

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

**Vliv seskviterpenů na detoxikační enzymy
v jaterních řezech**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2018

Hana Horáčková

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové

Hana Horáčková

Poděkování

Mé poděkování patří prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu, cenné rady, čas a podporu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Lněničkové, Ph.D., za trpělivost a velkou pomoc v experimentální části práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Hana Horáčková

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

Název diplomové práce: Vliv seskviterpenů na detoxikační enzymy v jaterních řezech

Seskviterpeny jsou sekundární metabolity produkované rostlinami, bakteriemi a houbami. Zajišťují přežití a konkurenceschopnost rostliny. Jsou složené ze tří izoprenových jednotek. Vykazují protizánětlivý, antimalarický, antibakteriální, antivirový, antioxidační, analgetický, antifungální, či protimutagenní efekt. Již dlouhá léta jsou používány v lidové medicíně a jako koření. Cílem této práce bylo zjistit, jak ovlivňují vybrané seskviterpeny - α -humulen (HUM), β -karyofylen (CAR) a karyofylen-oxid (CAO) aktivitu vybraných biotransformačních enzymů – karbonylreduktasy 1 (CBR1), aldoketoreduktasy (AKR1C9), aldehydreduktasy (AKR1A1), UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), NAD(P)H-chinonoxidoreduktasy 1 (NQO1), glutahion-S-transferasy (GST), sulfotransferasy (SULT) a cytochromu P450 1A1/2, 2B a 3A (CYP1A1/2, CYP2B/3A). Práce byla provedena na modelu ultratenkých tkáňových řezů z jater laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*, kmen Wistar). Tloušťka řezu byla 200-250 μm a průměr 8 mm. Jaterní řezy byly 30 minut preinkubovány a následně inkubovány v přítomnosti seskviterpenů 8 a 24 hodin v 12jamkové destičce v atmosféře pneumoxidu. Vzorky řezu a média byly odebírány po preinkubaci a dále po 8 a 24 hodinách. Koncentrace seskviterpenů byla 10 μM . Bylo zjištěno ovlivnění aktivity AKR1A1, CYP2B/3A a NQO1 oproti kontrole. Aktivita AKR1A1 byla inhibována CAR a HUM po 8 hodinách inkubace. Aktivita CYP2B/3A byla inhibována CAR a HUM po 8 hodinách inkubace a CAO po 24 hodinách inkubace. Aktivita NQO1 byla snížena HUM po 24 hodinách inkubace.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Hana Horáčková

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

Title of diploma thesis: Effect of sesquiterpenes on detoxifying enzymes in liver slices

Sesquiterpenes are secondary metabolites produced by higher plants, bacteria and fungi. They ensure the survival and competitiveness of plants. Sesquiterpenes are composed of three isoprene units. They possess anti-inflammatory, antimalarial, antibacterial, antiviral, antioxidant, analgesic, antifungal and anticancer activity. Sesquiterpenes, the main components of plant essential oils, have been used in folk medicine and as spices for years. The aim of this diploma thesis was to find out the effect of three structurally related sesquiterpenes α -humulene (HUM), β -caryophyllene (CAR), and β -caryophyllene oxide (CAO) on the activities of the main drug-metabolizing enzymes. Precision-cut tissue slices from the rat liver (*Rattus norvegicus*) were chosen as model system. Thickness of the slices was 200-250 μm and diameter 8 mm. Liver slices were pre-incubated for 30 minutes and then incubated for 8 and 24 hours. Samples of liver slices and incubation medium were taken upon replacing the medium after pre-incubation (time 0 hours) and then after 8 and 24 hours. Concentration of sesquiterpenes was 10 μM . It was found out that activity of aldo-keto reductase AKR1A1, cytochrome P450 (CYP2B/3A) and NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) was influenced in comparison to control. Activity of AKR1A1 and CYP2B/3A affected by CAR and HUM showed decrease after 8 hours of incubation. Activity of CYP2B/3A affected by CAO showed decrease after 24 hours incubation. Activity of NQO1 affected by HUM showed decrease after 24 hours of incubation.

Obsah

Úvod.....	9
1 Teoretická část	10
1.1 Seskviterpeny	10
1.1.1 Seskviterpeny a antioxidační systém	12
1.1.2 Alfa-humulen	14
1.1.3 Beta-karyofylen a karyofylenoxid	16
1.2 Biotransformace	17
1.2.1 První fáze biotransformace	18
1.2.2 Druhá fáze biotransformace.....	25
1.2.3 Mezidruhové rozdíly	29
1.3 Tkáňové řezy	31
1.3.1 Tloušťka řezu	32
1.3.2 Tvar a příprava řezu	32
1.3.3 Fyziologické médium	33
1.3.4 Preinkubace.....	33
1.3.5 Inkubace.....	34
1.3.6 Homogenizace	35
1.3.7 Životaschopnost řezů	35
2 Cíl práce	37
3 Experimentální část.....	38
3.1 Materiály	38
3.1.1 Biologický materiál.....	38
3.1.2 Chemikálie	38
3.1.3 Připravované roztoky	39
3.1.4 Přístroje.....	39

3.2	Pracovní postupy.....	41
3.2.1	Příprava Krebsova-Henseleitova pufru.....	41
3.2.2	Příprava inkubačního média	42
3.2.3	Příprava ultratenkých tkáňových řezů	43
3.2.4	Preinkubace a inkubace řezů.....	44
3.2.5	Odběr vzorku a homogenizace	45
3.2.6	Stanovení koncentrace proteinu.....	45
3.2.7	Stanovení aktivity cytochromu P450	46
3.2.8	Stanovení aktivity NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1	48
3.2.9	Stanovení aktivity aldoketoreduktasy	49
3.2.10	Stanovení aktivity aldehydoreduktasy	50
3.2.11	Stanovení aktivity karbonylreduktasy 1	51
3.2.12	Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy	52
3.2.13	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy.....	54
3.2.14	Stanovení aktivity sulfotransferasy.....	55
4	Výsledky	57
4.1	Stanovení koncentrace bílkovin	57
4.2	Vliv α -humulenu, β -karyofylenu a karyofylen-oxidu na biotransformační enzymy	59
4.2.1	Ovlivnění cytochromu P450 2B/3A	59
4.2.2	Ovlivnění NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1	60
4.2.3	Ovlivnění aldoketoreduktasy	61
4.2.4	Ovlivnění aldehydoreduktasy	62
4.2.5	Ovlivnění karbonylreduktasy.....	63
4.2.6	Ovlivnění UDP-glukuronosyltransferasy	64
4.2.7	Ovlivnění glutathion-S-transferasy.....	64
4.2.8	Ovlivnění sulfotransferasy	65

5	Diskuze.....	67
6	Závěr	70

Úvod

V posledních letech se neustále zvyšuje oblíbenost a spotřeba doplňků stravy. Často jsou kombinovány s léčivými přípravky. Mohou být správnou volbou jak zefektivnit léčbu, snížit riziko vedlejších účinků a urychlit celkovou dobu léčení. Doplňky stravy ale nepodléhají registraci a nemusí u nich být prováděny klinické zkoušky před uvedením na trh. Není tedy zaručeno, že budou obsahovat stanovené množství aktivní látky. Na rozdíl od interakcí léčivých přípravků, nejsou interakce mezi doplňky stravy a léčivy prozkoumány. Mnohé obsažené látky v doplňcích stravy mohou být potencionálními induktory, či inhibitory metabolismu léčiv a tím mohou zvyšovat pravděpodobnost výskytu nežádoucích účinků, či snižovat účinnost léčivého přípravku. Cílem této práce je zjistit možný vliv vybraných seskviterpenů - α -humulenu, β -karyofylenu a karyofylen-oxidu na biotransformační enzymy v jaterních řezech potkana laboratorního. Tyto tři seskviterpeny jsou běžně obsaženy v doplňcích stravy. Z I. fáze biotransformace byly sledovány aktivity cytochromu P450 1A1/2 (CYP1A1/2), cytochromu P450 3A (CYP3A), aldoketoreduktasy (AKR1A1), aldehydreduktasy (AKR1C9), karbonylreduktasy 1 (CBR1) a NADPH: chinonoxidoreduktasy 1 (NQO1). Z II. fáze biotransformace byly sledovány aktivity sulfotransferasy (SULT), UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a glutathion-S-transferasy (GST).

1 Teoretická část

1.1 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou sekundární metabolity rostlin. Radíme je společně se steroidy pod skupinu isoprenoidů. Nejčastěji se nachází v rodech Cactaceae (kaktusovité), Solanaceae (lilkovité), Lamiaceae (hluchavkovité), Araceae (áronovité), Euphorbiaceae (pryšcovité) a především Asteraceae (hvězdicovité). Nejsou nezbytné pro život jako primární metabolity. Zajišťují přežití a konkurenceschopnost rostliny. Největší význam mají při ochraně před býložravými živočichy a patogeny. Dále fungují jako atraktanty pro opylovače a jsou zodpovědné za typickou vůni mnoha květin, čímž působí na hmyz buď jako již zmíněné atraktanty, nebo jako repelenty (Janíček 2017, Chadwick a kol. 2013, MojeChemie).

Jsou obsaženy ve vyšších rostlinách, ale také v houbách a bakteriích. V rostlině mohou být rozprostřeny rovnoměrně po těle rostliny, nebo být nahromaděny v kořenech, hlízách, kůře, stonku, plodech a v jejích dalších částech. Nejvíce je však nalezneme v reprodukčních orgánech (květy, plody) a v listech v období květu. Produkovány jsou nejčastěji mléčnicemi, nebo, v případě tvorby způsobené biologickým stresem, vakuolami. Seskviterpeny tvoří pryskyřice, balzámy a nejčastěji silice, které jsou také známé jako éterické oleje. Pryskyřice vznikají ze silic, které na vzduchu oxidují. Směsi silic a pryskyřic jsou pak balzámy (Chadwick a kol. 2013, MojeChemie).

Terpeny tvoří rozmanitou skupinu látek, je známo přes desítky tisíc struktur. Jejich vzorec je $(C_5H_8)_n$, kde n je počet spojených izoprenových jednotek. Dle struktury se dělí na cyklické a acyklické. Podle počtu izoprenových jednotek je rozdělujeme na monoterpeny (2 isoprenové jednotky), seskviterpeny (3 isoprenové jednotky), diterpeny (4 isoprenové jednotky), triterpeny (6 isoprenových jednotek), tetraterpeny (8 isoprenových jednotek) a polyterpeny. Seskviterpeny jsou patnáctiuhlíkaté, bezbarvé, lipofilní sloučeniny, složené ze tří izoprenových jednotek. Vždy je nalezneme ve formě isopentenylového zbytku, protože čistý isopren se v přírodě nevyskytuje (Janíček 2017).

Syntéza je lokalizována v endoplazmatickém retikulu. Jejich prekurzorem je farnesyldifosfát. Syntéza probíhá buď mevalonátovou cestou, nebo deoxyxylulosovou cestou. Výběr cesty závisí na organismu, v kterém syntéza probíhá, a na výsledné struktuře. Mevalonátová cesta je typická pro seskviterpeny a triterpeny. Druhá, deoxyxylulosová cesta, je typická pro monoterpeny, diterpeny a tetraterpeny. V prvním kroku vzniká acetyl-CoA z acetátu a následně Claisenovou kondenzací vzniká acetoacetyl-CoA pomocí acetoacetyl-CoA-acetyltransferasy. V druhém kroku se přidá do reakce další acetyl-CoA a vzniká (3S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) pomocí HMG-CoA-synthasy. Následným nejvýznamnějším krokem je redukce HMG-CoA-reduktasou, kdy se odštěpuje koenzym A a vzniká mevalonát. Ten se fosforyluje a dekarboxyluje na isopentenylidifosfát, což je hlavní prekurzor syntézy seskviterpenů. Aby mohl isopentenylidifosfát konvertovat na terpeny, musí isomerovat na dimethylallyldifosfát. Isopentenylidifosfát a dimethylallyldifosfát jsou tedy dvě hlavní výchozí látky. Rovnováhu mezi nimi udržuje příslušná isomerasa. Jejich kondenzací dle typu „hlava k patě“ spolu reagují na geranylidifosfát. Po následné reakci s dalším isopentenylidifosfátem vzniká farnesyldifosfát, z kterého již vznikají seskviterpeny (McMurry 2004, Ledvina a kol. 2009).

V některých druzích rostlin vzniká velké množství různorodých sloučenin, zatímco v jiných druzích je syntéza přísně regulována, aby vedla k stále stejným produktům. Tak tomu je především u tvorby v reakci na biologický stres (Nguyenová a kol. 2017).

V posledních letech bylo zjištěno, že seskviterpeny by mohly hrát významnou roli v léčbě kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny. Dále jim je připisován protizánětlivý, antimalarický, antibakteriální, antivirový, antioxidační, analgetický, antifungální, protimutagenní, antidiabetický či antiprotozoální efekt. V lidové medicíně jsou již dlouhá léta používány na chřipku, průjem, spáleniny a na zpomalení neurodegenerace. Navzdory jejich pozitivnímu vlivu na zdraví není jasné, jak ovlivňují metabolismus. Jsou součástí běžných produktů jako je koření, kosmetika či potravní doplňky. Protože jsou jako přírodní látky považovány za nezávadné a bez vedlejších účinků, je důležité zjistit jejich možné interakce a vliv na ostatní metabolizované látky, například léčiva (Nguyenová a kol. 2017).

1.1.1 Seskviterpeny a antioxidační systém

V lidském těle vznikají během buněčného metabolismu reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku. Nejedná se ale o patologickou tvorbu. Při nízkých a středních koncentracích mají fyziologickou funkci. Při vyšších koncentracích fungují opačně, dochází k nerovnováze mezi tvorbou reaktivního kyslíku a jeho odbouráváním a vzniká oxidační stres. Ten vede k poškození DNA, dále k peroxidaci lipidů a denaturaci proteinů. Struktura DNA, lipidů a proteinů je porušena a to vše může vyústit v závažná onemocnění jako je rakovina, ateroskleróza, hypertenze, ischemická choroba, dechové potíže a mnohé další nemoci (Birben a kol. 2012, Lee a kol. 2013).

K regulaci ROS slouží antioxidační systém, který se skládá z enzymatických a neenzymatických antioxidantů. Jak už bylo výše uvedeno, ROS vzniká během buněčného metabolismu z kyslíku. Pokud vzniklá sloučenina obsahuje volný elektron, jde o volný radikál. V druhém případě jde o neradikálový ROS. Právě volný elektron způsobuje reaktivitu ROS. Volné radikály interagují s dalšími molekulami a tvoří z nich také radikály. Další třetí velkou skupinou ROS je superoxidový aniont, hydroxylový radikál a peroxidový radikál (Birben a kol 2012).

Ukončení radikálové reakce nastane, pokud spolu reagují dva radikály, protože vznikne neradikálová částice. Hlavní eliminační cestu zajišťuje antioxidační systém. Antioxidanty působí jako takzvané scavengery, které přímo vychytávají volné radikály, reagují s nimi a tím přerušují řetězení volných radikálů. Antioxidanty dělíme na neenzymatické a enzymatické. Mezi první zmíněné řadíme vitamín C, vitamín E, glutathion, beta-karoten a koenzym Q. Ty ve své molekule obsahují funkční skupinu, která je schopná s volnými radikály reagovat. Například thiolová skupina u glutathionu. Dále sem také patří vysokomolekulární antioxidanty, které váží těžké kovy a ty pak nemohou katalyzovat radikálové reakce. Je to například transferin, laktoferin, feritin, albumin, či ceruloplasmin (Birben a kol. 2012, Lee a kol. 2013).

Další úrovní ochrany před oxidativním poškozením jsou enzymové antioxidační systémy, které zahrnují např. superoxidodismutasu, katalasu nebo glutathionperoxidasu. Tyto enzymy katalyzují reakce, při nichž zanikají volné radikály. Tento antioxidační systém je indukovatelný v reakci na oxidativní stres, ale i řadou přírodních látek (Birben a kol. 2012, Zajdlová 2016).

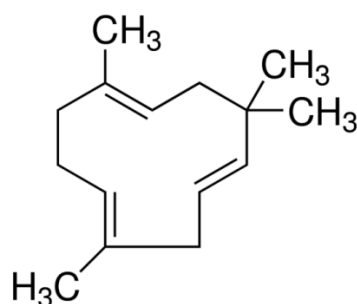
Seskviterpeny mají také funkci antioxidantů. Působí duálním účinkem a to jak oxidačním tak antioxidačním. Mohou tedy působit jako antioxidanty, nebo mohou naopak způsobovat oxidativní stres. Za některých podmínek mohou mít obojí roli. Je tedy složité předvídat jejich jednoznačný dopad (Bartíková a kol. 2014).

Jsou tři hlavní mechanismy antioxidačního působení. Za prvé přímo vychytávají ROS, dále chelatují kovové ionty a nakonec zvyšují činnost antioxidačních systémů. Díky druhému zmíněnému mechanismu zabraňují vzniku dalších možných volných radikálů. Takto působí například ferritin, transferin a ceruloplasmin. Vychytávání ROS je dáno jejich schopností poskytovat elektron. Antioxidační účinek ovšem nebyl potvrzen u všech seskviterpenů, například u α -humulenu byl prokázán pouze slabý účinek (Lee a kol. 2013).

Pro antioxidační aktivitu seskviterpenů je nutná přítomnost některých funkčních skupin. Hydroxylové, α,β -nenasycené karbonylové skupiny a laktonové skupiny. Hydroxylová skupina a α,β -nenasycená karbonylová skupina zodpovídají za vychytávání volných radikálů. Chelatační schopnost naopak souvisí s přítomností laktonové skupiny.

Jednou z možných příčin kancerogeneze je právě oxidační stres. Nádorové buňky navíc produkují více ROS než zdravé buňky. Mají ovšem deficit antioxidačních enzymů oproti zdravým buňkám a při překročení určité hladiny ROS dochází k apoptóze (Bartíková a kol. 2014, Lee a kol. 2013). Díky tomu seskviterpenová prooxidační aktivita skrývá potenciál v léčbě nádorových onemocnění, navíc může působit přímo a pouze v nádorových buňkách (Zajdová 2016, Chadwick a kol. 2013).

1.1.2 Alfa-humulén



Obrázek 1- Struktura α -humulenu

Synonymem pro α -humulén (HUM) je α -karyofylen, chemickým názvem 2,6,6,9-tetramethylcykloundeka-1,4,8-trien. Je to monocyklický seskviterpen sumárního vzorce $C_{15}H_{24}$. Je široce rozšířen, nejvíce je obsahově zastoupen ve chmelu otáčivém (*Humulus lupulus*, Cannabaceae). Chmel otáčivý je vytrvalá rostlina rozšířená po celé Evropě. Jeho sekundární metabolity jsou často děleny na chmelové pryskyřice, chmelové silice a chmelové polyfenoly. Seskviterpeny nalezneme v silicích. Právě ty jsou odpovědné za typické aroma piva (Steenackers a kol. 2015, Nguyenová a kol. 2017, www.chemicalbook.com).

Často se nachází v rostlinách společně se svým izomerem β -karyofylenem. Je používán v lidové medicíně a dále je obsažen v kořeni. Mimo chmel ho nalezneme například v zázvorníku lékařském (*Zingiber officinale*, Zingiberaceae), v konopí setém (*Cannabis sativa*, Cannabaceae), v tabáku virginském (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae) v bazalce pravé (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae), v dobromysli obecné (*Origanum vulgare*, Lamiaceae), v rozmarýnu lékařském (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae), v borovici lesní (*Pinus sylvestris*, Pinaceae) či v pepřovníku černém (*Piper nigrum*, Piperaceae), kde je druhou nejvíc zastoupenou složkou hned po nerolidolu (Nguyenová a kol. 2017).

Jsou mu připisovány protizánětlivé, analgetické, antirevmatické, antiproliferativní účinky a urychluje hojení (Fernandes a kol. 2007).

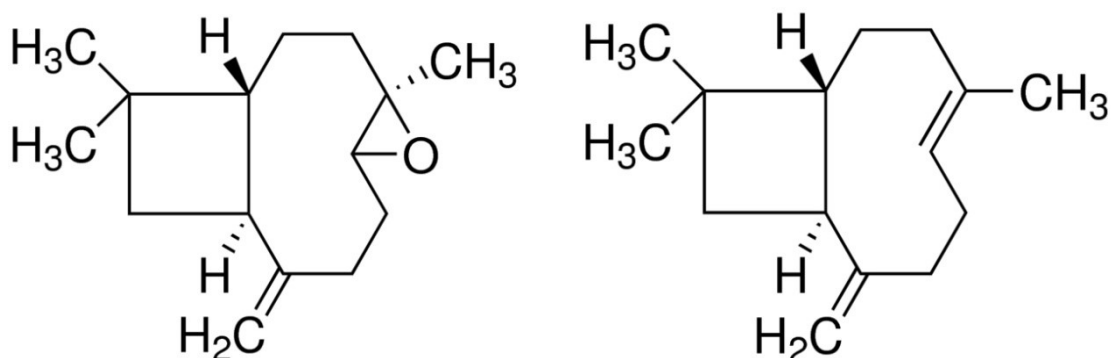
Jeho značné množství bylo také nalezeno v asijském stromu voskovníku červeném (*Myrica Rubra*). Ten je používán v tradiční čínské a japonské medicíně. Ve studii

Ambrože a kol. (2015) byl zkoumán vliv seskviterpenů ze silice voskovníku červeného na nádorové buňky a jejich schopnost snižovat toxicitu antracyklinového cytostatika doxorubicinu. Nejčastějším nežádoucím účinkem doxorubicinu je kardiotoxicita. Dále na něj vzniká tolerance. Obsah HUM se v silici *Myrica rubra* pohybuje okolo 22 %. U něj a dalších seskviterpenů byl zjištěn antiproliferativní vliv na intestinální a kolorektální nádorové buňky. Nejvíce sensitivní se jevíly CaCo2 buňky. Ty tvoří řadu buněk u kolorektálního adenokarcinomu. HUM dále v kombinaci s doxorubicinem zvýšil jeho pro-oxidativní efekt a tím zlepšil jeho účinnost, protože nádorové buňky jsou velmi citlivé na látky, které zvyšují ROS. V neposlední řadě HUM zvýšil akumulaci doxorubicinu v nádorových buňkách a také u paclitaxelu v MCF-7 (karcinom prsu), DLD-1 (kolorektální karcinom) a L-929 (myší fibroblastové buňky). Bohužel samotný HUM tento účinek nevykazuje. Jedná se o synergický efekt způsobený veškerými obsaženými seskviterpeny ve voskovníku červeném (*Myrica Rubra*). Tato studie potvrdila antiproliferativní účinky HUM a navíc zjistila možnost použít ho ke zkvalitnění léčby doxorubicinem (Ambrož a kol. 2015).

Mechanismem jeho protirakovinného působení je pravděpodobně indukce apoptózy nádorových buněk. Dále způsobuje depleci glutathionu, což vede ke zvýšení množství ROS. Toto prooxidativní působení by mohlo být důvodem jeho protinádorové působení (Nguyenová a kol. 2017).

Při studiu seskviterpenů z brazilského keře *Cordia verbenaceae* (Fernandes a kol. 2007) byly u HUM zjištěny protizánětlivé účinky. HUM inhiboval enzym cyklooxygenasu, která konvertuje kyselinu arachidonovou na prostaglandiny a tromboxany. Dále významně inhiboval tvorbu prostaglandinu E2 v modelu zánětu u myši (indukovanou vpíchnutím karagenu). HUM dokonce snižoval edém vzniklý po podání histaminu. Dalším zajímavým zjištěním bylo, že HUM snižoval produkci TNF α a IL-1 β po perorálním podání.

1.1.3 Beta-karyofylen a karyofylenoxid



Obrázek 2-Struktura karyofylenoxidu (vlevo) a β-karyofylenu (vpravo)

β-karyofylen (CAR) je bicyklický seskviterpen s chemickým názvem trans-(1R,9S)-8-methylen-4,11,11-trimethylbicyklo[7.2.0]undec-4-en. Spolu s jeho derivátem karyofylenoxidem mají antiproliferativní, protizánětlivé, analgetické, antimikrobiální a chemoprotektivní účinky. Jsou obsaženy v používaném koření, tvoří součást kosmetických přípravků a také se užívají v lidové medicíně. CAR, molekulovým vzorcem C₁₅H₂₄, je bledě žlutá olejovitá kapalina. Karyofylenoxid (CAO) má molekulový vzorec C₁₅H₂₄O a jedná se o krystalický bílý prášek. Vzniká z CAR oxidací na epoxid. Tato oxidace probíhá při skladování chmelu za přístupu vzduchu, či přivedením k varu se sladem a má vliv na aroma piva. Obě látky můžeme najít v chmelu otáčivém (*Humulus lupulus*, Cannabaceae), v citroníku limonovém (*Citrus limon*, Rutaceae), v bazalce pravé (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae), v dobromysli obecné (*Origanum vulgare*, Lamiaceae), v rozmarýnu lékařském (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) a kmínu kořeném (*Carum carvi*, Apiaceae). CAO kromě svého potenciálu zlepšovat protinádorovou léčbu má také antifungální a insekticidní účinek. Dokáže redukovat expresi prokancerogenních genů a proteinů a také zvýšit počet proapoptických látek (Nguyenová a kol. 2017, Oda a kol. 2011, www.ncbi.nlm.nih.gov, www.chemicalbook.com).

Ve studii Ambrože a kol. (2015) zabývající se silicí z voskovníku červeného (CAR 43 % a CAO 3 %) CAR stejně jako HUM zvyšoval účinnost paclitaxelu v některých buněčných liniích, např. MCF-7 (karcinom prsu), DLD-1 (kolorektální karcinom)

a L-929 (myší fibroblastické buňky) a také zvyšoval jeho intracelulární akumulaci, nejspíše zvýšením membránové propustnosti. Dále CAO zvyšoval cytotoxický efekt paclitaxelu a doxorubicinu v buněčné linii odvozené od lidského mnohočetného myelomu a od nádoru prostaty. U CAR nebyla objevena významná aktivita, ale CAO v závislosti na koncentraci inhiboval proliferaci nádorových buněk, kdy nejcitlivěji se jevily CaCo-2 buňky. CAO působil pro-oxidačně jak sám tak v kombinaci s cytostatikem doxorubicinem. Zlepšoval jeho účinnost, akumulaci v kolorektálních nádorových buňkách a snižoval jeho toxicitu.

U CAR byly prokázány také protizánětlivé účinky (Fernandes a kol. 2007). Stejně jako HUM snižoval tvorbu prostaglandinu E2 a inhiboval cyklooxygenasu-2. CAR zmenšoval edém indukovaný vpichem karagenu, ale neovlivnil edém vzniklý po vpichu histaminu. CAR inhiboval tvorbu TNF α , ale na rozdíl od HUM neinhiboval tvorbu IL- β .

1.2 Biotransformace

Denně se naše tělo setkává s množstvím cizorodých látek, xenobiotik, které se absorbují a distribuují po těle. Tyto látky jsou často lipofilní, což umožňuje jejich dobrou absorpci. Lipofilita je ale překážkou pro eliminaci látek. Proto dochází v těle k metabolismu látek, během kterého se látky stávají hydrofilnějšími. Metabolismus cizorodých látek se skládá z několika fází. V I. fázi dochází ke konverzi látek na hydrofilnější metabolity, dále ve II. fázi metabolity konjugují s endogenními látkami za vzniku konjugátů a ve III. fázi dochází k transportu konjugátů přes membrány. Termín biotransformace zahrnuje I. a II. fázi. Biotransformace je chemická přeměna látky, která většinou vede ke snížení její toxicity a k jejímu lepšímu vyloučení z těla. Má vliv také na biologickou aktivitu látky. Látka se během ní většinou stává inaktivní, ale v některých případech se může stát aktivnější nebo získat zcela jinou aktivitu. Biotransformace probíhá v játrech, plicích, kůži a v mnoha dalších tkáních v těle. V játrech je lokalizována v endoplazmatickém retikulu nebo v cytosolu. Důležitými katalyzátory biotransformace jsou enzymy. Enzymy snižují aktivační energii reakce. Většina je syntetizována konstitutivně. U některých enzymů závisí syntéza na množství xenobiotik v těle. Ta mohou tvorbu enzymu indukovat a tím zvyšovat jeho aktivitu. Aktivita může být také naopak snížena inhibicí xenobiotikem. Existuje plno faktorů

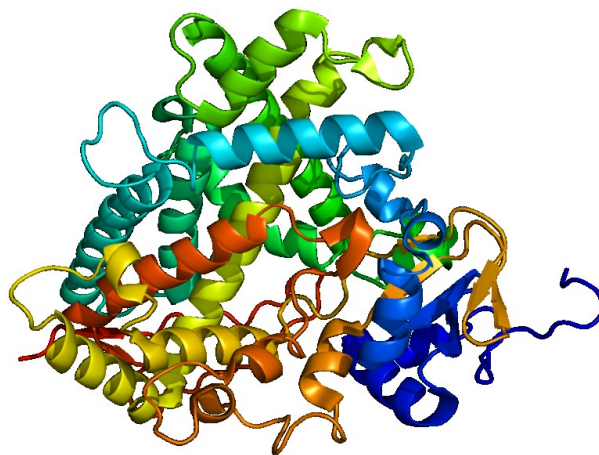
ovlivňujících biotransformaci xenobiotik. Dělíme je na interindividuální a intraindividuální. Mezi interindividuální patří pohlaví, genetické faktory a živočišný druh. Mezi druhé zmíněné pak řadíme věk, hormonální vlivy, patologické stavy, stres, výživu a indukci a inhibici enzymů (Skálová, Boušová a kol. 2011).

Níže jsou popisovány biotransformační enzymy, u kterých byly stanovovány aktivity během praktické části diplomové práce.

1.2.1 První fáze biotransformace

Tato fáze zahrnuje tři druhy reakcí. Oxidaci, hydrolýzu a redukci. Dochází pouze k malému snížení lipofility. Do molekuly látky se zavádí polární funkční skupina (-OH, -NH₂, -COOH). Nejčastěji probíhající reakcí je u člověka oxidace. Hlavním enzymem je cytochrom P450 (Skálová, Boušová a kol. 2011).

1.2.1.1 Cytochromy P450



Obrázek 3-Struktura CYP1A2

Cytochromy P450 (CYP) jsou mikrosomální enzymy, které hrají hlavní roli v detoxikaci xenobiotik, aktivaci prokarcinogenů, ale také v syntéze některých endogenních látek. Eukaryotní CYP jsou vázány jako membránové proteiny. Jsou exprimovány v endoplasmatickém retikulu. Mezi endogenní látky, na jejichž syntéze se CYP podílejí, patří cholesterol, žlučové kyseliny, mastné kyseliny, prostacykliny, tromboxany a steroidní hormony (Williams a kol. 2000).

CYP tvoří nadrodinu hemoproteinů. Jejich název je odvozen ze zjištění, že v redukovaném stavu a pokud tvoří komplex s oxidem uhelnatým, vykazují v UV-viditelném spektru maximum při vlnové délce 450 nm. Nejvyšší hladiny CYP jsou v játrech, v gastrointestinálním traktu, v plicích a v ledvinách. Jejich výskyt je ale rozšířen do všech tkání. Podílí se až ze 2/3 na všech biotransformačních reakcích I. fáze biotransformace (Anzenbacher a Anzenbacherová 2003).

Ve srovnání s ostatními biotransformačními enzymy vykazují CYP nižší substrátovou specifitu. V játrech jsou nejvíce exprimovány formy CYP 3A4, 2C9, 2C8, 2E1 a 1A2. CYP 1A1, 1B1 a 2J2 jsou naopak exprimovány hlavně extrahepatálně. Exprese je ovlivněna hormony, věkem, pohlavím, genetickým polymorfismem, indukci xenobiotiky a regulací cytokiny (Zanger a Schwab 2013).

Nadrodina CYP je rozdělena na rodiny, podrodiny a dle primární struktury na jednotlivé členy. Cytochromy se 40% shodností v sekvenci aminokyselin patří do jedné rodiny. Ta se značí první číslicí. Cytochromy, které se shodují z více jak 55 % v sekvenci aminokyselin, patří do stejné podrodiny. Ta je pak značena písmenem. Jednotlivé isoformy jsou značeny druhou číslicí. Existuje několik tisíc genů, které kódují CYP. Pro lidský organismus jich existuje 57 a je identifikováno 36 lidských isoform CYP, ale odhaduje se, že by mohlo existovat až 50 lidských isoform. Pro srovnání potkani mají isoform 47 (Anzenbacher a Anzenbacherová 2003, Lewis 2000, Skálová, Boušová 2013).

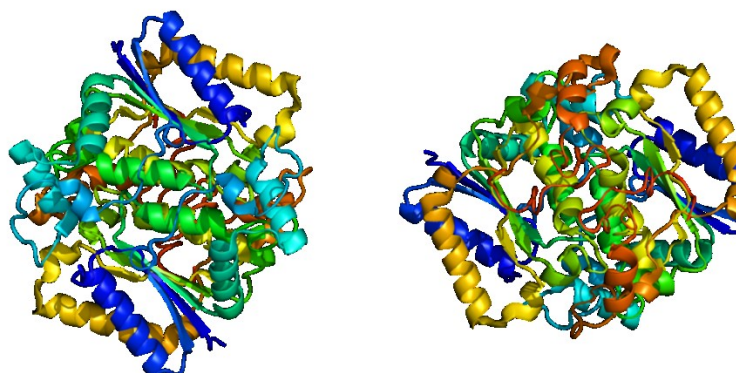
CYP vykazují monooxygenasovou aktivitu, ale účastní se i ne-monooxygenasových reakcí. Například při syntéze tromboxanu a prostacylinu vykazuje CYP oxidoreduktasovou aktivitu. Kofaktorem monooxygenasových reakcí je NADPH (Anzenbacher a Anzenbacherová 2003).

Nejvýznamnějším zástupcem je CYP3A4, který metabolizuje polovinu ze všech známých léčiv. Dalšími významnými enzymy jsou CYP2D6, CYP2C9, CYP1A1 a CYP1A2 (Lewis 2000). CYP1A1 je zastoupen především v extrahepatálních tkáních a CYP1A2 je nejvíce exprimován v játrech. Oba enzymy jsou zodpovědné za aktivaci a detoxikaci polycyklických aromatických uhlovodíků, aromatických aminů a polychlorovaných bifenyly. Indukce těchto enzymů je tedy nežádoucí, protože přispívá k toxickému efektu zmíněných polutantů. Indukce je způsobena vazbou látek na receptory pro aromatické uhlovodíky. Známý je vliv kouření na indukci těchto

enzymů a následný slabý účinek theofylinu. Mezi známé inhibitory pak patří klaritromycin a cirpofloxacin (Nebert a kol. 2004, Androutsopoulos a kol. 2009, Skálová, Boušová 2013).

1.2.1.2 Chinonoxidoreduktasa 1

Cytosolická chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1) chrání tělo před škodlivým vlivem chinonů a dalších elektrofilů. Chinony jsou reaktivní sloučeniny, které nalezneme v přírodě, dále jsou obsaženy v automobilových exhalacích, cigaretovém kouři, ale také jsou součástí mnoha jídel. NQO1 je flavoenzym, který katalyzuje dvouelektronovou redukci chinonů na hydrochinony. Zabraňuje tak jednoelektronové redukci chinonů cytochromem P450 na superoxid, který pak v těle způsobuje oxidační stres. Jako kofaktor reakce využívá NQO1 jak NADH, tak NADPH (Faig a kol 2000, Jaiswal 2000).



Obrázek 4-Struktura NQO1

Kromě hlavní funkce, detoxikace chinonů, aktivuje NQO1 redukci některá chemoterapeutika, například mitomyciny či benzochinony. Jiná jsou redukcí deaktivována, například antracykliny (Faig a kol. 2000).

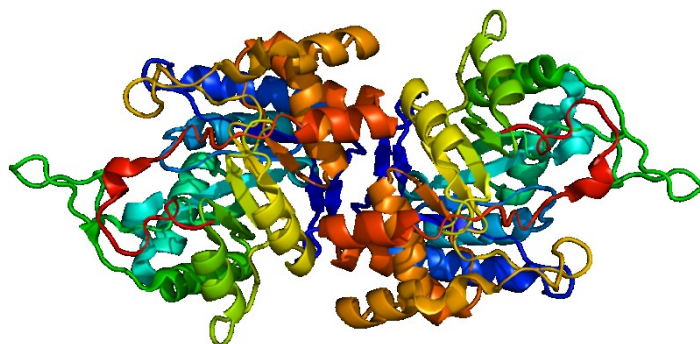
NQO1 je všudypřítomná v lidském organismu, ale její hladiny se v různých tkáních liší. Mnohé nádory, například plic, tlustého střeva, jater či prsu, vykazují nadměrnou expresi tohoto enzymu. Tím se NQO1 stává ideálním cílem pro vývoj cytostatik (Faig a kol. 2000).

Exprese genu pro NQO1 je indukovatelná antioxidanty, oxidanty, těžkými kovy a radiačním a UV zářením. Indukci způsobují především elektrofilní sloučeniny. Mezi inhibitory patří například dikumarol (Jaiswal 2000, Cullen a kol. 2003).

NQO1 také hraje roli antioxidačního enzymu. Vytváří antioxidační formy ubichinonu a α -tokoferolu během oxidačního stresu. Díky těmto protektivním účinkům bylo navrženo, že NQO1 funguje jako chemoprotektivní enzym (Cullen a kol. 2003).

1.2.1.3 Aldoketoreduktasa 1C

Aldoketoreduktasa 1C (AKR1C) patří do nadrodiny aldoketoreduktas. Pro jejich strukturu je charakteristické uspořádání α -helixů a β -skládaných listů do tzv. (α/β)8-soudků. Obecně katalyzují oxidoredukční reakce za přítomnosti pyridinových nukleotidů. Tuto skupinu enzymů nenalezneme pouze u lidí, ale vyskytuje se také u rostlin, kvasinek, prvoků a zvířat. V lidském těle bylo identifikováno 15 rodin aldoketoreduktas. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje mezi 30 a 40 kDA (Barski a kol. 2008).



Obrázek 5-Struktura AKR1C1

AKR1C tvoří podrodinu čtyř lidských hydroxysteroiddehydrogenas (AKR1C1-4). Ty spolu sdílí 86% homologii. Všechny nalezneme v játrech, ale každý enzym má odlišnou extrahepatální distribuci. Mezi substráty patří steroidy a prostaglandiny (Barski a kol. 2008).

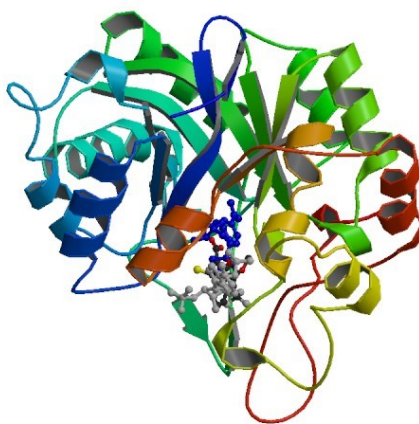
AKR1C je zapojena do metabolismu estrogenů a androgenů. Chová se jako 17-ketosteroidreduktasa a způsobuje zvýšení hladiny estradiolu a pokles hladiny progesteronu. Tím se podílí na vzniku androgen- a estrogen-dependentních onemocnění, například rakoviny prsu a prostaty. Snížení hladiny progesteronu je způsobeno

inaktivací progesteronu na 20α -hydroxyprogesteron. Díky tomuto působení může nedostatek tohoto enzymu způsobit opožděný porod (Rižner 2012, Barski a kol. 2008).

AKR1C je dále známa jako dihydrodioldehydrogenasa. Katalyzuje přeměnu trans-dihydrodiolů, proximálních karcinogenů, v aromatických uhlovodících na příslušné katecholy. Ty jsou nestabilní a podléhají na vzduchu autooxidaci. Na konci oxidačních procesů vzniká plně oxidovaný o-chinon a superoxidový anion radikál. O-chinony mohou v těle působit cytotoxicky a genotoxicky (Barski a kol. 2008, Penning 1993).

Ve studii Davise a kol. (2009) považují AKR1C za možný cíl při léčbě rakoviny prostaty, prsu, plic či močového měchýře. Uplatnily by se jeho selektivní inhibitory, jako adjuvantní léčba v kombinaci s klasickou chemoterapií nebo jako chemoprotekce.

1.2.1.4 Aldehydreduktasa 1A1



Obrázek 6-Struktura AKR1A1

Aldehydreduktasa 1A1 (AKR 1A1) je enzym, známý také pod názvem alkoholdehydrogenasa a aldoketoreduktasa. AKR1A1 patří do nadrodiny aldoketoreduktas, které byly popsány výše.

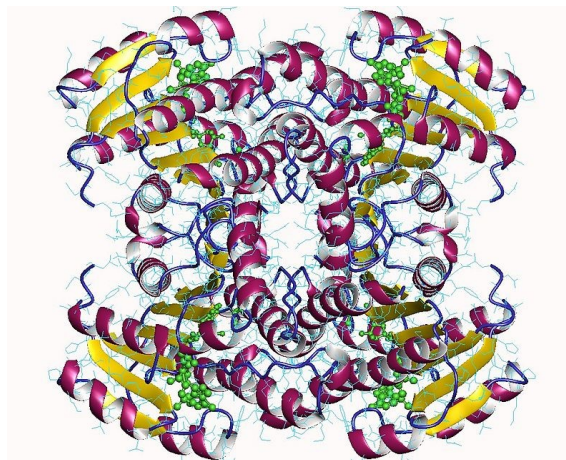
AKR1A1 katalyzuje redukci karbonylových sloučenin na jejich příslušné alkoholy. Kofaktorem potřebným pro její funkci je NADPH, který se během reakce mění na NADP^+ . Je obsažena ve většině lidských tkání. Nejvyšší hladiny nalezneme v ledvinách a v jaterních hepatocytech. Nižší hladiny pak nalezneme v buňkách tenkého střeva, plic,

mozku či v placentě. Celkově se AKR1A1 vyskytuje ve všech eukaryotních buňkách (Barski a kol. 1999).

AKR 1A1 má široké spektrum substrátů. Mezi substráty patří sacharidy, glukuronidy, kortikosteroidní hormony a různé xenobiotické aldehydy a ketony, kde lze zmínit například p-karboxybenzaldehyd, p-nitrobenzaldehyd, pyridin-3-aldehyd, či pyridin-4-aldehyd. Mezi endogenní substráty patří glyceraldehyd či mevalonát. AKR1A1 hraje stejně jako AKR1C roli v oxidaci *trans*-dihydrodiolů na o-chinony (Boohren a kol. 1998, Palackal a kol. 2001).

Dle Boohrena a kol. (1998) AKR1A1 společně s aldózareduktasou přispívají k rozvoji komplikací diabetu. To je způsobeno katalýzou redukce glukózy na sorbitol. V minulosti byly zkoumány léky, které tyto enzymy inhibovaly. Ty však byly neúčinné a měly množství nežádoucích účinků.

1.2.1.5 Karbonylreduktasa



Obrázek 7-Struktura CBR

Karbonylreduktasa (CBR) patří do třídy oxidoreduktas, které jsou součástí nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Tato nadrodina obsahuje přes 3000 členů, kteří patří do různých živočišných druhů. Z toho 60 členů nalezneme u lidí. Proteiny SDR mají strukturně neměnnou N-koncovou část, která váže NAD(H), nebo NADP(H) jako kofaktor. Další je variabilní C-koncová část, která váže substrát (Keller a kol. 2006).

CBR je cytosolický, NADPH-dependentní monomer, který katalyzuje redukci mnoha endogenních a exogenních karbonylových sloučenin na příslušné alkoholy. Nejvýznamnějším a nejdéle známým zástupcem je CBR1. Nejvyšší hladiny enzymu v lidské tkáni byly nalezeny v parenchymatických buňkách jater, epitelálních buňkách žaludku a tenkého střeva, v ledvinách a v mnohých nervových buňkách. Hlavními endogenními substráty jsou steroidy, prostaglandiny a alifatické aldehydy a ketony. Dále CBR1 katalyzuje redukci mnoha xenobiotických chinonů. Ty vznikají v těle z polycyklických aromatických uhlovodíků, které jsou častými průmyslovými polutanty. Z významných substrátů je také nutno zmínit antracyklinová chemoterapeutika, doxorubicin a daunorubicin (Forrest a kol. 2001).

V lidském genomu byly identifikovány tři SDR geny pro kódování karbonylreduktas CBR1 (SDR21C1), CBR3 (SDR21C2) a CBR4 (SDR45C1). CBR2, homotetramer je exprimován u myši, morčat a prasat. Žádný k němu homologní enzym nebyl u člověka nalezen. Zvířecí CBR2 vykazuje nízkou identitu v aminokyselinové sekvenci s CBR1. Zajímavostí je, že lidská dikarbonyl/L-xylulosoreduktasa byla příležitostně nazývána CBR2. To je dáno její vysokou identitou (68 %) s CBR2 a jedná se také o homotetramer. Odlišují se ale v substrátové specifitě a citlivosti k inhibitorům a v tkáňové distribuci (Malátková a kol. 2010).

CBR3 má 71% shodu v aminokyselinové sekvenci s CBR1. Byla objevena nedávno, a proto o ní není zatím dostatek informací. Obecně má na rozdíl od CBR1 užší substrátovou specifitu a liší se od sebe ve tvaru aktivního místa. Skládá se z 277 aminokyselin a stejně jako CBR1 je cytosolickým, monomerním NADPH-dependentním enzymem. Na rozdíl od CBR1 nevykazuje prostaglandin-9-keto reduktasovou ani prostaglandin-15-hydroxydehydrogenasovou aktivitu. 3-Keto-steroid reduktasovou aktivitu vykazuje pouze nízkou. Ačkoliv se soudilo, že má CBR3 vysokou aktivitu k menadionu, zjistilo se, že aktivitu nemá, nebo jen velmi nízkou. CBR3 hraje minimální roli v metabolismu xenobiotik. Jejími substráty jsou chinony s orto-substitucí a sloučeniny podobné isatinu a oracinu (Pilka a kol. 2009, Malátková a kol. 2010).

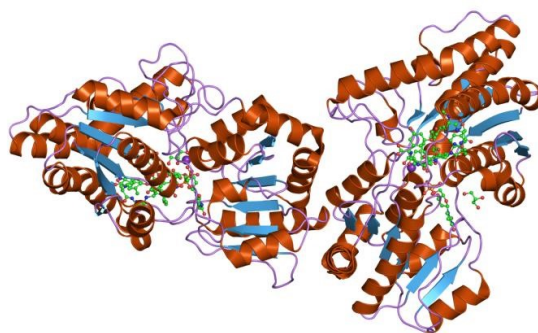
CBR4 má odlišnou substrátovou specifitu od CBR1 a CBR3. Je charakterizována jako chinonreduktasa a identifikována jako strukturální část heterotetramerní-ketoacyl thioester reduktasy. Vykazuje nízkou identitu v sekvenci aminokyselin s ostatními CBR

(<30 %). Jiná je také její lokalizace. Nalezneme ji totiž v mitochondriálním matrixu. Exprimována je v ledvinách a játrech. Hladiny tohoto tetrameru jsou znatelně nižší než hladiny CBR1. Vykazuje NADPH-dependentní reduktasovou aktivitu pro orto- a para-chinony. Nejznámější substráty jsou 9,10-fenantrenchinon a 1,4-benzochinon. Stejně jako CBR3 vykazuje pouze nízkou aktivitu k menadionu. Největším rozdílem je neschopnost redukovat jiné karbonylové sloučeniny než jsou chinony. Velice nedávno byla CBR4 identifikována jako součást lidské mitochondriální syntézy mastných kyselin (Malátková a kol. 2010).

1.2.2 Druhá fáze biotransformace

Druhá fáze je zásadní pro zvýšení hydrofility xenobiotika. Během ní reagují metabolity I. fáze s endogenními sloučeninami. Navazuje na I. fázi, ale existují případy, kdy látka vstupuje rovnou do II. fáze biotransformace. Například morfin může rovnou konjugovat s kyselinou glukuronovou, ale může také nejdříve podléhat hydrolýze. Do této fáze patří glukuronidace, sulfatace, acetylace, metylace, konjugace s glutathionem a konjugace s aminokyselinami (Skálová, Boušová a kol. 2011).

1.2.2.1 UDP-glukuronosyltransferasa



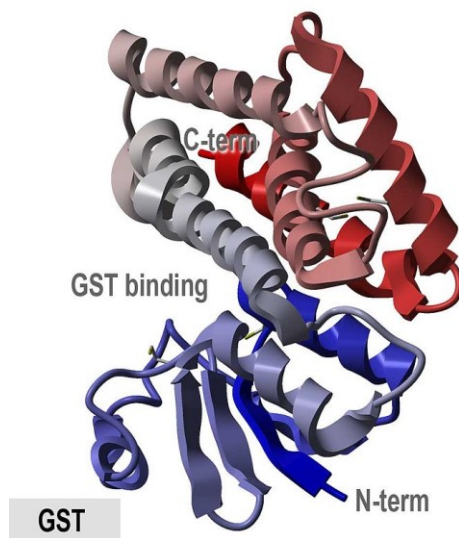
Obrázek 8- Struktura UDP-glukuronosyltransferasy

UDP-glukuronosyltransferasa (UGT) katalyzuje přenos kyseliny glukuronové z kyseliny UDP-glukuronové na funkční skupiny substrátů. Výsledkem reakce jsou O-, N-, C- a S-glukuronidy. Kofaktorem reakce je tedy UDP-glukuronová kyselina.

Rychlost její tvorby a dostupnost můžou snižovat rychlost glukuronidace. Mezi xenobiotické substráty patří například fenoly, alifatické, aromatické kyseliny a karboxylové kyseliny. Mezi endogenní substráty patří žlučové kyseliny, pohlavní hormony, thyroïdní hormony, vitamíny rozpustné v tucích a serotonin. UGT je mikrosomální glykoprotein vázaný na vnitřní membránu v lumen endoplasmatického retikula. To umožňuje přímý přístup k metabolitům první fáze biotransformace. Toto umístění má také svoji nevýhodu. Omezuje přístup kyseliny glukuronové a substrátů k aktivnímu místu enzymu. UGT se exprimuje v játrech, v žaludku, ve střevech, v ledvinách, v mozku či v kůži (Kianga a kol. 2005, Letelier a kol. 2005).

Lidská nadrodina UGT zahrnuje 2 rodiny enzymu, UGT1 a UGT2. Dále zahrnuje 3 podrodiny a to UGT1A, UGT2A a UGT2B. V každé rodině spolu sdílí enzymy 50% homologii a v každé podrodině 60% homologii (Kianga a kol. 2005).

1.2.2.2 Glutathion-S-transferasa



Tabulka 9- Struktura GST

Glutathion-S-transferasa katalyzuje konjugaci redukovaného glutathionu s endogenními látkami a xenobiotiky. Její aktivita je indukovaná v odpovědi na oxidační stres a po expozici xenobiotikem. Nevysvětlitelné zvýšení její syntézy pozorujeme u mnoha nádorů. Glutathion-S-transferasa se v přírodě vyskytuje nejen v lidském organismu, ale také v kvasinkách, bakteriích, rostlinách a u zvířat. Vykazuje i peroxidasovou

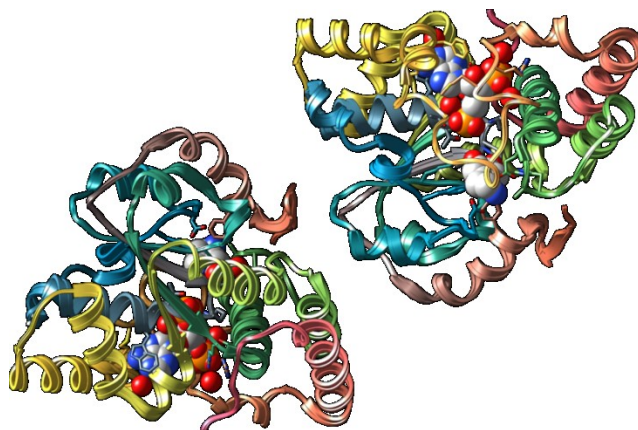
a isomerasovou aktivitu. Odstraňuje reaktivní kyslíkové radikály a regeneruje proteiny s SH-skupinou (Nebert a kol. 2004, Omiecinsky a kol. 2010).

Glutathion, γ -glutamylcysteinylglycin je kofaktorem glutathion-S-transferasy. Jeho γ -glutamyl peptidová vazba zajišťuje specifitu pro interakci s glutathion-S-transferasou. Během konjugace látek s tímto tripeptidem vznikají konjugáty buď neenzymaticky, či enzymaticky pomocí glutathion-S-transferasy. Glutathion je silný nukleofil a reaguje s elektrofilními sloučeninami tím, že mezi nimi vznikne thioetherový můstek. Konjugaci s glutathionem podléhá velké množství látek, u kterých probíhá eliminace žlučí. U savců jsou konjugáty často dále metabolizovány hydrolýzou a N-acetylací ve střevě nebo v ledvinách. Tím vznikají GST konjugáty známé jako merkapturové kyseliny, které jsou vylučovány močí (Lu 2012, Bladeren 2000).

Glutathion-S-transferasa se vyskytuje v cytosolu - GST, dále v mikrosomech (MAPEG-Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) a mitochondriích. Mezi těmito rodinami jsou značné rozdíly. Například GST je dimerický enzym, zatímco MAPEG je trimer, který má funkci membránově vázaných proteinů. Savčí GST se dělí na osm tříd a to Alpha (α), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Theta (θ), Kappa (κ), Omega (ω) a Zeta (ζ). Další čtyři rodiny Beta (β), Delta (δ), Phi (ϕ) a Tau (τ) nalezneme u bakterií, hmyzu a v rostlinách (Sheehan a kol. 2001, Sherratt a kol. 2002).

Mezi substráty GST patří epoxidové sloučeniny, alkylhalogenidy, arylhalogenidy, isothiokyanáty, chinony a α,β -nenasyčené karbonylové sloučeniny. GST může také katalyzovat metabolismus látek, z kterých vznikají toxičtější konjugáty, než byly substráty. Příkladem mohou být alkylhalogenidy s krátkým řetězcem (Sherratt a kol. 2002).

1.2.2.3 Sulfotferasa



Obrázek 10- Struktura SULT

Sulfotferasa (SULT) katalyzuje přenos sulfonové skupiny z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na akceptorovou skupinu endogenní či exogenní látky. Z biologicky aktivních látek katalyzuje SULT přeměnu například steroidních hormonů, tyreoidálních hormonů či katecholaminů na neaktivní nebo méně aktivní sloučeniny. Navázaná sulfonová skupina brání jejich vazbě na nukleární receptory (Negishi a kol. 2001).

PAPS funguje jako univerzální donor sulfonové skupiny a je biologicky aktivní formou anorganického síranu. PAPS je tvořen z ATP a síranu pomocí dvou enzymů, ATP-sulfurylasy a adenosin-5'-fosfosulfátkinasy. SULT obsahuje dvě aktivní místa. Do prvního místa se váže donor sulfátové skupiny, PAPS. Do druhého místa se váže substrát, který je akceptorem sulfátové skupiny (Alnouti a kol. 2007).

Na základě lokalizace můžeme SULT rozdělit do dvou hlavních tříd. První nalezneme v cytosolu a druhou tvoří membránové proteiny. V cytosolu se vyskytuje jako volný protein a katalyzuje konjugaci s malými molekulami například steroidy, biologické aminy a léčiva. Tato forma sulfonuje endogenní a exogenní sloučeniny a je významná pro biotransformační proces. Ve formě membránových proteinů je SULT vázána na Golgiho aparát. Tato forma se pak podílí na posttranslačních modifikacích lipidů, sacharidů a proteinů (Negishi a kol. 2001).

SULT dělíme na základě pořadí aminokyselin ve struktuře na pět rodin. SULT1, SULT2, SULT3, SULT4 a SULT5. I přes podobnost v jejich struktuře se liší substrátovou specifičností a citlivostí k inhibitorům (Alnouti a kol. 2006).

1.2.3 Mezidruhové rozdíly

U jednotlivých živočichů se liší obsah i zastoupení enzymů. Rozdíl může být v typu enzymu či v odlišné isoformě enzymu. Jiná může být také exprese enzymu a katalytická aktivita. Dva enzymy s různou strukturou mohou katalyzovat stejné reakce u různých živočichů. Zvířecí modely jsou nejčastěji používány pro preklinický výzkum a *in vitro* studie. Je důležité si uvědomit rozdíly mezi zvířaty a člověkem. Správný výběr živočišného druhu je důležitý pro kvalitní extrapolaci výsledků. Hlodavci jsou používáni pro jejich krátký pohlavní cyklus, kdy se za krátkou dobu narodí velké množství zvířat, a to umožňuje proveditelnost mnoha studií. Na druhou stranu, velká zvířata žijí déle a jsou vhodná pro dlouhodobější studie a jsou také podobnější lidem. Hlavními faktory, které ovlivňují farmakokinetiku studie, jsou váha a věk použitého zvířete. Dle alometrického škálování platí, že anatomické, fyziologické a biochemické rozdíly u savců jsou funkcí jejich tělesné hmotnosti. Je zjištěno, že poměr množství enzymů na tělesnou hmotnost zvířete je vyšší u menších zvířat. Malá zvířata mají tedy rychlejší metabolismus než lidi (Martignoni a kol. 2014).

Nejvíce prozkoumanými enzymy z hlediska mezidruhových rozdílů jsou cytochromy P450 (CYP). Primární struktura CYP je dána pořadím aminokyselin a mezidruhové rozdíly v ní jsou poměrně málo časté. Nicméně i malé změny v pořadí aminokyselin mohou prohloubit rozdíly v substrátové specifitě a katalytické aktivitě. Tím pádem, jsou to především rozdíly v isoformách CYP, co způsobuje hlavní interindividuální rozdíly v metabolismu (Martignoni a kol. 2014).

CYP1A si zachovávají velkou podobnost napříč různými živočišnými druhy. U potkanů, myší, psů a opic jsou z více jak 80 % identické s lidskými. CYP1A2 je exprimován především v játrech. Nalezneme ho u lidí, myší i potkanů. U lidí tvoří až 13 % z celkového obsahu CYP a je zapojen do metabolismu méně než 4 % léčiv. U opic a psů je exprese tohoto enzymu na nižší úrovni. Podobnost v sekvenci aminokyselin je silná (Martignoni a kol. 2014). Lidská rodina CYP3A je složena ze čtyř isoform. CYP3A4, -3A5, -3A7 a -3A43. U potkanů existují isoformy CYP3A1, -3A2, -3A9, -3A18, -3A23 a -3A62. CYP3A23 je identický s CYP3A1. Exprese těchto enzymů u potkanů je závislá na pohlaví. Například CYP3A2 a 3A18 je samčí enzym a CYP3A9 je dominantní formou u samic. Nově byl objeven CYP3A62, který odpovídá lidskému CYP3A4 a CYP3A9 u potkanů. Jeho nejvyšší hladiny jsou ve střevech. Potkani nejsou

dobrým modelem pro studium indukci lidského metabolismu CYP3A4. Typický lidský induktor rifampicin není induktorem CYP3A1, obdoby lidského CYP3A4. Také některé substráty CYP3A4 nejsou CYP3A1 metabolizovány (Martignoni a kol. 2014).

Mezidruhové rozdíly u konjugačních a redukčních enzymů jsou prozkoumány méně než u cytochromů. Například ve studii Szotákové a kol. (2004) byla porovnávána aktivita konjugačních a redukčních enzymů mezi čtyřmi druhy hospodářských zvířat oproti specifickým substrátům. Zkoumány byly enzymy u skotu, ovcí, koz a prasat. U konjugačního enzymu UGT vykazoval nejvyšší aktivitu ovčí enzym. Aktivita UGT u skotu, koz a prasat byla srovnatelná. Dále aktivita GST u koz a ovcí byla vyšší než u skotu a prasat.

V jiné studii Szotákové a kol. (2013) byl zkoumán inhibiční efekt antokyanidinů na aktivitu CBR, GST a UGT u lidí a potkanů. Zatímco aktivity CBR1 a GST byly srovnatelné u potkanů a lidí, aktivita UGT byla u lidí třikrát vyšší jak u potkanů.

Aktivitu UGT porovnával u lidí a potkanů také Komura a Iwaki (2011). Ti zkoumali vliv UGT na více substrátů. Celkové výsledky ukazují, že pokud se jedná o glukuronidaci ve střevních mikrosomech, byla aktivita lidského UGT třikrát vyšší než u potkanů. Nicméně u jaterního metabolismu nebyly u obou druhů nalezeny změny aktivity.

Také existují obecné mezidruhové rozdíly v biotransformaci xenobiotik. Například kočka, lev, či rys (obecně kočkovité šelmy) nejsou schopni glukuronidovat některé sloučeniny, které se běžně vylučují jako glukuronidy. Dále je u psů potlačena acetylace arylaminů. Dalším mezidruhovým rozdílem je snížení N-hydroxylace a tvorby mekapturonové kyseliny u morčat (Watkins a Klaassen, 1986)

Gregus a kol. (1983) zkoumal mezidruhové rozdíly u enzymů I. a II. fáze biotransformace. Nejmenší mezidruhové rozdíly byly nalezeny u SULT. Její nejvyšší aktivitu měl králík a morče. Králík měl také nejvyšší aktivitu N-acetyltransferasy. V její aktivitě byly ale větší mezidruhové rozdíly než u SULT.

Je tedy vidět, že mezidruhové rozdíly existují napříč živočišnými druhy. Závisí také na substrátu, který je metabolizován. Snad bude toto téma v dalších letech ještě více prozkoumáno a extrapolace dat bude přesnější a snadnější.

1.3 Tkáňové řezy

Dle reportu vzniklého pro European Centre for the Validation of Alternative Methods (EVCAM) se objevily tkáňové řezy poprvé v roce 1920. První krájení řezů se provádělo buď ručně nebo jednoduchými kráječi, jako byl Stadie-Riggs mikrotom. V dnešní době patří mezi nejpoužívanější tkáňové kráječe Krumdieck Tissue Slicer MD4000 a tkáňový kráječ Brendel-Vitron. První zmíněný umožňuje automatické krájení oproti druhému, kde je každý řez krájen ručně. Tkáňový kráječ Krumdieck Tissue Slicer MD4000 má ale dvě nevýhody. Je dražší a nedovoluje nepřetržité okysličování média. Nicméně nebyly nalezeny zásadní rozdíly ve funkčnosti a životaschopnosti připravených řezů. Nejnovějším typem tkáňového kráječe je Leica VT1200 S, který má vibrující čepel mikrotomu. Nedávné studie ukázaly, že řezy připravené tímto typem kráječe měly reprodukovatelnější tloušťku, nebyly ale nalezeny rozdíly v životaschopnosti řezu (de Graaf a kol. 2010, Bach a kol. 1996).

Pro tkáňové řezy je charakteristické, že mají přesně definovaný tvar a tloušťku. Nejčastěji se používají ke studiu endogenního metabolismu, biotransformace xenobiotik, buněčné fyziologie a toxikologie. Řezy se také používají ke studiu ischemie a reperfuze poškozených tkání.

Výhody tkáňových řezů:

- Obsahují všechny druhy buněk ve svém přirozeném uspořádání, buňky si zachovávají membrány a intracelulární polarizaci.
- Je zachována jejich mezibuněčná komunikace a buněčné interakce.
- Lze je využít u velkého množství orgánů, jak solidních, tak nesolidních.
- Používání této metody vede k redukci množství potřebných laboratorních zvířat.
- K jejich izolaci není nutné používat proteolytické enzymy. Ty mohou porušovat tkáňové bílkoviny.

Nevýhody tkáňových řezů:

- Finančně náročné.
- Nutnost čerstvé tkáně.
- Nízká životaschopnost řezů (hodiny až dny).

K této studii byly využity jaterní tkáňové řezy. Hepatocyty obsahují největší buněčnou frakci a představují až 80 % objemu jater, ale tvoří jen 60 % všech jaterních buněk. Zbýlých 40 % tvoří Kupfferovy buňky, endoteliální buňky cévního řečiště, epitelální buňky žlučovodů, kmenové buňky, buňky imunitního systému a další. Metoda přípravy musí být standardizována pro každý typ orgánu, proto se postupy v přípravě řezů liší. Všechny tkáňové řezy musí mít dobrou životaschopnost a reprodukovatelnost. Vliv na to mají jejich hlavní parametry. Těmi jsou tloušťka řezu a tvar řezu. Vliv má také správný výběr inkubačního média (de Graaf a kol. 2010, Krumdieck 2013).

1.3.1 Tloušťka řezu

Tloušťka řezu je prvním významným faktorem, který ovlivňuje životaschopnost řezu. Potřebná velikost je dána dalším použitím řezu. Například lehce tlustší řezy jsou vhodné pro následnou kryoprezervaci. Pokud je řez příliš silný (nad 500 μm), nemusí být dostatečně okysličen ve všech svých vnitřních vrstvách. To způsobí zformování skupiny mrtvých buněk uprostřed řezu. Opačně, příliš tenký řez (pod 100 μm) může být křehký a trhat se. To hrozí především u ultratenkých tkáňových řezů. Jejich tloušťka se pohybuje pod 100 μm . U jaterních řezů je optimální tloušťka 200-250 μm .

Měření tohoto parametru může být prováděno mikroskopicky nebo pomocí Krumdieckova tkáňového kráječe, kdy je měřena tloušťka během krájení tloušťkoměrem. Poslední možností je její určení dle hmotnosti řezu (Krumdieck 2013).

1.3.2 Tvar a příprava řezu

Je nutné připravit řezy, které budou mít stejný tvar. Tato uniformita je důležitá pro přesné výsledky.

Pro Krumdieckův tkáňový kráječ jsou z potřebné tkáně vytvořeny pomocí ostré kovové trubičky cylindrická jádra. Na výběr jsou tvořítka o průměru 3, 5, 8, 10 a 15 mm. V této studii měly válečky průměr 8 mm. Válečky připravíme rotací a zatlačením kovové trubičky do tkáně. Válečky musí být uchovávány na ledu v chladném izotonickém roztoku. Válečky jsou následně vloženy do držáku tkáně. Ten musí mít stejný rozměr jako tkáň, což zajišťuje její imobilizaci. Dále jsou zatíženy pístem. To také znemožňuje

pohyb válečku a vznikají řezy o shodném kruhovém tvaru a shodné tloušťce. Takto imobilizovaný váleček směřuje kolmo k čepeli mikrotomu. Malý píst následně svoji tíhou posouvá tkáň směrem ke kráječi (Krumdieck 2013).

Nesolidní tkáně se nejprve musí zakotvit v agaróze. S takto vzniklou solidní strukturou se dále manipuluje stejně jako se solidní tkání. Agaróza se také hodí pro tkáně či orgány o velikosti 3-5 mm.

Nejvýhodnější rozměr tkáně byl určen metodou pokus omyl (Krumdieck 2013).

1.3.3 Fyziologické médium

Dalším nutným postupem je správně konzervovat tkáně před a po krájení. Médium by mělo být optimalizováno pro každý typ tkáně. Tkáňový kráječ je naplněn médiem a krájení a všechny pohyby řezu probíhá v médiu. Izotonické médium zabraňuje změnám tonicity. Také tkáň lubrikuje a tím omezuje mechanické porušení řezu. Jeho optimální teplota se pohybuje mezi 2 a 4°C. To je teplota, kdy jsou nejnižší nároky tkáně na kyslík a je nejnižší pravděpodobnost hypoxie tkáně. Po celou dobu krájení musí být tedy udržována teplota v tomto rozmezí.

Dále díky lehkému proudu média jsou řezy přesouvány samovolně do připravené nádoby. Výběrem správného média mohou řezy přežít hodiny až dny (Krumdieck 2013, de Graaf a kol. 2010).

1.3.4 Preinkubace

Názory na preinkubaci se liší, dle Bacha a kol. (1996) je preinkubace nutná. Je to dáno odlišnou iontovou rovnováhou chladného uchovávacího média a inkubačního média. Dále může uchovávací médium obsahovat antioxidanty, které mohou potenciálně reagovat. Dle jeho doporučení je vhodné u krátkodobých metabolických studií preinkubovat 10-30 minut a měnit médium kvůli změnám pH. U dlouhodobých studií doporučuje 1-2 hodiny, aby se ustálila hladina draselných iontů.

Dle Fischera a Vickerse (2013) není preinkubace nutná, pokud je inkubace delší jak 24 hodin. Pouze v případě, že bude zkoumána v médiu přítomnost různých buněčných

komponent, je preinkubace doporučena i u dlouhodobé inkubace. U krátkodobých (<6 h) a střednědobých (<12 h) inkubací doporučují preinkubovat řezy 1-2 hodiny.

1.3.5 Inkubace

Inkubace zajišťuje přístup živin a kyslíku do řezu a tím udržuje neměnnou stavbu a funkci tkáně. Kritickým parametrem je tloušťka a tvar řezu, které mají vliv na difuzi kyslíku a živin z média do tkáně. Dále je nutné vybrat správný inkubační systém. Existuje více inkubačních systémů. Správný výběr závisí na typu tkáně, druhu živočicha, inkubační době a druhu média. Pro krátkodobé inkubace (<12 h) mohou být řezy v oscilačních baňkách či více jamkových destičkách. Při delší inkubaci může být řez ukotven na pevný nosič a dále být vložen do rotační plošiny. Inkubace může být krátkodobá, střednědobá a dlouhodobá. Krátkodobá trvá do 8 hodin, střednědobá do 24 hodin a dlouhodobá nad 24 hodin. Doba inkubace má vliv na obsah živin v médiu. Střednědobá a dlouhodobá inkubace jsou vhodné ke studiu metabolismu po expozici chemickou látkou (Bach a kol. 1996).

Inkubační médium obsahuje vitamíny, minerály, sacharidy, aminokyseliny, dále může obsahovat antibiotika, antimykotika. Někdy se přidává fetální telecí sérum. Hodnota pH média by měla být udržována pomocí vhodného pufru (Bach a kol. 1996, Fisher, Vickers 2013, de Kanter a kol. 2002).

1.3.5.1 Dynamická orgánová kultivace

Řez je vyjmut z uchovávacího média pomocí špachtle a je umístěn doprostřed titanového sítko, které je situováno uvnitř teflonového či titanového válce. Pokud jsou použity dva řezy, musí mezi nimi být mezera alespoň 4 mm, aby se řezy nepřekrývaly. Pro lepší životaschopnost je doporučováno doprostřed sítko vložit filtr z derivátu celulózy a na něj následně položit řez. Pokud jsou řezy dva, každý má svůj filtr. U jater se vkládá do každého válce po jednom řezu. Válec je horizontálně upevněn do scintilační skleněné lahvičky o objemu 20 ml naplněné 1,7 ml média. Okysličení je zajištěno vyvrtaným centrálním otvorem o průměru 1 mm do lahviček. Tato velikost je optimální pro přístup kyslíku a přitom omezuje evaporaci média. Vialky jsou vloženy do dynamického orgánového kultivačního inkubátoru, který je předehřátý na 37°C a provzdušněný 95 % O₂ a 5 % CO₂. Inkubátor lahvičkami otáčí a to způsobuje rotaci

řezu uvnitř válečku. Je důležité každých 24 hodin vyměnit médium, aby se doplnily živiny a odstranil odpad (Fisher, Vickers 2013).

1.3.5.2 Ponořený inkubační systém

Dalším systémem je inkubace řezu ve více jamkových destičkách. Počet jamek může být 6, 12, 24 a do každé jamky lze umístit jeden až tři řezy. Řezy lze také umístit do Erlenmeyerových baněk. Počet vložených řezů závisí na objemu baňky. Naplněné více jamkové destičky nebo Erlenmeyerovy baňky jsou vloženy do inkubátoru a protřepávány. Výměna plynů závisí na velikosti plochy rozhraní médium-vzduch.

Oba typy systémů byly porovnány a bylo zjištěno, že ponořené inkubační systémy jsou pro studium metabolismu dostačující (de Kanter a kol. 2002, Fisher, Vickers 2013).

1.3.6 Homogenizace

Při studiu metabolismu s tkáňovými řezy je tkáň inkubována v různých inkubačních systémech. Po inkubaci mohou být xenobiotika a metabolity xenobiotika zachyceny i v tkáňovém řezu. Z média bychom nezjistili jejich správné hladiny. Je proto nezbytné řez homogenizovat v inkubačním médiu. Vznikne homogenát, který obsahuje všechny metabolity látky i zkoušenou látku samotnou (Lake, Price 2013).

1.3.7 Životaschopnost řezů

Zkouška životaschopnosti řezů je zásadní pro zjištění kvality a použitelnosti řezu. Existuje velké množství metod pro její měření.

První a v této studii použitou metodou je stanovení úniku enzymů do média. Enzymy se uvolňují po porušení cytoplasmatické membrány z poškozených buněk. U řezů jater, plic a ledvin se často uplatňuje únik laktátdehydrogenasy a alkalické fosfatasy. V této studii byla měřena právě laktátdehydrogenasa. Alanin- a aspartátaminotransferasy se používají pro jaterní řezy a gama-glutamyltranspeptidasa pro řezy ledvin. Životaschopnost se vyhodnocuje jako procento z celkového množství obsahu enzymu v řezu (de Kanter a kol. 2002).

Další metodou je použití světelného mikroskopu. Pomocí něj sledujeme, zda byla porušena vnitřní stavba tkáně. Touto metodou bylo zjištěno, že si řezy zachovávají normální stavbu až po dobu 7 dnů. To znamená, že jsou bohaté na mitochondrie, hrubé endoplasmatické retikulum a jsou zachovány všechny organely (Fisher a Vickers 2013).

Lehce měřitelným a praktickým parametrem je hladina ATP. Ukazuje jaká je vnitřní energie řezu. Řezy jsou totiž funkčně aktivní a obnovují a zachovávají si buněčnou energii. Tím, že jsou aktivní, probíhá stále doplňování hladin glutathionu a udržování intracelulárních hladin draslíku. Poměr oxidované a redukované formy glutathionu se používá příležitostně ke studiu oxidačního stresu. Obsah draselných iontů je ovlivněn porušeností cytoplasmatické membrány a udává funkčnost Na^+/K^+ -ATPasy (de Kanter a kol. 2002, Fisher a Vicker 2013).

Další častou metodou je tzv. MTT test. Hodnotí metabolickou přeměnu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT). Tato reakce probíhá v mitochondriích živých buněk pomocí dehydrogenas. Žlutý a ve vodě rozpustný MTT se redukuje na fialový, ve vodě nerozpustný formazan. Vyhodnocuje se spektrofotometricky (Červenková a kol. 2001).

2 Cíl práce

- Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda mohou seskviterpeny α -humulen, β -karyofylen a β -karyofylen-oxid ovlivňovat aktivitu a expresi vybraných biotransformačních enzymů v jaterních řezech.
- K tomu bylo nutné provést tyto kroky:
 - Připravit precizní řezy z jater potkana pomocí přístroje Krumdieck Tissue Slicer.
 - Inkubovat řezy s vybranými seskviterpeny (α -humulen a β -karyofylen a karyofylen-oxid).
 - Připravit subcelulární frakce z jaterních řezů.
 - Stanovit aktivitu biotransformačních enzymů.
 - Vyhodnotit a statisticky zpracovat výsledky.

3 Experimentální část

3.1 Materiály

3.1.1 Biologický materiál

- Řezy byly připraveny z jater laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*, kmen *Wistar*). Jednotlivé váhy potkanů byly 480 g, 370 g, 380 g, 320 g, 370 g a 400 g. Průměrná váha byla 386,66 g.

3.1.2 Chemikálie

- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), Roth
- 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), Aldrich
- 2-naftol, Aldrich
- 3% trichloroctová kyselina, Penta
- 3'-fosfoadenosin-5'-fosfát (PAP), Sigma
- Acenaftenol, Aldrich
- Cytochrom C, Serva
- D-glukóza, Riedel-de-Haën
- Dikumarol, Aldrich
- DL-glyceraldehyd, BDH
- Ethoxyresorufin-O-deethylasa, BioChemica
- Glutathion redukovaný (GSH), Sigma
- Hydrokortison-21-hemisukcinát, Sigma
- karyofylen-oxid, Sigma
- Menadion, Aldrich
- Methoxyresorufin-O-deethylasa, BioChemica
- Nikotinamidadenindinukleotid redukovaný (NADH), Merck
- Nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný (NADPH), Merck
- p-nitrofenol, Fluka
- p-nitrofenylsulfát, Sigma
- Roztok bicinchoninové kyseliny, Sigma
- Roztok hovězího sérového albuminu 20%, Sigma

- Slovasol, Sigma-Aldrich
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Penta
- UDP-glukuronová kyselina (UDP-GA), Sigma
- α -humulen, Aldrich
- β -karyofylen, Sigma
- β -karyofylen-oxid,
- Další chemikálie čistoty p.a.: NaHCO_3 (Penta), Na_2CO_3 (Penta), $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Lachema), NaOH (Lachema), MgCl_2 (Sigma), dimethylsulfoxid (Sigma)

3.1.3 Přípravované roztoky

- 0,9% roztok NaCl
- K-fosfátový pufr, pH 6,0
- K-fosfátový pufr, pH 6,5
- K-fosfátový pufr, pH 7,4
- Krebs-Henseleitův pufr
- Na-fosfátový pufr, pH 6,5
- Upravené medium RPMI-1640
- TRIS/HCL pufr, pH 7,4
- TRIS/HCL pufr, pH 7,5
- TRIS/HCL pufr, pH 8,7
- TRIS/HCL pufr, pH 8,9

3.1.4 Přístroje

- Analytické váhy Sartorius CP225D
- Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Biofuge Stratos
- CO_2 inkubátor Heraeus- Heracell cell
- Hluboko mrazicí box Thermo Scientific Jouan VXE SERIES
- Laboratorní magnetická míchačka IKA MS 2 MINISHAKER
- Laminární box BioAir AURA 2000 M.A.C.
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200 Scholler
- Thermomixer Comfort Eppendorf
- Tkáňový kráječ Krumdieck Tissue Slicer MD400

- Třepačka Heidolph Unimax 1010
- Ultrazvukový homogenizátor – BANDELIN SONOREX RK31
- Stolní centrifuga – EPPENDORF CENTRIFUGE 5415D
- pH metr – Ino LAB WTW/ PH ELECTRODE BLUELINE 24 pH

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava Krebsova-Henseleitova pufru

Krebsův-Henseleitův pufr je používán při krájení a uchování řezů. Nejdříve byl rozpuštěn $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v redestilované vodě. Poté v ní byly rozpuštěny všechny zbylé složky. Tyto dva roztoky se smíchaly. Chlorid vápenatý se přidává odděleně, aby se předešlo možnému vykrystalizování uhličitánů z pufru. Následně bylo nastaveno pH na hodnotu 7,4 pomalým přidáváním 1 M roztoku NaOH. Takto připravený pufr musí být uskladněn při 4 °C po dobu maximálně 24 hodin. Před použitím by se měl zreoxygenovat a pH by mělo být zkontrolováno a případně upraveno.

Tabulka 1-Složení Krebsova-Heseleitova pufru

	Koncentrace (mM)	Mr (g/mol)	Gramy/2l pufru
Chlorid sodný (NaCl)	116	58,44	13,56
Chlorid draselný (KCl)	4.1	74,56	0,686
Hydrogenuhlíčan sodný (NaHCO_3)	25.1	84,01	4,3
Síran hořečnatý ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	1.00	246,48	0,572
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	1,16	136,09	0,316
Dihydrát chloridnu vápenatého $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5	147,02	0,736
D-glukóza	25	180,16	9
HEPES	20	238,31	9,532

3.2.2 Příprava inkubačního média

Nejdříve byl připraven 100 μM roztok insulinu v odměrné baňce. Insulin je nerozpustný ve vodě, ale rozpouští se v kyselinách. Proto byla navážka insulinu rozpuštěna v pěti kapkách kyseliny octové a doplněna destilovanou vodou na objem 5 ml. Následně se všechny komponenty rozpustily v RPMI-1640 médiu v laminárním boxu. Roztok byl doplněn na objem 100 ml a pH bylo nastaveno na hodnotu 7,4 pomocí 1M NaOH. Nakonec byl roztok zfiltrován ve sterilním prostředí.

Tabulka 2-Látky na doplnění RPMI média

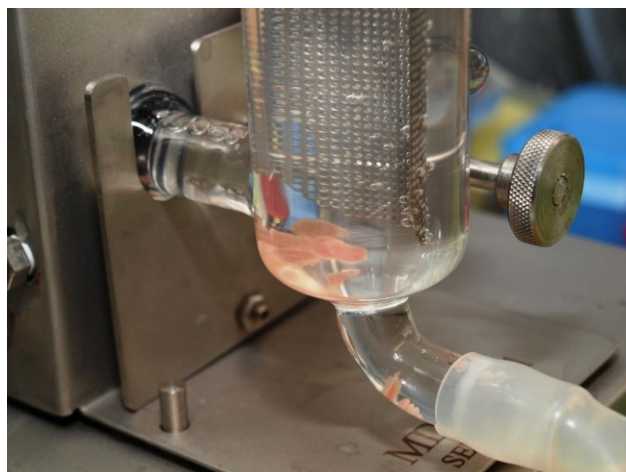
	Konečná koncentrace	Mr
Fetální hovězí sérový albumin	5%	
L-methionin	0,5 mM	149,2 g/mol
Insulin	1 μM	5807 g/mol
Hydrokortison 21-hemisukcinát	0,01 mM	484,5 g/mol
Gentamicin	50 $\mu\text{g/ml}$	50 mg/ml

3.2.3 Příprava ultratenkých tkáňových řezů

Nejprve byl připraven Krebsův-Henseleitův pufr. Byl provzdušněn pneumoxidem (95 % O₂/5 % CO₂) a následně jím byl naplněn kráječ. Přichystaly se nůžky, ubrousky, sáček pro potkana, box s ledem a 3 kádinky. Jedna na řezy, druhá na játra a třetí byla na válečky. Dále byla potřeba Petriho miska vyložená filtračním papírem pro přípravu válečků z jater potkana. Tkáňový kráječ byl připojen k vodní lázni, aby voda 4 °C cirkulovala kráječem. Potkan byl uspaný etherem a následně usmrčen vykrvením. Získaná játra byla třikrát omyta Krebsovým-Henseleitovým pufr. Z jater byly vytvořeny válečky zatlačením a rotací vrtáku do tkáně. Tvořítko mělo průměr 8 mm. Vzniklé válečky byly uchovány na ledu v izotonickém roztoku. Pomocí pinzety byly válečky přesunuty do držáku tkáně v Krumdieckově kráječi a byly připraveny řezy o tloušťce 200-250 μm.



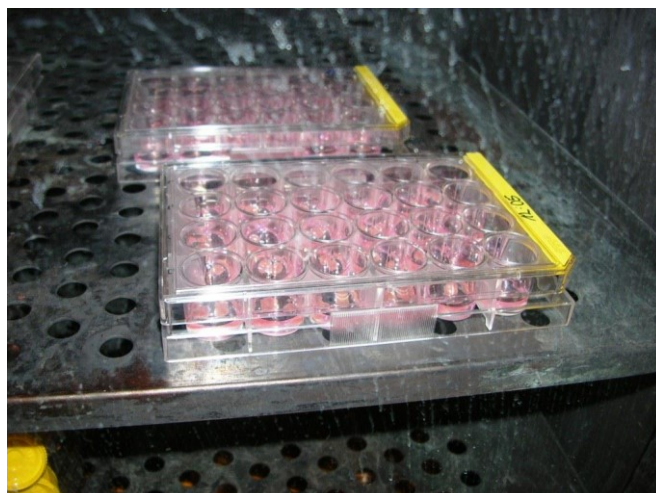
Obrázek 11 - Umístění válečků z jater potkana do Krumdieckova tkáňového kráječe



Obrázek 12 - Tkáňové řezy po vyplavení z tkáňového kráječe proudem média

3.2.4 Preinkubace a inkubace řezů

Do každé jamky 12jamkové destičky bylo napipetováno 1,3 ml inkubačního média. Přípravené řezy byly vloženy do jednotlivých jamek. V každé jamce byl právě jeden řez. Destičky byly vloženy do inkubátoru (37 °C), kde byla nachystána orbitální třepačka nastavená na 70 RPM. Na třepačce byl položen box sycený pneumoxidem (95 % O₂/5 % CO₂), ten zajišťoval zvýšený přívod kyslíku do inkubátoru. Před každou inkubací byla provedena preinkubace. Ta probíhala při 37 °C v atmosféře pneumoxidu. Řezy byly preinkubovány v suplementovaném RPMI médiu bez přítomnosti zkoumaných seskviterpenů. Po 30 minutách bylo vyměněno médium. Následně proběhla inkubace s médiem, které obsahovalo zkoumané seskviterpeny.



Obrázek 13- Jamkové destičky s tkáňovými řezy potkana během inkubace

3.2.5 Odběr vzorku a homogenizace

Byly připraveny mikrozkušavky do ledu. Řezy a médium byly po 8 a 24 hodinách inkubace odebrány do připravených mikrozkušavek a k nim bylo napipetováno 500 μl 0,1 M sodno-fosfátového pufru o pH 7,4. Řezy byly ve zkumavce homogenizovány pomocí homogenizační tyčinky. Poté bylo od každého řezu odebráno 450 μl homogenátu do nových mikrozkušavek. Ty byly vloženy do centrifugy, kde byly mikrozkušavky po dobu 20 minut, při 10 000 G a 4 °C stáčený. Vznikl supernatant s obsahem cytosolu a mikrosomů. Ten byl odebrán, přelit do čisté zkumavky a co nejrychleji rozpipetován po 190 μl do dalších mikrozkušavek a umístěn do hluboko mrazícího boxu (-80 °C).

3.2.6 Stanovení koncentrace proteinu

Stanovení bílkovin bylo provedeno BCA metodou. Principem této metody je reakce proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měďnaté ionty se redukují na měďné ionty. Ty vytváří v prostředí kolem pH 10 stabilní modrofialový komplex s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Intenzita zabarvení komplexu je přímo úměrná množství bílkovin. Měření probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm.

Reakční roztoky

- Roztok A: NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH
- Roztok B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- Pracovní roztok C: připravíme smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1

Kalibrační křivka

Standard pro vytvoření kalibrační křivky byl 0,1% roztok hovězího sérového albuminu (BSA). Do 6 mikrozkušavek jsme napipetovali kalibrační vzorky o přesně známé koncentraci bílkovin. Z námi naměřených hodnot absorbance jsme následně vytvořili kalibrační křivku.

Tabulka 3- ředění standartu

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

Vzorky byly 5x ředěny destilovanou vodou. Do každé jamky 96jamkové GAMA destičky s kulatým dnem bylo pipetováno 10 µl vzorku a poté bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku C pomocí multikanálové pipety. Jako slepý vzorek jsme použili 10 µl destilované vody.

Následně byla provedena inkubace v Thermomixeru Eppendorf trvající 30 minut při 37 °C. Během inkubace byly vzorky promíchávány. Poté se změřila absorbance vzorků při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru Tecan Infinite M 200. Z rovnice směrnice kalibrační křivky byla dopočítána koncentrace proteinu.

3.2.7 Stanovení aktivity cytochromu P450

Princip metody je založen na přidání substrátu (ethoxyresorufin), relativně specifického pro isoformu CYP1A1 (částečně CYP1A2, poměr EROD/MROD 6,5) nebo pro isoformu CYP2B/3A (benzyloxyresorufin), k supernatantu. Každá isoforma metabolizuje svůj specifický substrát na fluoreskující produkt – resorufin. Měří se přírůstek fluorescence na Tecanu.

Roztoky:

- 0,1 M TRIS-HCL pufr o pH 7,4
- 0,1 M MgCl₂
- 0,5 mM ethoxyresorufin v DMSO
- 50 mM NADPH v TRIS-HCL pufru (4 mg NADPH/100 µl)

- 0,5 mM resorufin v DMSO:
 - před použitím naředit vodou na 0,5 μM – 10 μl 0,5 mM resorufinu a 9,99 ml pufru.

Substráty:

- benzyloxyresorufin
- ethoxyresorufin

Tabulka 4-Přehled enzymů CYP a jejich substrátů

	Substrát	Enzym	Isoforma
BROD	benzyloxyresorufin	benzyloxyresorufin O-dearylasa	3A, 2B
EROD	ethoxyresorufin	ethoxyresorufin-O- deethylasa	1A1, částečně 1A2

Reakční směs

- Smícháme 18,2 ml pufru, 1 ml MgCl_2 , 100 μl ethoxyresorufinu a 200 μl NADPH.
- Množství na jednu destičku.

Do každé jamky ve sloupci pipetujeme 10 μl neředěného vzorku a přidáme 195 μl mastermixu multikanálovou pipetou. Do jednoho sloupce destičky napipetujeme 10 μl 0,5 μM resorufinu multikanálovou pipetou a 190 μl pufru multikanálovou pipetou. Změříme excitační fluorescenci ($\lambda = 530\text{nm}$) na Tecanu. Destičku inkubujeme 30 minut při 37 $^\circ\text{C}$ a po uplynutí této doby znovu měříme přírůstek emisní fluorescence ($\lambda = 585\text{nm}$) na Tecanu.

3.2.8 Stanovení aktivity NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1

Principem metody je spektrofotometrické stanovení redukce cytochromu c při vlnové délce 550 nm v přítomnosti NADH či NADPH a menadionu (elektronový akceptor). Zaznamenává se nárůst absorpance redukovaného cytochromu c. Aktivita NQO1 odpovídá aktivitě inhibované dikumarolem. Ten je známý inhibitor tohoto enzymu.

Roztoky:

- TRIS/HCl pufr 50 mM o pH 7,5:
 - 0,606 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustíme cca v 80 ml redestilované vody. 1 M HCl upravíme pH na 7,5 a doplníme na 100 ml.
- TRIS/HCl pufr s BSA (0,2188%):
 - 0,1094 g BSA rozpustíme v 50 ml pufru.
- Cytochrom c 308 µM:
 - 0,05 g cytochromu c rozpustíme v 10 ml pufru.
- NADH 4 mM:
 - 0,0043 g rozpustíme v 1,5 ml redestilované vody.
- NADPH 4mM.
 - 0,005 g rozpustíme v 1,5 ml redestilované vody.
- Menadion 2mM:
 - 0,0017 g rozpustíme v 5 ml ethanolu.
- Dikumarol 2mM:
 - 0,00336 g rozpustíme v 5 ml DMSO.

Reakční směs:

- Bez inhibitoru: Smícháme 7,68 ml TRIS/HCl + BSA, 3 ml cytochromu c, 600 µl NADH/NADPH, 60 µl menadionu a 60 µl DMSO.
- S inhibitorem: Smícháme 7,68 ml TRIS/HCl + BSA, 3 ml cytochromu c, 600 µl NADH/NADPH, 60 µl menadionu a 60 µl dikumarolu.
- Množství odpovídá na ½ destičky s inhibitorem a ½ destičky bez inhibitoru.

Předeheřejeme Tecan na 37 °C. Do 6 jamek 96jamkové GAMA destičky napipetujeme 10 µl vzorku a do dvou jamek 10 µl slepého vzorku. (0,1 M Na-fosfátový pufr o pH 7,4). Multikanálovou pipetou přidáme 190 µl mastermixu s a bez inhibitoru do destičky. Měříme rozdíl absorbance mezi 4. a 1. minutou měření.

Výpočet aktivity NQO1 (nmol/min/ml):

$$a = \frac{\Delta A * V_C * 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_V}$$

ΔA - rozdíl absorbance vzorku a slepého vzorku za 1 minutu

V_C - celkový objem reakční směsi - 0,2 ml

ϵ - molární absorpční koeficient ($\epsilon_{\text{NADH}} = 28 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l - výška jamky - 0,9 cm

V_V - objem vzorku - 0,01 ml

$$a_{\text{NQO1}} = a_{\text{neinhib.rce}} - a_{\text{inhib.rce}}$$

3.2.9 Stanovení aktivity aldoketoreduktas

Principem metody stanovení aktivity redukčních enzymů je měření vzrůstu absorbance způsobené přeměnou NADP^+ na NADPH při 340 nm za laboratorní teploty (37 °C). Aktivitu reduktas lze vyjádřit pomocí vzrůstu absorbance a molárního absorpčního koeficientu $\text{NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Jednotka enzymové aktivity je definována jako oxidace 1 mol NADPH/min při 25 °C.

Roztoky:

- Pufr – 0,1 M TRIS/HCL pufr o pH 8,9:
 - 1,21 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustíme v 70 ml redestilované vody a upravíme pH na 8,9 a doplníme na 100 ml.
- Acenaftenol 0,1 M:
 - Rozpustíme v poměru 17,02 mg/ml DMSO
- NADP^+ 20 mM:
 - Rozpustíme 23,6 mg v 1,5 ml redestilované vody.

Reakční roztok:

- Smícháme 178 μl pufru s 2 μl acenaftenolu a 10 μl NADP⁺. Množství platí pro jednu jamku.

Do šesti jamek v každém sloupci 96jamkové GAMA destičky napipetujeme 10 μl cytosolu. Do zbylých dvou napipetujeme 10 μl slepého vzorku (Na-fosfátový pufr o pH 7,4). Multikanálovou pipetou přidáme 190 μl mastermixu do každé jamky. Pomocí přístroje Tecan Infinite M 200 změříme vzrůst absorbance při vlnové délce 340 nm po dobu 5 minut.

Výpočet aktivity AKR1C (nmol/min/ml):

$$a = \frac{\Delta A * V_C * 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_V}$$

ΔA - rozdíl absorbance vzorku a slepého vzorku za 1 minutu

ϵ_{NADPH} - 6,22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l - výška jamky – 0,75 cm

V_C - objem reakční směsi – 0,2 ml

V_V - objem vzorku – 0,010 ml

3.2.10 Stanovení aktivity aldehydreduktasy

Principem stanovení aktivity redukčních enzymů je měření poklesu absorbance způsobené přeměnou NADPH na NADP⁺ ve vzorku při vlnové délce 340 nm za laboratorní teploty (37 °C). Aktivitu reductas lze kvantitativně vyjádřit pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH = 6220 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Jednotka enzymové aktivity je definována jako oxidace 1 mol NADPH/min za dané teploty.

Roztoky:

- Pufr – 0,1 M K-fosfátový pufr o pH 6,0:
 - Smícháme 0,1 M K₂HPO₄ s 0,1 M KH₂PO₄ tak, aby pH bylo 6,0.
- DL-glyceraldehyd 1 M:
 - Rozpustíme v DMSO v poměru 0,009008 g/ml.
- NADPH 4 mM:
 - Rozpustíme ve vodě v poměru 3,33 mg/ml.

Reakční směs:

- Smícháme 178 μl pufru s 2 μl DL-glyceraldehydu a 10 μl NADPH. Množství platí pro jednu jamku.

Do 6 jamek 96 jamkové GAMA destičky napipetujeme 10 μl vzorku a do dvou jamek napipetujeme 10 μl slepého vzorku (Na-fosfátový pufr o pH 7,4). Do každé jamky přidáme multikanálovou pipetou 190 μl mastermixu. Absorbanci měříme při vlnové délce 340 nm po dobu 5 minut v přístroji Tecan Infinite M 200.

Výpočet aktivity AKR1A1 (nmol/min/ml):

$$a = \frac{\Delta A * V_c * 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_v}$$

ΔA - rozdíl absorbance vzorku a slepého vzorku za 1 minutu

ϵ_{NADPH} - 6,22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l - výška jamky – 0,75 cm

V_c - objem reakční směsi – 0,2 ml

V_v - objem vzorku – 0,010 ml

3.2.11 Stanovení aktivity karbonylreduktasy 1

Principem metody je inkubace subcelulární frakce se substrátem menadionem. Menadion je redukován karbonylreduktasou 1 a tato redukce je doprovázena oxidací NADPH. Ta je fotometricky zaznamenávána jako pokles absorbance. Aktivitu reduktasy lze vyjádřit pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH= 6220 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Roztoky:

- Pufr - 0,1 M K-fosfátový pufr o pH 7,4:
 - 8,71 g K_2HPO_4 rozpustíme v 500 ml destilované vody. 2,72 g KH_2PO_4 rozpustíme v 200 ml destilované vody. Oba roztoky sléváme do dosažení pH 7,40.
- Menadion:
 - 8,61 mg rozpustíme v 1 ml ethanolu

- NADPH:
 - 6,25 mg rozpustíme v 1,5 ml redestilované vody

Reakční roztok:

- Smícháme 178 μ l pufru, 2 μ l menadionu, 10 μ l NADPH. Množství odpovídá na jednu jamku.

Do 6 jamek 96 jamkové GAMA destičky napipetujeme 10 μ l vzorku a do dvou jamek 10 μ l slepého vzorku (0,1 M Na-fosfátový pufr o pH 7,4). Destičku preinkubujeme 5 minut při 37 °C. Přidáme 190 μ l mastermixu multikanálovou pipetou do každé jamky. Měříme pokles absorbance po dobu 5 minut při vlnové délce 340 nm.

Výpočet aktivity (nmol/min/ml):

$$a = \frac{\Delta A * V_c * 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_v}$$

ΔA - rozdíl absorbance vzorku a slepého vzorku za 1 minutu

V_c - celkový objem reakční směsi - 0,2 ml

ϵ - molární absorpční koeficient ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.)

l - výška jamky - 0,75 cm

V_v - objem vzorku - 0,01 ml

3.2.12 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy

Zásobní roztoky:

- Substrát: 2,5 mM p-nitrofenol (odpovídá rozpuštění 3,5 mg v 10 ml destilované vody)
- Konjugační činidlo: 10 mM UDP-glukuronová kyselina (odpovídá rozpuštění 6,46 mg v 1 ml destilované vody)
- Detergent: Slovasol
- Tris/HCl pufr o pH 7,4: 0,5 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustíme v 10 ml destilované vody. Upravíme pH na 7,4 pomocí 1 M HCl a doplníme na objem 15 ml pomocí destilované vody. Nakonec v celém objemu pufru rozpustíme 24,4 mg MgCl_2 .

- Deproteinizační roztok: 3% trichloroctová kyselina
- Neutralizační roztok: 1 M NaOH

Postup:

- Mikrozkušavky si připravíme na led. Rozmrazíme vzorky o známé koncentraci proteinů. Odpipetujeme potřebné množství vzorku a přidáme takový objem detergentu, aby byl poměr detergent:protein – 1:2. Promícháme a necháme inkubovat v lednici 20 minut. Do každé mikrozkušavky napipetujeme 50 µl pufru, 20 µl UDP-GA (vzorek) nebo vody (slepý vzorek), 20 µl p-nitrofenolu a 10 µl mikrosomů s detergentem. Inkubační směs promícháme a dáme inkubovat do thermomixeru na 20 minut při teplotě 37 °C. Přendáme zpět na led a přidáme 50 µl TCA, promícháme a stočíme na centrifuze (5000 ot/min, 5 minut). Do každé jamky 96jamkové destičky napipetujeme 50 µl roztoku NaOH a do první jamky destilovanou vodu. Do jamek s NaOH přeneseme 50 µl inkubační směsi. Měříme absorbanci při 405 nm. Koncentraci konjugovaného pNF vypočítáme z $\epsilon = 18,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$a = \frac{\Delta A * V_c * 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_v}$$

ΔA - rozdíl absorbance vzorku a slepého vzorku

V_c - celkový objem reakční směsi - 0,2 ml

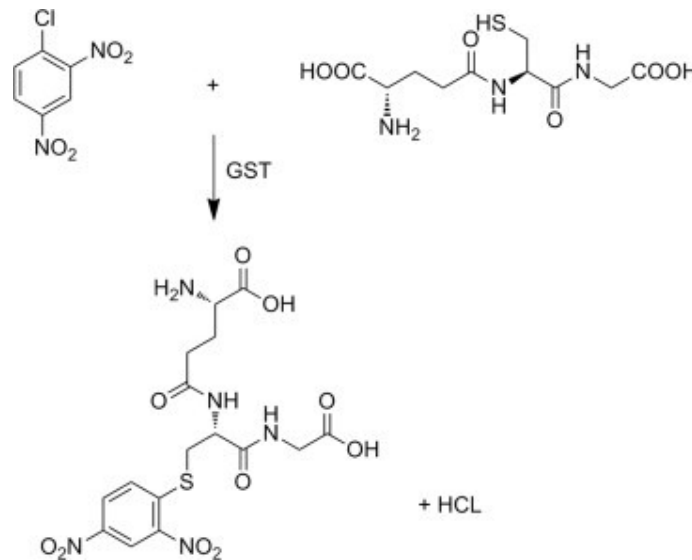
ϵ - molární absorpční koeficient - $\epsilon = 18,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l - výška jamky - 0,55 cm

V_v - objem vzorku - 0,01 ml

3.2.13 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy

Principem této metody je konjugace glutathion s 1-chlor-2,4-dinitrobenzenem (CDNB) za vzniku barevného S-2,4-dinitrofenylglutathionu.



Obrázek 14- Tvorba GSH-CDNB konjugátu

Roztoky:

- 0,1 M Na-fosfátový pufr o pH 6,5:
 - Navážíme 1,79 g Na₂HPO₄ do 50 ml odměrné baňky a doplníme redestilovanou vodou.
 - Navážíme 1,56 g NaHPO₄ do 100 ml odměrné baňky a doplníme redestilovanou vodou.
 - Smícháme v poměru 1:3 a upravíme pH na 6,5.
- Roztok GSH: 5,15 mM GSH v 0,1 M Na-fosfátovém pufru o pH 6,5 (jedna destička)
 - Navážíme 7,92 mg GSH a rozpustíme v 5 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 6,5
- Roztok CDNB: 51,5 mM CDNB v ethanolu (jedna destička)
 - Navážíme 5,22 mg CDNB a necháme rozpustit v 0,5 ml ethanolu.
- Master mix:
 - Napipetujeme 4 ml GSH, 0,4 ml CDNB a 15,6 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru. Vše připravíme těsně před stanovením.

Do 6 jamek v každém sloupci napipetujeme 6 μ l neředěného vzorku a do dvou jamek napipetujeme 6 μ l sodno-fosfátového pufru o pH 6,5. Použijeme 96jamkovou destičku Greiner s plochým dnem. Následně napipetujeme od každé jamky multikanálovou pipetou 194 μ l reakční směsi. Absorbanci změříme na spektrofotometru Tecan Infinite M 200 při vlnové délce 340 nm.

Jednotka enzymové aktivity je definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu 1 μ mol S-2,4-dinitrofenyl-glutathionu za 1 minutu. Specifická aktivita je vyjádřena jako počet jednotek na 1 mg proteinu.

Výpočet aktivity GST (nmol/min/ml):

$$a = \frac{\Delta A * V_c * 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_v}$$

ΔA - rozdíl absorbance vzorku a slepého vzorku za 1 minutu

V_c - celkový objem reakční směsi - 0,2 ml

ϵ - molární absorpční koeficient ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

l - výška jamky - 0,55 cm

V_v - objem vzorku - 0,006 ml

3.2.14 Stanovení aktivity sulfotransferasy

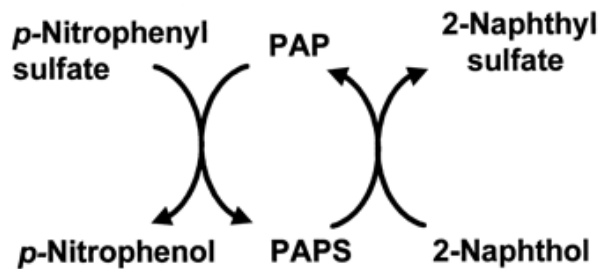
Principem měření aktivity SULT je tvorba p-nitrofenolu z p-nitrofenylsulfátu. Dochází k přenosu sulfonové skupiny z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfátu na 2-naftol.

Roztoky:

- 50 mM K-fosfátový pufr o pH 6,5
- 50 mM MgCl₂: Navážíme 0,01525 g MgCl₂.6 H₂O a rozpustíme jej v 1,5 ml redestilované vody.
- 20 μ M 3'fosfoadenosin-5'-fosfát (PAP): 2 mM zásobní roztok naředíme 100x
- 50 mM p-nitrofenylsulfát: 0,01930g rozpustíme v 1,5 ml redestilované vody
- STOP roztok: 0,25 M Tris-HCL pufr o pH 8,7

Reakční směs:

- Master mix v množství pro jednu destičku vznikl smícháním 5,9 ml pufru (50 mM K-fosfátový pufr o pH 6,5), 1 ml 50 mM chloridu hořečnatého, 1 ml 20 μM 3'-fosfoadenosin-5'-fosfátu, 1 ml 50 mM p-nitrofenylsulfátu a 100 μl 10 mM 2-naftolu.
- Do 6 jamek v každém sloupci GAMA destičky bylo napipetováno 10 μl vzorku a do dvou jamek v každém sloupci bylo napipetováno 10 μl 0,1 M sodno-fosfátového pufru o pH 7,4. Ten sloužil jako slepý vzorek.
- Do všech jamek bylo napipetováno 90 μl reakční směsi multikanálovou pipetou.
- Destička se protřepala a následně byla inkubována 10 minut při 37 °C v Thermomixeru.
- Po inkubaci byla zastavena reakce přidáním 100 μl 0,25 M Tris-HCl pufru o pH 8,7.
- Absorbance byla měřena při vlnové délce 405 nm.
- Jednotka enzymové aktivity U je definována jako množství enzymu katalyzující vznik 1 μmol p-nitrofenolu za 1 minutu. Specifická aktivita je vyjádřena jako počet jednotek/mg proteinu.



Obrázek 15- tvorba p-nitrofenolu z p-nitrofenylsulfátu

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

$$a = \frac{\Delta A * V_c * 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_v}$$

ΔA - rozdíl absorbance vzorku a slepého vzorku

V_c - celkový objem reakční směsi - 0,2 ml

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

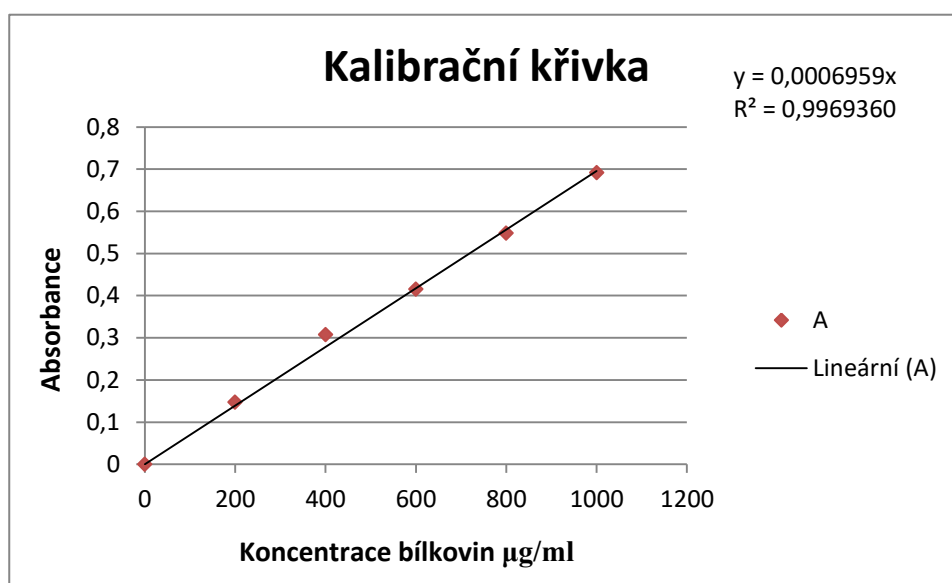
l - výška jamky - 0,9 cm

V_v - objem vzorku - 0,01 ml

4 Výsledky

4.1 Stanovení koncentrace bílkovin

Po změření absorbance jsme odečetli od absorbance jednotlivých koncentrací (200 – 1000 µg/ml) absorbanci roztoku o koncentraci 0 µg/ml (slepý vzorek). Z těchto hodnot jsme vytvořili kalibrační křivku. Ta nám poskytla rovnici lineární regrese, podle které jsme vypočítali koncentraci bílkovin.



Obrázek 16- Kalibrační křivka stanovení BCA bílkovin

Vzorek:

Byla změřena absorbance pro kontrolní vzorek po 8 a 24 hodinové inkubaci (K8, K24, bez seskviterpeny), pro vzorek po 8 hodinové inkubaci s karyofylenem (CAR8), pro vzorek po 8 hodinové inkubaci s karyofyleneoxidem (CAO8), pro vzorek po 8 hodinové inkubaci s humulenem (HUM8), pro vzorek po 24 hodinové inkubaci s karyofylenem (CAR24), pro vzorek po 24 hodinové inkubaci s karyofyleneoxidem (CAO24) a pro vzorek po 24 hodinové inkubaci s humulenem (HUM24). Od každé absorbance byla odečtena absorbance slepého vzorku. Výsledek byl vynásoben zředěním našich vzorků. Vzorky byly u dvou měření 5x zředěny a u jednoho měření 10x zředěny. Následně byla pomocí rovnice lineární regrese vypočtena koncentrace bílkovin pro jednotlivé seskviterpeny a kontrolní vzorek.

Tabulka 5- Koncentrace bílkovin ve vzorcích

Datum	Koncentrace (mg/ml)							
	K8	CAR8	CAO8	HUM8	K24	CAR24	CAO24	HUM24
6.12.2016	1,55	1,42	1,55	1,53	1,23	1,27	1,24	1,24
8.11.2016	1,67	1,75	1,61	1,69	1,35	1,26	1,20	1,40
6.3.2017	1,40	1,34	1,25	1,46	1,37	1,21	1,08	1,16
Průměr±SD	1,53± 0,11	1,50± 0,18	1,38± 0,16	1,60± 0,10	1,32± 0,07	1,25± 0,03	1,17± 0,07	1,27± 0,10

Koncentrace bílkovin se snižuje s delším časem inkubace. Koncentrace bílkovin ve vzorcích inkubovaných se seskviterpeny je nižší než koncentrace v kontrolním vzorku. Výjimka je u humulenu po 8 hodinové inkubaci. První a druhé měření jeví podobné výsledky. Při třetím měření byly zjištěny menší hodnoty oproti prvním dvěma měřením.

4.2 Vliv α -humulenu, β -karyofylenu a karyofylen-oxidu na biotransformační enzymy

Seskviterpeny byly testovány v koncentracích 10 μ M. Jejich vliv na aktivitu enzymů I.a II. fáze biotransformace byl porovnáván s aktivitou enzymů v kontrolních řezech. Ty byly inkubovány bez přítomnosti seskviterpenů.

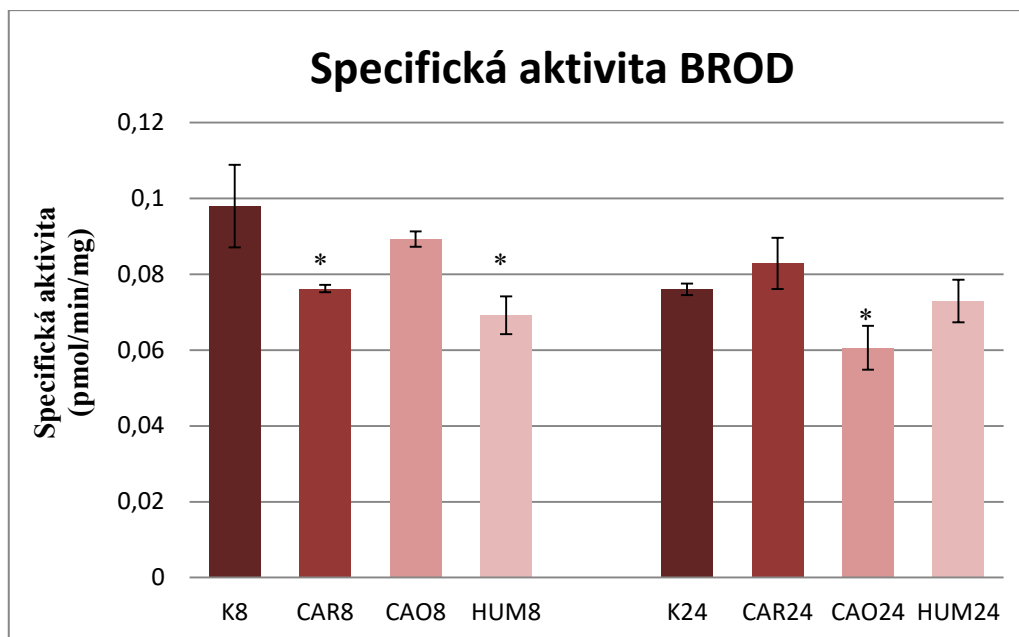
4.2.1 Ovlivnění cytochromu P450 2B/3A

Řezy ovlivněné β -karyofylenem a α -humulenem vykazovaly snížení specifické aktivity CYP2B/3A (BROD) po 8hodinové inkubaci. Řezy ovlivněné karyofylenem-oxidem nevykazovaly žádnou změnu specifické aktivity BROD. Řezy ovlivněné karyofylenem-oxidem po 24hodinové inkubaci vykazovaly snížení specifické aktivity BROD. Řezy ovlivněné β -karyofylenem a α -humulenem nevykazovaly žádnou změnu specifické aktivity BROD po 24hodinové inkubaci.

Tabulka 6- Specifická aktivita BROD v kontrolních a HUM, CAR a CAO ovlivněných vzorcích

	Specifická aktivita BROD (pmol/mg/min)			
	K	CAR	CAO	HUM
8 hod	0,098 \pm 0,011	0,076 \pm 0,001*	0,089 \pm 0,002	0,069 \pm 0,005*
24 hod	0,076 \pm 0,002	0,083 \pm 0,007	0,061 \pm 0,006*	0,073 \pm 0,006

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



Obrázek 17- Ovlivnění specifické aktivity BROD po 8 a 24hodinové inkubaci

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

4.2.2 Ovlivnění NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1

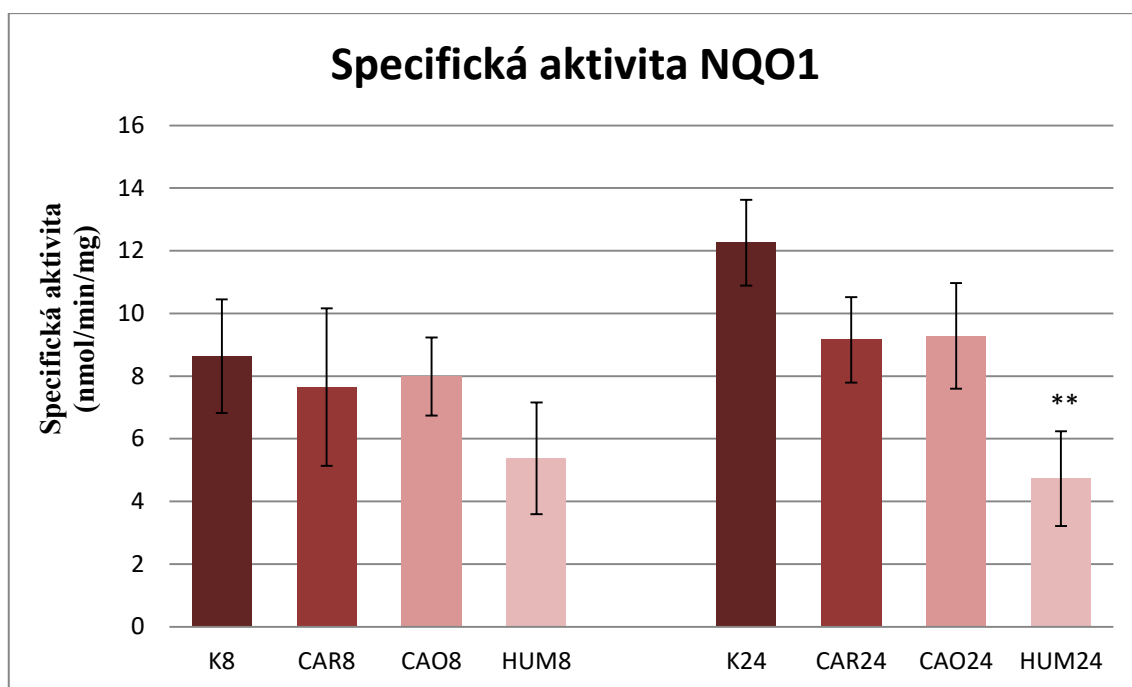
Řezy ovlivněné β -karyofylenem, humulenem a karyofylen-oxidem po 8hodinové inkubaci nevykazovaly žádnou statisticky významnou změnu specifické aktivity NQO1.

Řezy ovlivněné humulenem po 24hodinové inkubaci vykazovaly snížení specifické aktivity NQO1. Řezy ovlivněné β -karyofylenem a karyofylen-oxidem po 24hodinové inkubaci nevykazovaly žádnou změnu specifické aktivity NQO1.

Tabulka 7- Specifická aktivita NQO1 v kontrolních a HUM, CAR a CAO ovlivněných vzorcích

	Specifická aktivita NQO1 (nmol/mg/min)			
	K	CAR	CAO	HUM
8 hod	8,64±1,81	7,65±2,51	7,98±1,25	5,37±1,78
24 hod	12,26±1,37	9,16±1,37	9,29±1,68	4,73±1,52**

** Statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou (Studentův t-test, $p < 0,01$)



Obrázek 18- Specifická aktivita NQO1 po 8hodinové a 24hodinové inkubaci

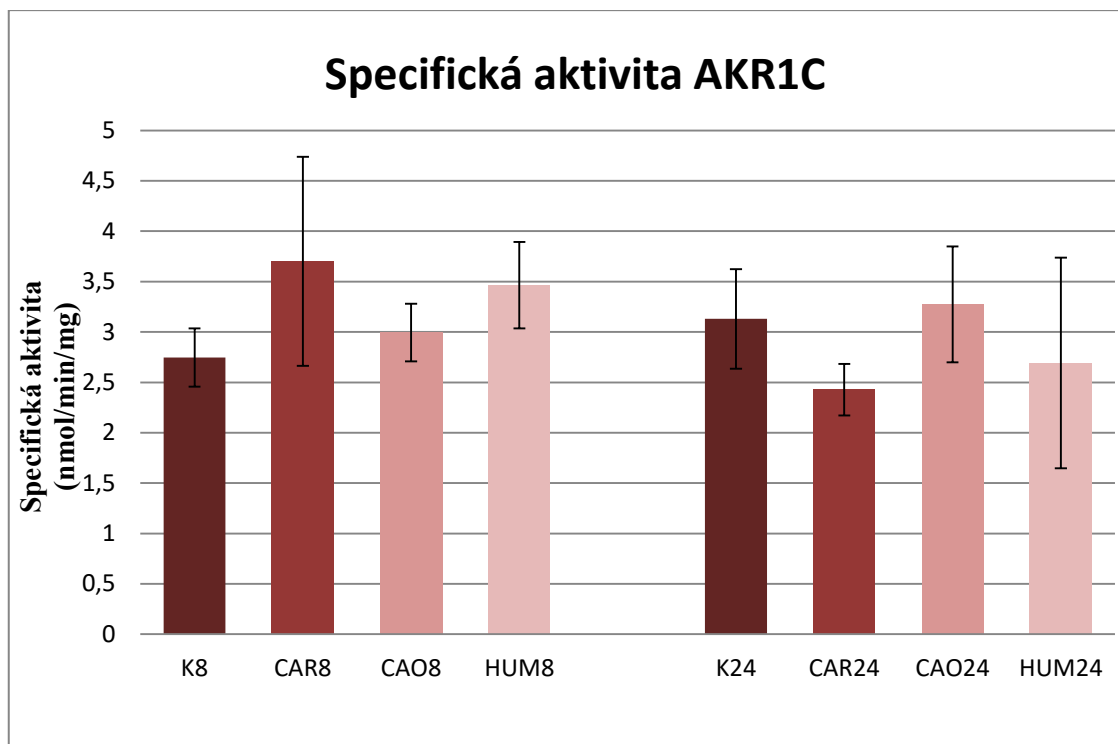
** Statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou (Studentův t-test, $p < 0,01$)

4.2.3 Ovlivnění aldoketoreduktasy

Řezy ovlivněné β -karyofylenem, humulenem a karyofylen-oxidem po 8hodinové inkubaci a řezy ovlivněné β -karyofylenem, humulenem a karyofylen-oxidem po 24hodinové inkubaci nevykazovaly žádnou změnu specifické aktivity AKR1C9.

Tabulka 8- Specifická aktivita AKR1C v kontrolních a HUM, CAR a CAO ovlivněných vzorcích

	Specifická aktivita AKR1C (nmol/mg/min)			
	K	CAR	CAO	HUM
8 hod	2,75±0,29	3,70±1,04	2,99±0,29	3,46±0,43
24 hod	3,13±0,49	2,43±0,26	3,27±0,58	2,69±1,05



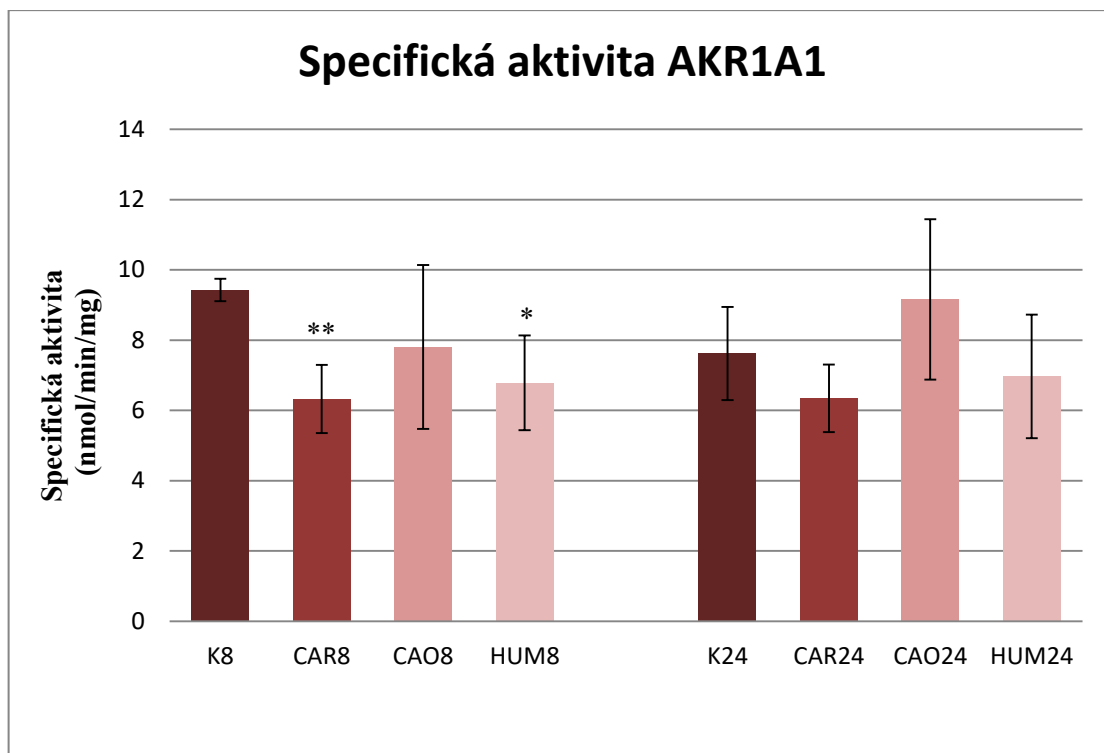
Obrázek 19- Ovlivnění specifické aktivity AKR1C

4.2.4 Ovlivnění aldehydreduktasy

Řezy ovlivněné β -karyofylenem a humulenem vykazovaly pokles specifické aktivity AKR1A1 po 8 hodinách inkubace. Řezy ovlivněné karyofylen-oxidem po 8 hodinách inkubace a řezy ovlivněné β -karyofylenem, humulenem a karyofylen-oxidem po 24hodinové inkubaci nevykazovaly žádnou změnu specifické aktivity AKR1A1.

Tabulka 9- Specifická aktivita AKR1A1 v kontrolních a HUM, CAR a CAO ovlivněných vzorcích

	Specifická aktivita AKR1A1 (nmol/mg/min)			
	K	CAR	CAO	HUM
8 hod	9,43±0,32	6,32±0,97**	7,81±2,33	6,79±1,35*
24 hod	7,62±1,33	6,35±0,96	9,16±2,28	6,97±1,76



Obrázek 20- Ovlivnění specifické aktivity AKR1A1

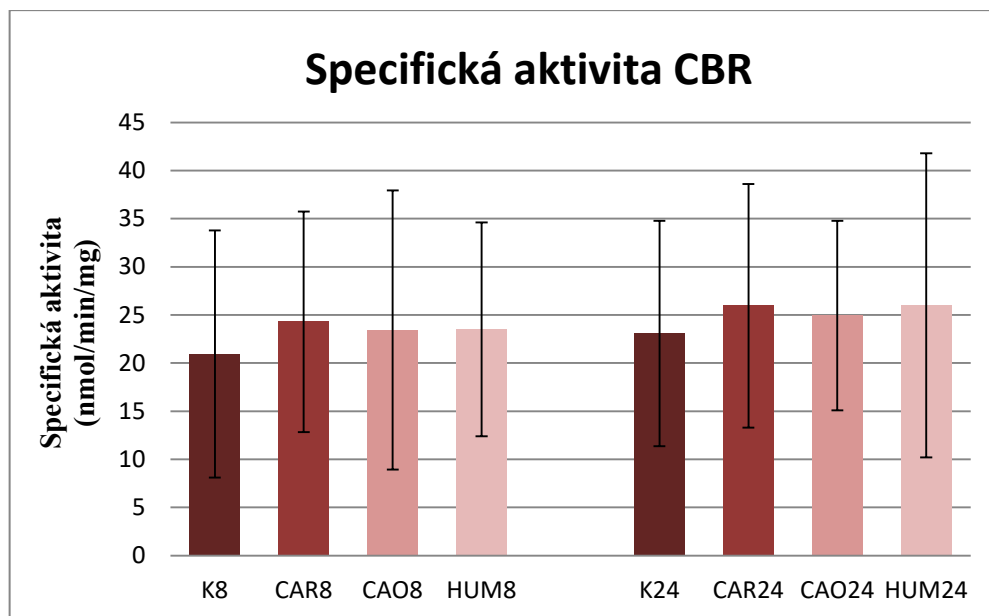
*Statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou (Studentův t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

4.2.5 Ovlivnění karbonylreduktasy

Řezy ovlivněné β -karyofylenem, α -humulenem a karyofylen-oxidem nevykazovaly žádnou změnu specifické aktivity CBR po 8hodinové inkubaci ani po 24hodinové inkubaci.

Tabulka 10- Specifická aktivita CBR v kontrolních a HUM, CAR a CAO ovlivněných vzorcích

	Specifická aktivita CBR (nmol/mg/min)			
	K	CAR	CAO	HUM
8 hod	20,95±6,42	24,29±5,73	23,43±7,25	23,50±5,56
24 hod	23,08±5,85	25,96±6,33	24,95±4,92	25,99±7,90



Obrázek 21- Specifická aktivita CBR po 8 a 24hodinové inkubaci

4.2.6 Ovlivnění UDP-glukuronosyltransferasy

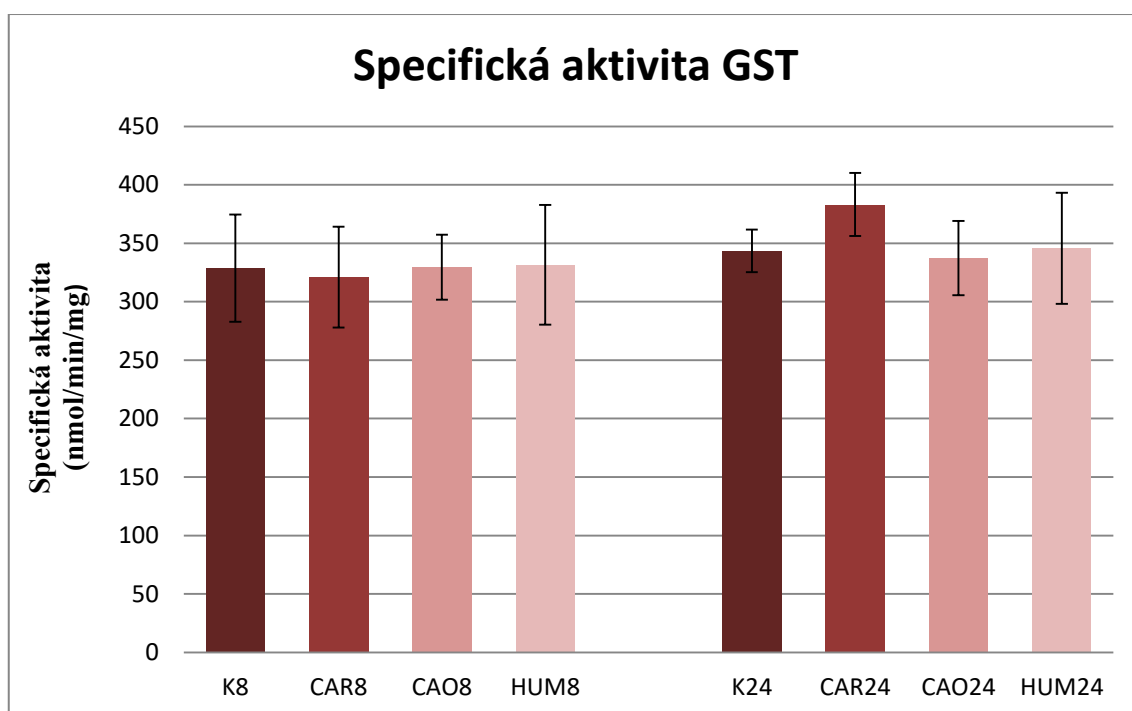
U tohoto enzymu proběhlo pouze jedno měření. Aktivita UGT nebyla nalezena. Rozhodli jsme se tedy nepokračovat v dalších měřeních. Z tohoto důvodu nejsou pro UDP-glukuronosyltransferasu dostupné výsledky.

4.2.7 Ovlivnění glutathion-S-transferasy

Řezy ovlivněné β -karyofylenem, humulenem a karyofylen-oxidem po 8hodinové inkubaci a řezy ovlivněné β -karyofylenem, humulenem a karyofylen-oxidem po 24hodinové inkubaci nevykazovaly žádnou změnu specifické aktivity GST.

Tabulka 11- Specifická aktivita GST v kontrolních a HUM, CAR a CAO ovlivněných vzorcích

	Specifická aktivita GST (nmol/mg/min)			
	K	CAR	CAO	HUM
8 hod	328,68±45,95	321,16±43,11	329,60±27,84	331,58±51,22
24 hod	343,52±18,20	383,19±26,94	337,32±31,79	345,60±47,50



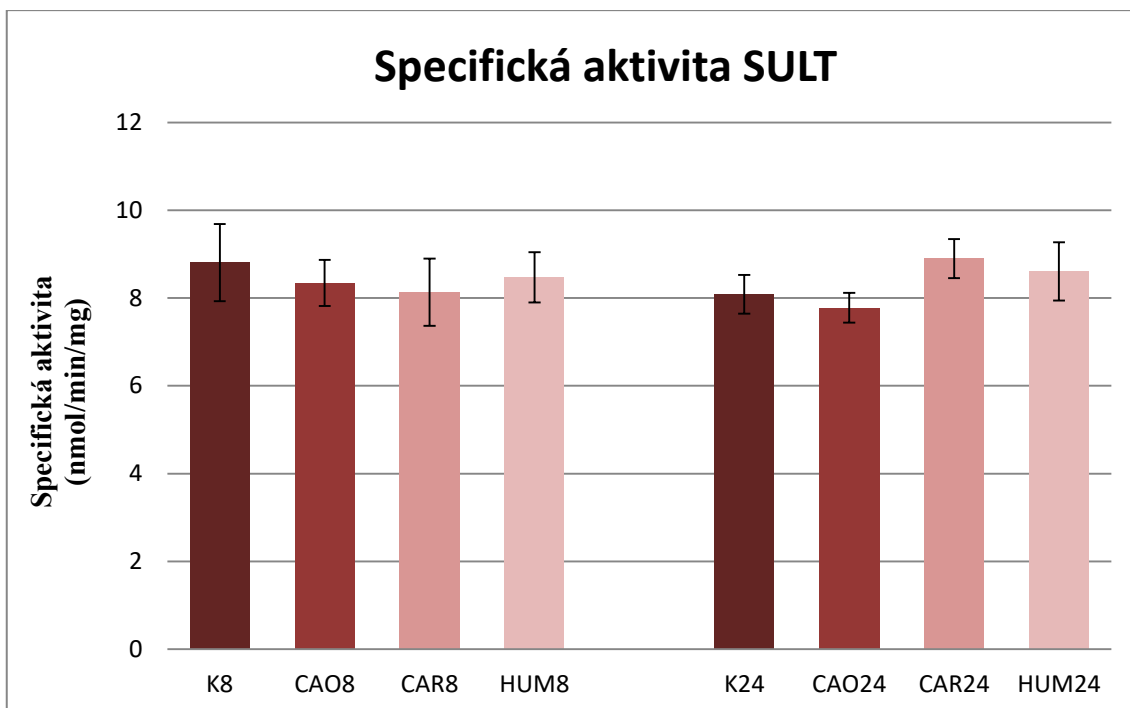
Obrázek 22- Ovlivnění specifické aktivity GST

4.2.8 Ovlivnění sulfotransferasy

Řezy ovlivněné β -karyofylenem a α -humulenem a karyofylen-oxidem nevykazovaly žádnou změnu specifické aktivity SULT po 8hodinové inkubaci ani po 24hodinové inkubaci.

Tabulka 12- Specifická aktivita SULT v kontrolních a HUM, CAR a CAO ovlivněných vzorcích

	Specifická aktivita SULT (nmol/mg/min)			
	K	CAR	CAO	HUM
8 hod	8,81±0,88	8,13±0,77	8,34±0,52	8,47±0,57
24 hod	8,09±0,44	8,90±0,45	7,78±0,34	8,61±0,66



Obrázek 23- Specifická aktivita SULT po 8 a 24hodinové inkubaci

5 Diskuze

V posledních letech se zvyšuje spotřeba potravních doplňků a také roste obliba rostlinné a alternativní medicíny. Tím se značně zvýšilo riziko interakcí s léčivými. Mnohé interakce již byly objeveny. Například vliv ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) na snížení účinku warfarinu. Dále třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*) jako známý induktor cytochromu P450 3A4. Zrychluje odbourávání některých antiepileptik, antipsychotik či kontracepcí. Dále jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba*) velmi často interaguje s léčivými, například s již zmíněným warfarinem.

Seskviterpeny jsou sekundární metabolity rostlin, kde tvoří významnou součást silic. Jsou produkovány všemi orgány rostliny a zajišťují její přežití. Mají mnoho pozitivních účinků. Například protizánětlivý, antibakteriální, antivirový, antifungální, protimutagenní, antidiabetický či antiprotozoální efekt. Mohou se chovat jako antioxidanty i oxidanty. Rostliny, v nichž jsou obsaženy, se často používají v lidové medicíně a jako koření. Bohužel je nedostatek informací o jejich vlivu na biotransformační enzymy. Je důležité tento vliv prozkoumat a zlepšit tak přehled o možných interakcích.

V této studii byl zkoumán vliv tří strukturně podobných cyklických seskviterpenů, α -humulenu, β -karyofylenu a karyofylen-oxidu na biotransformační enzymy v jaterních řezech potkana. Ty měly 8 mm v průměru a tloušťku 200-250 μ m. Řezy byly inkubovány se seskviterpeny po dobu 8 a 24 hodin. Zkoumané enzymy byly z I. i II. fáze biotransformace.

Na toto téma není velký počet studií. Ty, které existují, se liší ve výsledcích. Ve studii Nguyenové a kol. (2017) zkoumali inhibiční vliv α -humulenu, β -karyofylenu a karyofylen-oxidu na cytochrom P450 i další biotransformační enzymy v jaterních subcelulárních frakcích člověka a potkana. Byl zjištěn značný inhibiční vliv všech tří seskviterpenů na cytochrom P450 1A1/2 (EROD) a cytochrom P450 2B/3A (BROD). Dále byly zkoumány některé redukční a konjugační enzymy. Nebyla zaznamenána změna aktivity těchto enzymů.

Dále Lněničková a kol. (2017) se zabývali vlivem karyofylen-oxidu na biotransformační enzymy u myši *in vivo*. Zjistili vliv na cytochrom P450 2B (PROD) a cytochrom P450 2B/3A (BROD). Vliv na cytochrom P450 3A (EROD) nebyl

detekován. Dále byly opět zkoumány redukční enzymy. Žádná změna aktivity AKR1A1 ani AKR1C nebyla objevena. U CBR1/3 byla po 6 hodinách od podání aktivita lehce inhibována. U konjugačních enzymů SULT, GST a UGT také nebyla zaznamenána žádná změna aktivity.

Studie dos Santose a kol. (2015) se zabývala vlivem silice z *Piper tuberculatum* na cytochrom P450 1A1/2 (EROD) a cytochrom P450 2A (ECOD). Silice z této rostliny obsahuje až 13 % karyofylenu. Silice inhibovala aktivitu cytochromu P450 1A1/2 (EROD). Cytochrom P450 2A (ECOD) nebyl ovlivněn.

Zárybnický (2016) zkoumal vliv α -humulenu a β -karyofylenu na SULT, NQO1 a UGT v jaterních řezech potkana. HUM inhiboval NQO1 po 24 hodinách inkubace a SULT po 3 hodinách inkubace. SULT byl také inhibován CAR po 3 hodinách inkubace.

V této diplomové práci bylo také sledováno ovlivnění biotransformačních enzymů v jaterních řezech potkana. Došlo ke snížení aktivity AKR1A1, BROD a NQO1. Aktivita AKR1A1 byla inhibována CAR a HUM po 8 hodinách inkubace. Vliv CAR byl významnější než HUM. Specifická aktivita BROD byla snížena CAR a HUM po 8 hodinách inkubace a CAO po 24 hodinách inkubace. Aktivita NQO1 byla velmi významně snížena HUM po 24 hodinách inkubace. Na rozdíl od jiných studií nebyl zjištěn vliv na cytochrom P450 1A1/2 (EROD), ale byla zjištěna inhibice AKR1A1. Žádná ze zmíněných studií nezjistila vliv na AKR1C9 a UGT. Obecně lze říci, že všechny studované aktivity enzymů se buď neměnily, nebo se snížily.

Na toto téma neproběhlo mnoho studií, ale z dostupných informací lze usoudit, že seskviterpeny mají především inhibiční vliv na některé biotransformační enzymy. Studie se poměrně shodují v ovlivnění aktivity cytochromu P450 2B/3A (BROD). Dále existuje více výsledků pro cytochrom P450 1A1/2 (EROD) a NQO1. Lze tedy očekávat při užívání doplňků stravy s obsahem karyofylenu, karyofylen-oxidu či humulenu snížení aktivity cytochromu P450 2B/3A (BROD), cytochromu P450 1A1/1A2 (EROD) a NQO1. Vliv seskviterpenů na ostatní enzymy je nejednoznačný.

Je důležité si uvědomit, že každé měření je zatíženo chybami měření a že byly použity rozdílné modelové systémy. Také je důležité připomenout, že existují značné mezidruhové rozdíly mezi potkany a lidmi. Ovlivnění enzymů u lidí nemusí být stejné

jako u potkanů. Nicméně je důležité dál zkoumat interakce mezi přírodními látkami a enzymy a tím minimalizovat rizika a maximalizovat účinek farmakoterapií.

6 Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, zda mohou seskviterpeny α -humulen, β -karyofylen a β -karyofylen-oxid ovlivňovat aktivitu a expresi vybraných biotransformačních enzymů v jaterních řezech. K tomuto účelu byly vytvořeny potkaní tkáňové řezy o průměru 8 mm a průměrné tloušťce 200-250 μm . Kontrolní vzorky byly inkubovány bez seskviterpenů. Ostatní řezy byly inkubovány se seskviterpeny 8 a 24 hodin.

Byly zkoumány biotransformační enzymy cytochrom P450 1A1/2 (EROD), cytochrom P450 2B/3A (BROD), NQO1, AKR1A, AKR1C, CBR, SULT, GST a UGT. Výsledky ukázaly snížení aktivity AKR1A1, cytochromu P450 2B/3A (BROD) a NQO1. Největší ovlivnění aktivity bylo zaznamenáno u cytochromu P450 2B/3A (BROD). Jeho aktivita byla inhibována CAR a HUM po 8 hodinách inkubace a CAO po 24 hodinách inkubace. Dále byla aktivita AKR1A1 inhibována CAR a HUM po 8 hodinách inkubace. Vliv CAR byl významnější než HUM. Aktivita NQO1 byla inhibována HUM po 24 hodinách inkubace.

Seznam zkratek

AKR1A1 – aldehydreduktasa

AKR1C – aldoketoreduktasa

BROD - benzyloxyresorufin O-dearylasa

CAR - karyofylen

CAO – karyofylen-oxid

CBR – karbonylreduktasa

CYP – cytochrom

EROD – ethoxyresorufin-O-deethylasa

GST – glutathion-S-transferasa

HUM – humulen

ROS – reaktivní formy kyslíku

SULT – sulfotransferasa

UGT – UDP-glukuronosyltransferasa

Zdroje

Tištěné:

Alnouti Y., Klaassen C. D. (2006): Tissue Distribution and Ontogeny of Sulfotransferase Enzymes in Mice. *Toxicological Sciences* 93(2), 242–255

Alnouti Y., Klaassen C. D. (2007): Regulation of Sulfotransferase Enzymes by Prototypical Microsomal Enzyme Inducers in Mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Vol. 324, No. 2

Ambrož M., Boušová I., Skarka A., Hanušová V., Králová V., Matoušková P., Szotáková B., Skálová L. (2015): 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, 15343-15358

Androutsopoulos V. P., Tsatsakis A. M., Spandidos D. A. (2009): Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* 2009, 9:187

Anzenbacher P. a Anzenbacherová E. (2003): Cytochromes P450: Review on their Basic Principles. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. B69 No.6 pp 883-91

Barski O. A., Gabbay K. H., Bohren K. M. (1999): Characterization of the Human Aldehyde Reductase Gene and Promoter. *Genomics* 60, 188–198

Bartíková H., Hanušová V., Skálová L., Ambrož M. a Boušová I. (2014): Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, Vol. 14(21), 17 str.

Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012): Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan; 5(1): 9–19.

van Bladeren P. J. (2000): Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions* 129 (2000) 61–76

Bohren K. M., Bullock B., Wermuths B., Gabba K. H. (1989): The Aldo-Keto Reductase Superfamily, cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 264, No. 16, Issue of June 5, pp. 9547-955

Cullen J. J., Hinkhouse M. M., Grady M., Gaut A. W., Liu J., Zhang Y. P., Weydert Ch. J. D., Domann F. E., Oberley L. W. (2003): Dicumarol Inhibition of NADPH:Quinone Oxidoreductase Induces Growth Inhibition of Pancreatic Cancer via a Superoxide-mediated Mechanism. *Cancer research* 63, 5513–5520.

Červenková K., Belejová M., Veselý J., Chmela Z., Rypka M., Ulrichová J., Modrianský M. a Maure P. (2001): Cell suspensions, cell cultures, and tissue slices - important metabolic in vitro systems. *Biomedical Papers*. 2001-12-1, roc. 145, c. 2,

Dragovic S., Venkataraman H., Begheijn S., Vermeulen N. P., Commandeur J. N. (2014): Effect of human glutathione S-transferase hGSTP1-1 polymorphism on the detoxification of reactive metabolites of clozapine, diclofenac and acetaminophen. *Toxicology Letters*, 2014 Jan 13;224(2):272-81

Faig M., Bianchet M. A., Talalay P., Chen S., Winski S., Ross D., Amzel L. M. (2000): Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H: quinone oxidoreductases: Species comparison and structural changes with substrate binding and release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97 u no. 7 u 3177–3182

Fernandes E. S., Passos G. F., Medeiros R., Da Cunha F. M., Ferreira J., Campos M. M., Pianowski L. F., Calixto J. B.(2007): Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*. 2007, roč. 569, č. 3, s. 228-236. ISSN 00142999

Fisher R. L., Vickers A. E. M. (2013): Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica*, 2013; 43(1): 8–14 © 2013 Informa UK, Ltd.

Gregus Z., Waticins J. B., Thompson T. N., Harvey M. J., Rozman K., Klaassen C. D. (1983): Hepatic Phase I and Phase II Biotransformations in Quail and Trout: Comparison to Other Species Commonly Used in Toxicity Testing. *Toxicology and applied pharmacology* 67, 430-44 1

Chadwick M., Trewin H., Gawthrop F. a Wagstaff C. (2013): Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People, Swindon, UK, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 12780-12805

Jaiswal A. K. (2000): Regulation of genes encoding NAD(P)H:Quinone oxidoreductases. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 29, Nos. 3/4, pp. 254–262

Janiček T. (2017): Účinek vybraných seskviterpenů na antioxidační enzymy u buněčné linie CACO-2. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 86 stran.

de Kanter R., Monshouwer M., Meijer D. K., Groothuis G. M. (2002): Precision-Cut Organ Slices as a Tool to Study Toxicity and Metabolism of Xenobiotics with Special Reference to Non-Hepatic Tissues. *Current drug metabolism*. 2002, c. 3, s. 39-59. ISSN 1875-5453.

Keller B., Volkmann A., Wilckens T., Moeller G., Adamski J. (2006): Bioinformatic identification and characterization of new members of short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248 (2006) 56–60

Ketterer B., Coles B., Meyer D. J. (1983): The Role of Glutathione in Detoxication. *Environmental Health Perspectives*, Vol 49, pp. 59-69

Kianga T. K. L., Ensoma M. H. H., Chang T. K. H. (2005): UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacology & Therapeutics* 106 (2005) 97 – 132

Komura H., Iwaki M. (2011): REVIEW ARTICLE: In vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species differences. *Drug Metabolism Reviews*, 2011; 43(4): 476–498 © 2011 Informa Healthcare USA, Inc.

Lake B. G., R. J. Price (2013): Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica*. 2013, roc. 43, c. 1, s. 41-53. ISSN 0049-8254

Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2011): *Biochemie pro studující medicíny 1.díl*, Vyd. 2. V Praze: Karolinum 2009, 269 str. ISBN 9788024614168.

Lee W-L., Huang J-Y., Shyur L-F. (2013): Phytoagents for Cancer Management: Regulation of Nucleic Acid Oxidation, ROS, and Related Mechanisms. Hindawi Publishing Corporation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2013, Article ID 925804, 22 pages

Letelier M. E., Pimentel A., Pino P., Lepe A. M., Fau'ndezl M., Aracena P., Speisky H. (2005): Microsomal UDP-Glucuronyltransferase in Rat Liver: oxidative activation. *Basic and clinical pharmacology and toxicology* 96(6), 480-486

Lewis D. F. V. (2000): On the Recognition of Mammalian Microsomal Cytochrome P450 Substrates and Their Characteristics. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 60, pp. 293–306

Lněničková K., Svobodová H., Skálová L., Ambrož M., Novák F., Matoušková P. (2017): The Impact of Sesquiterpenes β -caryophyllene Oxide and transnerolidol on Xenobiotic-metabolizing Enzymes in Mice in vivo, *Xenobiotica*

Lu S. C. (2013): Review: Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3143–3153

Malátková P., Maser E., Wsól V. (2010): Human Carbonyl Reductases. *Current Drug Metabolism*, 2010, 11, 639-658

McMurry J. (2004): *Organic chemistry*: 6th ed. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole a Cengage Learning company, ISBN 978-0-8400-5453-1

Nebert Daniel W., Vasiliou V. (2004): Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics* 1: 460-464

Nebert D. W., Dalton T. P., Okey A. B., Gonzalez F. J. (2004): Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental

Toxicity and Cancer. *The Journal of biological chemistry* Vol. 279, No. 23, Issue of June 4, pp. 23847–23850

Negishi M., Pedersen L. G., Petrotchenko E., Shevtsov S., Gorokhov A., Kakuta Y., Pedersen L. C. (2001): Structure and Function of Sulfotransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , Vol. 390, No. 2, June 15, pp. 149±157

Nguyenová L. T., Myslivečková Z., Szotáková B., Špičáková A., Lněničková K., Ambrož M., Kubíček V., Krasulová K., Anzenbacher P., Skálová L. (2017): 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* 278, 123-128

Oda S., Fujinuma K., Inoue A., Ohashi S. (2011): Synthesis of (–)- β -caryophyllene oxide via regio- and stereoselective endocyclic epoxidation of β -caryophyllene with *Nemania aenea* SF 10099-1 in a liquid–liquid interface bioreactor (L–L IBR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 112 No. 6, 561-565

Omiecinski C. J., Heuvel J. P. V., Perdew G. H., Peters J. M. (2010): Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicological Sciences* 120(S1), S49–S75 (2011)

Palackal N. T., Burczynski M. E., Harvey R. G., Penning T. M. (2001): Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1). *Chemico-Biological Interactions* 130–13, 815–824

Penning T. M. (1993): Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism, *Chemico-Biological Interactions*, 89, str. 1-34

dos Santos P. R. D., Pereira F. G., Freitas J. C. M., dos Santos N. M., Farinelle C. de A., de Salles J. B., Medeiros E. von S. de S., Guimarães E. F., Auxiliadora M. K. C. (2015): Effect of Essential Oil of *Piper tuberculatum* var. minus C.DC. Leaves on the Hepatic Microsomal 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) and 7-Ethoxycoumarin ODeethylase (ECOD) Activity in Rats, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18:2, 329-334

Sheenan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. (2001): review article: Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, (2001) 360, 1±16

Sherratt P. J., Hayes J. D. (2002): Glutathione S-transferases. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. *New York: J. Wiley*, chapter 9

Skálová L., Boušová L. (2011): *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Vyd.1., Praha: Karolinum, 160 stran

Steenackers B., Cooman L. D., de Vos D. (2015): Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry* 172 (2015) 742-756

Szotáková B., Baliharová V., Lamka J., Nožinová E., Wsól V., Velík J., Machala M., Neča J., Souček P., Šusová S., Skálová L. (2004): Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. *Research in Veterinary Science* 76 (2004) 43a

Szotáková B., Bartíková H., Hlaváčová J., Boušová I. a Skálová L. (2013): Inhibitory effect of anthocyanidins on hepatic glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase and carbonyl reductase activities in rat and human. *Xenobiotica*, 2013; 43(8): 679–685, 2013 Informa UK Ltd.

Williams P. A., Cosme J., Sridhar V., Johnson E. F., McRee D. E. (2000): Mammalian Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenase: Structural Adaptations for Membrane Binding and Functional Diversity. *Molecular Cell*, Vol. 5, 121–131

Zajdlová M. (2016): Působení trans-nerolidolu a valencenu na ovariální nádorové buňky. Diplomová práce. Katedra biochem. věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 63 stran.

Zanger U. M., Schwab M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138 (2013) 103–141

Zárybnický T. (2016): Účinek seskviterpenů na biotransformační enzymy v tkáňových řezech. Diplomová práce. Katedra biochem. věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 67

Elektronické :

www.mojechemie.cz- [online]. [cit. 2017-11-19]. Dostupné z:

<http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Isoprenoidy>

http://www.chemicalbook.com- [online]. [cit. 2017-11-21]. Dostupné z

http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5454741.htm

www. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov- [online]. [cit. 2017-12-13]. Dostupné z

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caryophyllene_oxide#section=Top

ZDROJE OBRÁZKŮ

1. Obr. 1: Sigma-Aldrich [cit. 2017-12-13]. Dostupné z:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/53675?lang=en®ion=CZ>
2. Obr. 2: Sigma-Aldrich [cit. 2017-12-19]. Dostupné z:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9653?lang=en®ion=CZ>
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/218340?lang=en®ion=CZ>
3. Obr.3: Wikipedia [cit. 2018-02-12]. Dostupné z:
<https://en.wikipedia.org/wiki/>
4. Obr.4: Wikipedia [cit. 2018-02-12]. Dostupné z:
[https://en.wikipedia.org/wiki/NAD\(P\)H_dehydrogenase_\(quinone_1\)](https://en.wikipedia.org/wiki/NAD(P)H_dehydrogenase_(quinone_1))
5. Obr.5: Wikipedia [cit. 2018-02-12]. Dostupné z:
<https://en.wikipedia.org/wiki/AKR1C1>
6. Obr.6: Wikipedia [cit. 2018-02-12]. Dostupné z:
https://en.wikipedia.org/wiki/Aldo-keto_reductase_family_1,_member_A1
7. Obr.7: Wikipedia [cit. 2018-02-12]. Dostupné z:
[https://en.wikipedia.org/wiki/Carbonyl_reductase_\(NADPH\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Carbonyl_reductase_(NADPH))
8. Obr.8: Wikipedia [cit. 2018-02-12]. Dostupné z:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Glucuronosyltransferase>
9. Obr. 9: Wikipedia [cit. 2018-02-12]. Dostupné z:
<https://cs.wikipedia.org/wiki/Glutathion-S-transfer%C3%A1za>
10. Obr.10: Wikipedia [cit. 2018-02-12]. Dostupné z:
https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfotransferase#/media/File:Sulfotransferase_SULT1A3.png
11. Obr.14: Yetunde A. O. , Isaac O. A., Joseph A. A., Adeyinka A. (2015): Some novel features of glutathione transferase from juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to lindane-contaminated water. *Perspectives in Science* 4, 62–65
12. Obr.15: Frame L. T., Ozawa S., Nowell S. A., Chou H. C., De Longchamp R. R., Doerge D. R., Lang N. P., Kadlubar F. F. (2000): A simple colorimetric assay for phenotyping the major human thermostable phenol sulfotransferase (SULT1A1) using platelet cytosols., *Drug metabolism and disposition*, roč. 28, č. 9, s. 1063-1068