfismů mají význam pouze CYP2B6*6 a CYP2B6*18. U CYP2C9, který metabolizuje mnoho klinicky významných léků, jako je warfarin, ibuprofen či fenytoin, bylo nalezeno 29 variantních allel (Skálová et al. 2017).

Hlavním rysem cytochromu CYP3A je velký rozsah interindividuální variability v lidské populaci. To znamená, že bude ovlivněn metabolismus léčiv, které má CYP3A na starosti. Nejsilnějšími induktory CYP3A jsou rifampicin a rifabutin, jejichž společné podání může snížit plazmatickou hladinu léčiva až 40×, což negativně ovlivní účinnost léčby. Dalšími léčivy jsou antihistaminika, imunosupresiva a benzodiazepiny (Thummel a Wilkinson 1998).

Enzymová indukce hraje významnou roli ve vývoji a diferenciaci buněk, v regulaci klíčových metabolických dějů, zasahuje také do mechanismu účinku řady hormonů a je i adaptivní odpovědí organismu na některá xenobiotika, kterou se brání před jejich hromaděním a toxicitou. Enzymová indukce se definuje jako zvýšení aktivity specifického enzymu, které vede ke zvýšení jeho syntézy nebo snížení jeho degradace. Většinou indukce znamená zvýšení syntézy mRNA a proteinové syntézy specifického enzymu.

Indukce může mít významné farmakologické a toxikologické důsledky. Modulací aktivity biotransformačních enzymů je pozměněna intenzita ale i doba trvání účinku následně podaných léků. Výsledkem pak může být buď několikanásobné zvýšení plasmatických hladin účinné látky a riziko toxického působení nebo snížení plasmatické koncentrace účinné látky pod limit léčebného efektu. V případě antibiotik nebo antiparazitik se snížením koncentrace účinné látky pod terapeutickou hladinu zvyšuje nebezpečí vzniku rezistence bakterií či parazitů (Skálová et al. 2017).

Výsledky této práce ukázaly, že účinky testovaných seskviterpenů na transkripci a translaci vybraných biotransformačních enzymů nejsou konzistentní a odrážejí spíše interindividuální variabilitu mezi jednotlivými dárci jaterních vzorků. Účinek studovaných seskviterpenů mohl být rovněž ovlivněn předchozí farmakoterapií dárců a jejich celkovým zdravotním stavem.

9 ZÁVĚR

Výsledky mé diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Z jater jsem připravila ultratenké řezy o tloušťce 150-180 μm a průměru 8 mm, které jsem po prvotní preinkubaci 24 hodin inkubovala s vybranými mono- a bicyklickými seskviterpeny (α -humulen, β -karyofylen a β -karyofylenoxid) ve 12 jamkové destičce a v atmosféře pneumoxidu (95% O_2 /5% CO_2).
- Pomocí qPCR jsem sledovala vliv tří vybraných seskviterpenů na expresi mRNA tří isoform cytochromu P450 (CYP3A4, CYP2B6 a CYP2C), karbonylreduktasy 1 a aldoketoreduktasy 1C. U člověka 5 způsobily HUM a CAO značnou inhibici exprese mRNA AKR1C. Další statisticky významnou změnou bylo snížení exprese CBR1 u člověka 5 vyvolané HUM.
- Pomocí denaturující elektroforézy s následným Western blotem jsem sledovala vliv tří vybraných seskviterpenů na proteinovou expresi dvou isoform cytochromu P450 (CYP3A4 a CYP2C), karbonylreduktasy 1 a aldoketoreduktasy 1C3. Největší indukční účinek studovaných seskviterpenů na proteinovou expresi AKR1C3 jsem zaznamenala u člověka 1, kde HUM, KAR a CAO zvýšily expresi proteinu 4,8 – 5,2krát ve srovnání s kontrolou. U člověka 4 HUM signifikantně zvýšil množství proteinu AKR1C3, zatímco CAO způsobil významné snížení tohoto enzymu. Ve třech vzorcích jsem zaznamenala významný inhibiční účinek HUM a v jednom případě také KAR na expresi enzymu CBR1. Na expresi proteinu CYP2C měly statisticky významný vliv jen HUM a KAR ve vzorcích z člověka 1, kde došlo ke snížení proteinové exprese o 40,9 – 52,3 % ve srovnání s kontrolou. Dále byl inhibiční účinek KAR pozorován u enzymu CYP3A4 a člověka 4. Mezi jednotlivými jaterními vzorky jsem pozorovala velkou interindividuální variabilitu v proteinové expresi.

POUŽITÉ ZKRATKY

AA	akrylamid
AKR	aldo-keto reduktasa
APS	peroxodisíran amonný
BCA	bicinchoninová kyselina
bisAA	N,N' – methylen - bisakrylamidu
BSA	bovinní sérový albumin
CAO	β -karyofylen oxid
CBR	karbonylreduktasa
cDNA	jednořetězová deoxyribonukleová kyselina
DEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylen-glykol-bis(β -aminoethylether)-tetraoctová kyselina
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HUM	humulen
KAR	β -karyofylen
microRNA	micro ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerasová řetězová reakce
PMSF	fenylmethansulfonyl fluorid
qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptasa
SDS	dodecylsírán sodný
TBST	pufrovaný solný roztok „Tris - buffered saline“ + Tween 20

TEMED	N, N, N', N' – tetramethylethyldiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TWEEN	polyoxyethylen-sorbitanmonolaurate

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Popis souboru dárců	28
Tabulka 2 - Příprava Krebsova – Henseleitova pufru.....	29
Tabulka 3 - Příprava media William's E + glutaMAX	30
Tabulka 4 - 4 × SDS vzorkový pufr.....	33
Tabulka 5 - Lyzační pufr	34
Tabulka 6 - Kalibrační přímka.....	35
Tabulka 7 - Příprava separačního gelu	37
Tabulka 8 - Příprava zaostřovacího gelu	38
Tabulka 9 – Složení mastermixů RT + a noRT	48
Tabulka 10 - SYBR qPCR Master Mix	49
Tabulka 11 - Sekvence použitých primerů	50
Tabulka 12 - Změny v průměrné hodnotě Ct hodnot referenčních genů.....	54

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Isopren (2-methylbuta-1,3-dien).....	10
Obrázek 2 - Syntéza isoprenoidů v rostlinné buňce (převzato z Cheng 2007).....	11
Obrázek 3 - Biosyntéza humulenu a β -karyofylenu (převzato z Dewick 2002).....	12
Obrázek 4 – α -humulen	13
Obrázek 5 – β -karyofylen	14
Obrázek 6 - β -karyofylenoxid.....	16
Obrázek 7 - Katalytický cyklus CYP (převzato z Manikandan a Nagini 2018).....	19
Obrázek 8 – a) vykrojení válečků b)-d) přenos do kráječe.....	23
Obrázek 9 - Mechanický kráječ tkáňových válečků (převzato z Krumdieck 2013).....	23
Obrázek 10 - Tkáňový mikrotom (převzato z Krumdieck 2013)	24
Obrázek 11 - Kráječ na ultratenké řezy	31
Obrázek 12 - Stojánky s gely.....	37
Obrázek 13 - Nanesení a putování vzorků v gelu	39
Obrázek 14 - Temná komora pro vyvolání filmů	42
Obrázek 15 - Vyhovující amplifikační křivka.	52
Obrázek 16 - Vyhovující křivka tání.	52
Obrázek 17 - Výběr nejvhodnějšího referenčního genu pomocí programu RefFinder. .	53
Obrázek 18 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi AKR1C	55
Obrázek 19 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi CBR1.	56
Obrázek 20 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi CYP2C.....	57
Obrázek 21 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi CYP3A4.....	58
Obrázek 22 - Vliv seskviterpenů na genovou expresi CYP2B6.....	59
Obrázek 23 - Ukázka blotů pro AKR1C3 a kalnexin.	61
Obrázek 24 - Vliv seskviterpenů na proteinovou expresi AKR1C3.....	62
Obrázek 25 - Souhrnný graf vlivu seskviterpenů na proteinovou expresi AKR1C3.....	63
Obrázek 26 - Vliv seskviterpenů na proteinovou expresi CBR1.....	64
Obrázek 27 - Souhrnný graf vlivu seskviterpenů na proteinovou expresi CBR1	64
Obrázek 28 - Vliv seskviterpenů na proteinovou expresi CYP2C.	65
Obrázek 29 - Souhrnný graf vlivu seskviterpenů na proteinovou expresi CYP2C	66
Obrázek 30 - Vliv seskviterpenů na proteinovou expresi CYP3A4.....	67
Obrázek 31 - Souhrnný graf vlivu seskviterpenů na proteinovou expresi CYP3A4	67
Obrázek 32 - Interindividuální variabilita relativní proteinové exprese.....	68

POUŽITÁ LITERATURA

AMBROŽ, Martin, Iva **BOUŠOVÁ**, Adam **SKARKA**, Veronika **HANUŠOVÁ**, Věra **KRÁLOVÁ**, Petra **MATOUŠKOVÁ**, Barbora **SZOTÁKOVÁ** a Lenka **SKÁLOVÁ**. The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. *Molecules*. 2015, 20(12), 15343-15358. DOI: 10.3390/molecules200815343. ISSN 1420-3049.

BAMBA, Yoshinori, Young Sook **YUN**, Akira **KUNUGI** a Hideshi **INOUE**. Compounds isolated from *Curcuma aromatica* Salisb. inhibit human P450 enzymes. *Journal of Natural Medicines*. 2011, 65(3-4), 583-587. DOI: 10.1007/s11418-011-0507-0. ISSN 1340-3443.

BUSTIN, S. A.; **REAL-TIME**, P. C. R. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. *University of London, London, UK*, 2005, 1117-1125.

CORREIA, Maria Almira; **DE MONTELLANO**, Paul R. Ortiz. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450*. Springer, Boston, MA, 2005. p. 247-322.

ČERVENKOVÁ, Kateřina, et al. Cell suspensions, cell cultures, and tissue slices- important metabolic in vitro systems. *BIOMEDICAL PAPERS-PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC*, 2001, 145.2: 57-60.

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

DEWICK, Paul M. *Medicinal Natural Products*. Second Edition. Chichester, UK: John Wiley, 2002. ISBN 9780470741689.

EL HADRI, Adil, et al. Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *An R Acad Nac Farm*, 2010, 76.3: 343-356.

FERNANDES, Elizabeth S., Giselle F. **PASSOS**, Rodrigo **MEDEIROS**, Fernanda M. **DA CUNHA**, Juliano **FERREIRA**, Maria M. **CAMPOS**, Luiz F. **PIANOWSKI** a João B. **CALIXTO**. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of*

Pharmacology. 2007, 569(3), 228-236. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.04.059. ISSN 00142999.

FIDYT, Klaudyna, Anna FIEDOROWICZ, Leon STRZAŁA a Antoni SZUMNY. B -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine*. 2016, 5(10), 3007-3017. DOI: 10.1002/cam4.816. ISSN 20457634.

FISHER, Robyn L. a Alison E. M. VICKERS. Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica*. 2012, 43(1), 8-14. DOI: 10.3109/00498254.2012.728013. ISSN 0049-8254.

GHELARDINI, C., et al. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco*, 2001, 56.5-7: 387-389.

GOLDSTEIN, Joyce A. a Sonia M. F. DE MORAIS. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*. 1994, 4(6), 285-300. DOI: 10.1097/00008571-199412000-00001. ISSN 0960-314X.

GOODWIN, Bryan, et al. Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Molecular pharmacology*, 2001, 60.3: 427-431.

HANDSCHIN, Christoph; MEYER, Urs A. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacological reviews*, 2003, 55.4: 649-673

CHAVAN, M.J., P.S. WAKTE a D.B. SHINDE. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*. 2010, 17(2), 149-151. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.05.016. ISSN 09447113.

JIN, Shi a Robert T. KENNEDY. New developments in Western blot technology. *Chinese Chemical Letters*. 2015, 26(4), 416-418. DOI: 10.1016/j.ccllet.2015.01.021. ISSN 10018417.

KRUMDIECK, Carlos L. Development of a live tissue microtome: reflections of an amateur machinist. *Xenobiotica*. 2013, 43(1), 2-7. DOI: 10.3109/00498254.2012.724727. ISSN 0049-8254.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 1970, 227.5259: 680.

LAL, Suman, Edwin SANDANARAJ, Zee Wan WONG, Peter C.S. ANG, Nan Soon WONG, Edmund J.D. LEE a Balram CHOWBAY. CBR1 and CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Science*. 2008. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00903.x. ISSN 13479032.

LANG, Thomas, Kathrin **KLEIN**, Joachim **FISCHER**, et al. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*. 2001, 11(5), 399-415. DOI: 10.1097/00008571-200107000-00004. ISSN 0960314X.

LANGENHEIM, Jean H. Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*. 1994, 20(6), 1223-1280. DOI:10.1007/BF02059809. ISSN 0098-0331.

LEGAULT, Jean a André **PICHETTE**. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007, 59(12), 1643-1647. DOI: 10.1211/jpp.59.12.0005. ISSN 00223573.

LI, Tiangang; **CHIANG**, John YL. Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnane X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4 α and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug metabolism and disposition*, 2006, 34.5: 756-764.

LNĚNIČKOVÁ, Kateřina, Hana **SVOBODOVÁ**, Lenka **SKÁLOVÁ**, Martin **AMBROŽ**, Filip **NOVÁK** a Petra **MATOUŠKOVÁ**. The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on xenobiotic-metabolizing enzymes in mice in vivo. *Xenobiotica*. 2017, 1-9. DOI: 10.1080/00498254.2017.1398359. ISSN 0049-8254.

ŠPIČÁKOVÁ, Alena, Barbora **SZOTÁKOVÁ**, Diana **DIMUNOVÁ**, et al. Nerolidol and Farnesol Inhibit Some Cytochrome P450 Activities but Did Not Affect Other Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rat and Human Hepatic Subcellular Fractions. *Molecules*. 2017, 22(4), 509. DOI: 10.3390/molecules22040509. ISSN 1420-3049.

MANIKANDAN, Palrasu a Siddavaram **NAGINI**. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*. 2018, 19(1). DOI: 10.2174/1389450118666170125144557. ISSN 13894501.

MCMURRY, John. *Organická chemie*. Přeložil Jan **BUDKA**, přeložil Radek **CIBULKA**, přeložil Dalimil **DVOŘÁK**, přeložil Jaroslav **KVÍČALA**, přeložil Pavel **LHOTÁK**, přeložil Jiří **SVOBODA**. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-4769-1.

MEUNIER, V., et al. Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica*, 2000, 30.6: 589-607.

NAKAMURA, Yoshimasa, Chiho **YOSHIDA**, Akira **MURAKAMI**, Hajime **OHIGASHI**, Toshihiko **OSAWA** a Koji **UCHIDA**. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, activates phase II drug metabolizing enzymes. *FEBS Letters*. 2004, 572(1-3), 245-250. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.07.042. ISSN 00145793.

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

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

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

OLDFIELD, Eric a Fu-Yang **LIN**. Terpene Biosynthesis: Modularity Rules. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012, 51(5), 1124-1137. DOI: 10.1002/anie.201103110. ISSN 14337851.

OLINGA, Peter, et al. Effect of human liver source on the functionality of isolated hepatocytes and liver slices. *Drug metabolism and disposition*, 1998, 26.1: 5-11.

PARRISH, Alan R., A.Jay **GANDOLFI** a Klaus **BRENDEL**. Precision-cut tissue slices: Applications in pharmacology and toxicology. *Life Sciences*. 1995, 57(21), 1887-1901. DOI: 10.1016/0024-3205(95)02176-J. ISSN 00243205.

PIMKAEW, Prapapan, et al. Interactions of sesquiterpenes zederone and germacrone with the human cytochrome P450 system. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27.6: 2005-2012.

SELL, Charles S. *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*. 2003. Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 978-0-85404-681-2.

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

SKÁLOVÁ, Lenka. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, uprav. a rozšíř. vyd. Praha: Karolinum, 2017. Učební texty Univerzity Karlovy. ISBN 978-80-246-3733-4.

SMITH, P.K., R.I. KROHN, G.T. HERMANSON, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985, 150(1), 76-85. DOI:10.1016/0003-2697(85)90442-7. ISSN 00032697.

THUMMEL, K. E. a G. R. WILKINSON. IN VITRO AND IN VIVO DRUG INTERACTIONS INVOLVING HUMAN CYP3A. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1998, 38(1), 389-430. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.389. ISSN 0362-1642.

TOWBIN, Harry; STAEHELIN, Theophil; GORDON, Julian. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76.9: 4350-4354.

VOLAK, L. P., S. GHIRMAI, J. R. CASHMAN a M. H. COURT. Curcuminoids Inhibit Multiple Human Cytochromes P450, UDP-Glucuronosyltransferase, and Sulfotransferase Enzymes, whereas Piperine Is a Relatively Selective CYP3A4 Inhibitor. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, 36(8), 1594-1605. DOI: 10.1124/dmd.108.020552. ISSN 0090-9556.

YANG, Depo, et al. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia*, 2000, 148.2: 79-82.

ZHANG, W. a L.-Y. LIM. Effects of Spice Constituents on P-Glycoprotein-Mediated Transport and CYP3A4-Mediated Metabolism in Vitro. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, 36(7), 1283-1290. DOI: 10.1124/dmd.107.019737. ISSN 0090-9556.

ZIMMERMANN, Martina, Johanna LAMPE, Sebastian LANGE, et al. Improved reproducibility in preparing precision-cut liver tissue slices. *Cytotechnology*. 2009, 61(3), 145-152. DOI: 10.1007/s10616-009-9246-4. ISSN 0920-9069.

ZIMNIAK, P. a D. J. WAXMAN. Liver Cytochrome P450 Metabolism of Endogenous Steroid Hormones, Bile Acids, and Fatty Acids. SCHENKMAN, John B. a Helmut GREIM, ed. *Cytochrome P450*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993, 1993, s. 123-144. Handbook of Experimental Pharmacology. DOI: 10.1007/978-3-642-77763-9_8. ISBN 978-3-642-77765-3.

ZDROJE OBRÁZKŮ

Obr. 2: CHENG, Ai-Xia, Yong-Gen LOU, Ying-Bo MAO, Shan LU, Ling-Jian WANG a Xiao-Ya CHEN. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007, 49(2), 179-186. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x. ISSN 1672-9072.

Obr. 6: MANIKANDAN, Palrasu a Siddavaram NAGINI. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*. 2018, 19(1). DOI: 10.2174/1389450118666170125144557. ISSN 13894501.

Obr. 8: DE GRAAF, Inge A M, Peter OLINGA, Marina H DE JAGER, Marjolijn T MEREMA, Ruben DE KANTER, Esther G VAN DE KERKHOF a Geny M M GROOTHUIS. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature Protocols*. 2010, 5(9), 1540-1551. DOI: 10.1038/nprot.2010.111. ISSN 1754-2189.

Obr. 9: KRUMDIECK, Carlos L. Development of a live tissue microtome: reflections of an amateur machinist. *Xenobiotica*. 2013, 43(1), 2-7. DOI: 10.3109/00498254.2012.724727. ISSN 0049-8254.

Obr. 10: KRUMDIECK, Carlos L. Development of a live tissue microtome: reflections of an amateur machinist. *Xenobiotica*. 2013, 43(1), 2-7. DOI: 10.3109/00498254.2012.724727. ISSN 0049-8254.