

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**Vliv monoterpenu citralu na expresi
detoxikačních enzymů v HepaRG buňkách**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Iva Boušová, PhD.

Konzultantka: Mgr. Michaela Šadibolová

Hradec Králové 2020

Bc. Tereza Švábová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup při vypracovávání této diplomové práce. Mé poděkování patří také všem pracovníkům z katedry biochemických věd, kteří mi jakýmkoli způsobem pomohli při řešení experimentální práce, zejména Mgr. Michaele Šadibolové, která mi pomohla s metodikou a zpracováním výsledků. Dále bych chtěla poděkovat grantové agentuře za finanční podporu (Grantová agentura České republiky, grant č. 18-09946S).

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

V Hradci Králové 5. května 2020

Bc. Tereza Šváblová

OBSAH

Obsah	4
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Terpenoidy	10
2.1.1 Monoterpeny	10
2.1.1.1 Citral	11
2.1.2 Hepatotoxicita	14
2.2 Detoxikační enzymy	16
2.2.1 Biotransformační enzymy	16
2.2.1.1 Cytochromy P450	16
CYP1A2	18
CYP2B6	18
CYP2C9	20
CYP3A4	21
2.2.1.2 Další vybrané biotransformační enzymy	22
AKR1C	22
CBR1	23
2.2.2 Antioxidační enzymy	24
Superoxiddismutasa	24
Katalasa	25
Glutathionperoxidasa	26
Glutathion-S-transferasa	27
Glutathionreduktasa	28
3. CÍL PRÁCE	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1 Použité přístroje a pomůcky	31

4.2	Použité chemikálie a roztoky	32
4.3	Buněčná linie	34
4.3.1	Příprava kultivačních médií	34
4.3.1.1	Růstové médium	34
4.3.1.2	Diferenciační médium	34
4.3.2	Rozmrazování buněk	34
4.3.3	Počítání buněk v Bürkerově komůrce	35
4.3.4	Pasážování buněk	36
4.3.5	Nasazení buněk	38
4.4	Studium cytotoxicity	38
4.4.1	Neutral red uptake test	39
4.4.1.1	Použité roztoky a postup NRU	39
4.5	Ovlivnění buněk pro Western blotting a qRT-PCR analýzu	40
4.6	Stanovení genové exprese	41
4.6.1	Izolace RNA Trizolem	41
4.6.2	Měření koncentrace a čistoty RNA na NanoDropu	42
4.6.3	Ošetření DNAsou	43
4.6.3.1	Příprava roztoků pro ošetření DNAsou a postup	43
4.6.4	Reverzní transkripce	44
4.6.4.1	Použité reagentie a postup	44
4.6.5	Kvantitativní PCR v reálném čase	45
4.6.5.1	Reagentie pro kvantitativní PCR v reálném čase a postup	45
4.7	Stanovení proteinové exprese	46
4.7.1	Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blotting	47
4.7.1.1	Zásobní roztoky pro ředění vzorků	47
4.7.2	BCA stanovení bílkoviny	48
4.7.2.1	Příprava roztoků a kalibrační přímka	48
4.7.3	Elektroforéza a Western blotting	49
4.7.3.1	Zásobní roztoky pro elektroforézu proteinů na polyakrylamidovém gelu	49
4.7.3.2	Příprava gelu	50
4.7.3.3	Denaturující elektroforéza	51
4.7.4	Imunoblotting	52
4.7.4.1	Zásobní roztok na imunoblotting a postup	52
4.7.5	Detekce proteinů	53

4.8	Statistická analýza	55
5.	VÝSLEDKY	56
5.1	Buněčná viabilita – NRU test	56
5.2	Vliv citralu na expresi mRNA	57
5.2.1	Vliv citralu na genovou expresi CYP1A2	57
5.2.2	Vliv citralu na genovou expresi CYP2B6	58
5.2.3	Vliv citralu na genovou expresi CYP2C	59
5.2.4	Vliv citralu na genovou expresi CYP3A4	60
5.2.5	Vliv citralu na genovou expresi AKR1C	61
5.2.6	Vliv citralu na genovou expresi CBR1	62
5.2.7	Vliv citralu na genovou expresi SOD	63
5.2.8	Vliv citralu na genovou expresi CAT	64
5.2.9	Vliv citralu na genovou expresi GPX1	65
5.2.10	Vliv citralu na genovou expresi GPX4	66
5.2.11	Vliv citralu na genovou expresi GSTA	67
5.2.12	Vliv citralu na genovou expresi GSTP	68
5.2.13	Vliv citralu na genovou expresi GR	69
5.3	Vliv citralu na proteinovou expresi	70
5.3.1	Vliv citralu na proteinovou expresi CYP2C9	70
5.3.2	Vliv citralu na proteinovou expresi CYP3A4	72
5.3.3	Vliv citralu na proteinovou expresi AKR1C3	74
5.3.4	Vliv citralu na proteinovou expresi CBR1	76
6.	DISKUSE	79
7.	ZÁVĚR	84
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	85
9.	POUŽITÁ LITERATURA	87

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Uchazeč: Bc. Tereza Švábová

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

Konzultant: Mgr. Michaela Šadibolová

Název diplomové práce: Vliv monoterpenu citralu na expresi detoxikačních enzymů v HepaRG buňkách

Citral je acyklický monoterpen, který je produkován především vyššími rostlinami. Je jedním z mnoha sekundárních metabolitů, které slouží rostlině jako detoxikační faktory, morforegulátory, atraktanty pro opylovače nebo obranné látky. Mimo jiné má řadu pozitivních účinků např. antibakteriální, protizánětlivé nebo protinádorové, ale při nesprávném použití může být toxický, zejména pro játra. Cílem této diplomové práce bylo zjistit účinek citralu na vybrané biotransformační a antioxidantní enzymy v HepaRG buňkách. Diferencované HepaRG buňky byly inkubovány s 10 μM rifampicinem, 10 μM β -naftoflavonem, 30 μM oltiprazem, 10 μM citralem, 30 μM citralem a 100 μM citralem 12 a 24 hodin pro stanovení exprese mRNA a 24 a 48 hodin pro stanovení proteinové exprese. Na úrovni mRNA rifampicin indukoval CYP3A4 při 12 i 24hodinové inkubaci, β -naftoflavon indukoval CYP1A2 při 12 i 24hodinové inkubaci a aldo-ketoreduktasu (AKR1C) při 24hodinové inkubaci, oltipraz indukoval glutathionperoxidasu (GPX1) při 12 i 24hodinové inkubaci. Po ovlivnění citralem byla genová exprese některých enzymů rovněž změněna, 30 μM citral při 12hodinové inkubaci inhiboval karbonylreduktasu (CBR1), 100 μM citral při 12hodinové inkubaci indukoval GPX1 a glutathionreduktasu (GR), 100 μM citral při 24hodinové inkubaci indukoval CYP3A4, CYP2B6 a glutathion-S-transferasu (GSTA). Při stanovení proteinové exprese CYP3A4 došlo k indukci rifampicinem při 24 i 48hodinové inkubaci a inhibici 10 μM citralem při 24hodinové inkubaci. U 100 μM citralu při 48hodinové inkubaci byla zaznamenána indukce CYP2C9 a výrazná inhibice CBR1 a AKR1C3. Dále byla studována cytotoxicita citralu pomocí testu neutrální červení (NRU). Hodnota IC_{50} byla 0.892 mM při 48hodinové inkubaci a 0.708 mM při 72hodinové inkubaci.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Tereza Švábová

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

Consultant: Mgr. Michaela Šadibolová

Title of diploma thesis: Effect of monoterpene citral on the expression of detoxification enzymes in HepaRG cells

Citral is an acyclic monoterpene, which is mainly produced by higher plants. It is one of the many secondary metabolites, which serve the plant as detoxifying factors, morphoregulators and attractants for pollinators or defense substances. Besides other things, it has numerous positive effects such as antibacterial, anti-inflammatory or antitumor, but it may be toxic, especially for the liver, if used incorrectly. The main goal of this thesis was to find out the effect of citral on selected biotransformation and antioxidant enzymes in HepaRG cells. Differentiated HepaRG cells were incubated with 10 μM rifampicin, 10 μM β -naphthoflavone, 30 μM oltipraz, 10 μM citral, 30 μM citral and 100 μM citral for mRNA expression detection for 12 and 24 hours and for protein expression evaluation for 24 and 48 hours. At the mRNA level, rifampicin induced CYP3A4 at 12- and 24-h incubation, β -naphthoflavone induced CYP1A2 at 12- and 24-h incubation and aldo-ketoreductase (AKR1C) at 24-h incubation, oltipraz induced glutathione peroxidase (GPX1) at 12- and 24-h incubation. Following citral treatment, gene expression of some enzymes was changed as well, 30 μM citral inhibited carbonyl reductase (CBR1 at 12-h) incubation, 100 μM citral induced GPX1 and glutathione reductase (GR) at 12-hour incubation, 100 μM citral induced CYP3A4, CYP2B6 and glutathione-S-transferase (GSTA) at 24-h incubation. At the protein level, rifampicin induced CYP3A4 at 24- and 48-h incubation and 10 μM citral inhibited CYP3A4 at 24-h incubations. Moreover, 100 μM citral induced CYP2C9 and significantly inhibited carbonyl reductase (CBR1) and aldo-ketoreductase (AKR1C3) at 48-h incubations. Furthermore, the cytotoxicity of citral was studied using Neutral Red Uptake (NRU) assay. The IC_{50} value was 0.892 mM at 48-h incubation and 0.708 mM at 72-h incubation.

1. ÚVOD

V posledních desetiletích se výrazně zvýšil veřejný zájem o přírodní terapie a také celosvětová spotřeba bylin a rostlinných produktů. Nevhodné použití přírodních látek může mít však až fatální následky, jelikož je pacienti pokládají za bezpečné a svým lékařům často nehlásí nežádoucí účinky. Příkladem je požití velkého množství silice Poleje obecné (*Mentha pulegium*), obsahující monoterpen pulegon, obvykle používané k léčbě dyspepsie nebo bolestem při menstruaci, které vedlo k poškození jater (Zárybnický et al., 2018a).

Játra jsou často cílovou tkání xenobiotik, které se do nich dostávají skrze *vena portae* ve vysoké koncentraci, jelikož jsou místem detoxikace a eliminace látek, čímž chrání další orgány. Většina z terpenů snadno vstupuje do lidského těla, a to zejména perorální absorpcí, kůží nebo inhalací. Některé monoterpeny (např. pulegon, menthofuran, kafr, limonen) a seskviterpeny (např. zederon, germakron) tvoří reaktivní metabolity, zvyšují koncentraci reaktivních forem kyslíku a narušují antioxidační obranu, což se projevuje právě jaterní toxicitou. Každý rok je hlášeno mnoho případů poškození jater vyvolané bylinnými doplňky. Jediným způsobem, jak snížit riziko poškození jater způsobené výrobky obsahujícími terpeny, je věnovat jim více pozornosti, pochopit jejich metabolismus a mechanismy účinku v játrech (Zárybnický et al., 2018b).

Cílem této diplomové práce bylo zjistit účinek monoterpenu citralu na vybrané biotransformační a antioxidační enzymy v HepaRG buňkách, které byly vybrány pro sledování genové a proteinové exprese biotransformačních enzymů, jelikož nesou vlastnosti časných jaterních progenitorových buněk i zralých hepatocytů (web 1). Dále byla sledována cytotoxicita citralu na HepaRG buňky pomocí testu neutrální červení.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Terpenoidy

Rostliny produkují celou řadu sekundárních metabolitů, z nichž mnohé jsou využívány pro jejich pozitivní účinky. Velká skupina těchto sekundárních metabolitů, pro kterou se používá název terpenoidy či isoprenoidy, je tvořena ze dvou a více isoprenových jednotek. Podle počtu isoprenových jednotek, a tedy i uhlíkových atomů, se dělí na hemiterpeny (1 isoprenová jednotka, např. isopren), monoterpeny (2 isoprenové jednotky, např. myrcen, limonen, α -pinen, β -pinen), seskviterpeny (3 isoprenové jednotky, např. zerumbon, α -humulen), diterpeny (4 isoprenové jednotky, např. retinol), sesterterpeny (5 isoprenových jednotek, např. genepolid), triterpeny (6 isoprenových jednotek, např. skvalen, betulin), tetraterpeny (8 isoprenových jednotek, např. β -karoten) a polyterpeny (mnoho isoprenových jednotek, např. poly- α -pinen). Zvláštní skupinu tvoří tetracycké triterpeny *steroidy* (Klouda, 2013).

Terpenoidy jsou vysoce rozmanité látky, a to především díky řadě funkčních skupin připojených ke skeletu. Můžeme je rozdělit na uhlovodíky (limonen), alkoholy (mentol, geraniol, fytol), kyseliny a estery (geranylacetát), aldehydy (citrál) nebo ketony (karvon) (Wagner a Elmadfa, 2003; Klouda, 2013).

Dále popíši pouze skupinu monoterpenů, protože jsem v experimentální části této práce pracovala s monoterpenem citralem.

2.1.1 Monoterpeny

Monoterpeny jsou acyklické, monocyklické či bicyklické desetiuhlíkaté isoprenoidy. Tyto přírodní produkty mají charakteristickou vůni, uplatňují se v regulaci růstu, reprodukčním cyklu, obranných mechanismech a přenosu signálů různých organismů (Singer et al., 2003). Vyskytují se ve všech organismech, ale syntetizovat je mohou pouze rostliny, bakterie a některé druhy hmyzu. Nedávno byla zjištěna produkce monoterpenů také mořským fytoplanktonem. Do vyšších organismů se dostávají pomocí potravního řetězce (Yassaa et al., 2008).

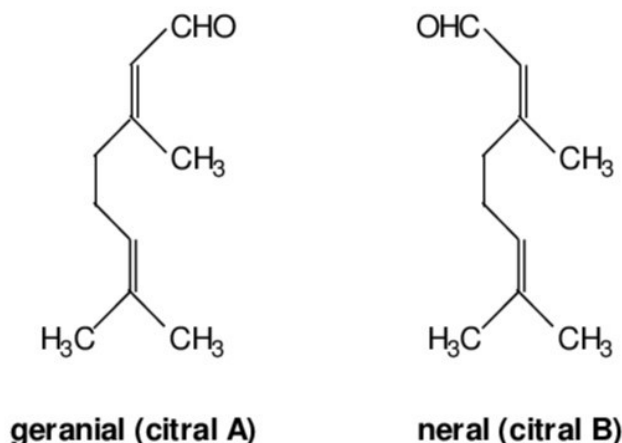
Monoterpeny jsou považovány za sekundární metabolity rostlin, což jsou látky, které nemají roli v základních rostlinných procesech (rostlina je produkuje, aniž by je využívala jako zdroj energie nebo zásobní látky). Sekundární metabolity slouží rostlině

jako detoxikační faktory, morforegulátory, atraktanty pro opylovače nebo obranné látky. Jsou významné především tím, že zprostředkovávají interakce mezi rostlinou a prostředím, zajišťují komunikaci mezi rostlinami, chrání rostlinu před vysycháním, napadením škůdci či lákají opylující hmyz (Zulak a Bohlmann, 2010). Význam mají monoterpeny i pro vyšší organismy, lidmi jsou využívány v potravinářství, kosmetice a farmacii pro své aroma nebo jako insekticidy a herbicidy pro svou toxicitu. Díky jejich protinádorovým či antibakteriálním účinkům je řadíme mezi takzvané „bioaktivní sloučeniny“ (Mahmoud a Croteau, 2002).

Mezi monoterpeny patří např. geraniol, voňavý terpen obsažený v eukalyptovém a růžovém oleji, myrcen obsažený ve vavřínové silici, citral, který vzniká mírnou oxidací geraniolu, dále limonen, mentol, karvon a pineny, což jsou bicyklické terpeny odvozené od pinanu a jsou obsaženy v terpentýnovém oleji, bornan, borneol nebo kafr, který se nachází v silicích mnoha rostlin, zvláště východoasijského stromu kastrovníku lékařského (*Cinnamomum camphora*, Lauraceae) a používá se jako plastifikátor při výrobě celuloidu (Klouda, 2013).

2.1.1.1 Citral

Citral (neboli lemonal, systematický název 3,7-dimethylokta-2,6-dienal) je monoterpen se sumárním vzorcem $C_{10}H_{16}O$. Označení se používá jako souhrnný název dvou isomerů (Obr. 1) nebo jejich směsi. Isomer E je znám jako geranial (citral A), isomer Z jako neral (citral B) (Mutalik et al., 2009).



Obrázek 1 – Ukázka dvou isomerů: geranial (citral A) a neral (citral B), zdroj: Villalobos, 2015

Citral je obsažen v silicích řady rostlin, jako je například myrtovník citronový (*Backhousia citriodora*, Myrtaceae: 90–98 %), vavřín kubébový (*Litsea cubeba*, Lauraceae: 70–85 %) *Litsea citrata* (90 %), voňatka citronová (*Cymbopogon citratus*, Poaceae: 65–85 %), *Leptospermum liversidgei* (Myrtaceae: 70–80 %), bazalka vytrvalá (*Ocimum gratissimum*, Lamiaceae: 66,5 %), *Lindera citriodora* (Lauraceae: 65 %), *Calyptanthes parriculata* (Myrtaceae: 62 %), citroník pomerančový hořký (*Citrus aurantium*, Rutaceae: 36 %), aloisie trojlístá (*Aloysia triphylla*, Verbenaceae: 30–35 %), *Eucalyptus staigeriana* (Myrtaceae: 26 %), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*, Lamiaceae: 11 %), ale také např. v limetce (6–9 %), citronu (2–5 %) a pomeranči (Lawless, 1995; Burdock, 2010).

Geraniol má silnou citronovou vůni, neral trochu méně intenzivní, ale sladší. Citral se proto používá jako aromatická složka v parfémtech, ale také jako ochucovadlo a konzervační činidlo. Působí jako feromon pro hmyz a je vysoce ceněn pro své protizánětlivé, protiplísňové, protinádorové, antibakteriální a antipyretické účinky (Onawunmi, 1989; Robacker et al., 1977; Emílio-Silva et al., 2017; Tang et al., 2018a).

Tang et al. (2018b) ve své studii prokázali vynikající antimykotické účinky sloučenin silice geraniolu a citralu proti běžným zrnitým patogenům (*Aspergillus flavus* a *Aspergillus ochraceus*) *in vitro* a *in situ*. Citral projevoval antifungální aktivitu hlavně snížením regulace sporulačních a růstových genů pro oba patogeny. Geraniol vykazoval inhibiční účinnost proti *A. flavus* převážně indukci intracelulární akumulace reaktivních forem kyslíku (ROS) a toxické účinky proti *A. ochraceus* hlavně změnou permeability buněčné membrány. Silice mají potenciál stát se novými konzervačními prostředky pro další použití (Tang et al., 2018b). Dále citral vykazoval cytotoxicitu proti *Penicillium italicum* ovlivněním mitochondriální dysfunkce, poškozením membrán a inhibicí biosyntézy ergosterolu. Kombinace citralu a cinnamaldehydu vysoce potlačila růst *Penicillium expansum* a produkci jeho toxinu patulinu oxidačním poškozením a potlačením biosyntetické dráhy patulinu (Wang et al., 2019).

Jiné studie ukázaly, že citral má dobrý antibakteriální účinek proti methicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro*. U myši infikovaných MRSA byla zkoumána anti-MRSA aktivita a předběžný mechanismus účinku citralu proti MRSA. Citral významně snížil hladinu některých prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF- α) a oxidačních faktorů (malondialdehyd a hydroxylové radikály) u myši infikovaných MRSA a zároveň zvýšil hladiny glutathionu

a superoxiddismutasy. Citral může redukovat plicní zánětlivé infiltráty infikované MRSA, zmírnit abnormální zánětlivé změny a oxidační stres. Citral je tedy nadějnou látkou pro vývoj nového léčiva proti MRSA (Long et al., 2019).

Silice z odrůdy citronové trávy *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass oil, LO) se používá v různých potravinářských a aromatických výrobcích a vykazuje protirakovinné a antimikrobiální aktivity. U potkanů byly zkoumány účinky dvou různých dávek LO (200 LO – 200 mg/kg a 400 LO – 400 mg/kg) a jeho hlavní složky citralu (240 mg/kg) na biotransformační enzymy, oxidační stres a toxicitu paracetamolu v játrech. Samci potkanů byli krmeni peletovanou stravou a po dobu 2 týdnů jim byl podáván LO nebo citral žaludeční sondou. Po 2 týdnech krmení byly stanoveny účinky LO a citralu na metabolismus a toxicitu paracetamolu. Výsledky ukázaly, že potkani po podávání 400 LO nebo citralu měli signifikantně sníženou testosteronovou 6p-hydroxylační aktivitu (CYP3A). Také ethoxyresorufin O-deethylační aktivita (CYP1A1) byla mírně, ale významně snížena. Podávání 400 LO nebo citralu snížilo peroxidaci lipidů a hladiny ROS v játrech. Současné podání paracetamolu a LO nebo citralu však nevedlo k žádné (nebo malé) změně plasmatické aktivity alaninaminotransferasy (ALT). Výsledky studie ukazují, že LO a citral mohou ovlivnit aktivitu některých biotransformačních enzymů a snížit oxidační stres v játrech. LO ani citral však nemusí mít vliv na detoxikaci paracetamolu (Li et al., 2018).

Fytochemikálie, jako jsou polyfenoly, alkaloidy a terpenoidy, podle různých studií chrání před vývojem chronických komplikací u onemocnění diabetes mellitus. Cílem studie Mishra et al. (2019) bylo stanovit antidyslipidemické a antidiabetické účinky citralu a zjistit také jeho účinek na regulační enzymy metabolismu sacharidů v játrech potkanů, kterým byla podávána dieta s vysokým obsahem tuků (high-fat-diet, HFD) po dobu 2 týdnů. Poté byl diabetes indukován intraperitoneálním podáním jedné dávky streptozocinu (STZ, 35 mg/kg). Citral byl diabetickým potkanům podáván perorálně v dávce 45 mg/kg po dobu 28 dnů. Stanoveny byly hladiny krevní glukosy, plasmatického insulinu a lipidový profil v krvi. Antioxidační aktivity byly stanovovány v játrech, slinivce a tukové tkáni. Výsledky této studie potvrdily, že podávání citralu u diabetických potkanů významně snížilo hladinu glukosy v krvi a zvýšilo plasmatický insulin. Citral také zlepšil oxidační markery spolu s antioxidačními enzymy jater, tukové tkáně a slinivky břišní ve skupině potkanů HFD/STZ a reguloval aktivitu enzymů metabolismu glukosy (glykolytických i glukoneogenních) v játrech (Mishra et al., 2019).

Byly připraveny dva chemotypy silice rostliny *Lippia alba* (Lamiaceae), v jednom byl dominantní složkou citral a ve druhém linalool. Byly studovány jejich anestetické účinky u ryby anténovky nejpodivnější (*Rhamdia quelen*), zejména s ohledem na fyziologické účinky během zotavení z anestezie. Obě silice vykazovaly antioxidační účinky, ale anestezie se silicí s převahou linaloolu nezpůsobovala poškození lipidů a proteinů, pouze dočasné změny typické pro fyziologické úpravy během zotavení z anestezie. Lze tedy říci, že pro anestezii u anténovky nejpodivnější je vhodnějším anestetikem silice s převahou linaloolu, protože vykazuje méně vedlejších účinků než silice s převahou citralu (De Freitas Souza et al., 2018).

2.1.2 Hepatotoxicita

Některá léčiva jsou stažena z trhu kvůli pozdnímu objevu jejich hepatotoxicity. Játra jsou díky svému jedinečnému metabolismu a vztahu ke gastrointestinálnímu traktu důležitým cílem toxicity léků, dalších xenobiotik a oxidačního stresu. Asi 75 % jaterní krve pochází přímo z gastrointestinálního traktu a sleziny přes portální žílu, která přivádí xenobiotika absorbovaná střevem přímo do jater v koncentrované formě. Enzymy metabolizující léčiva detoxikují mnoho xenobiotik, ale také aktivují toxicitu ostatních látek. Hypoxie, mitochondriální inhibice a poškození mitochondriální DNA, zejména u hladovějících jedinců s nízkým obsahem jaterního glykogenu, vedou k hepatocelulární nekróze. Játra syntetizují, koncentrují a vylučují žlučové kyseliny a vylučují bilirubin. Lékem indukované poškození hepatocytů a buněk žlučovodů může vést k cholestáze, jež způsobuje intrahepatální akumulaci toxických žlučových kyselin a jiných produktů, což podporuje další poškození jater. Při cholestatickém onemocnění produkují endogenně generované žlučové kyseliny hepatocelulární apoptosu. Aktivace Kupfferových buněk a infiltrace neutrofilů rozšiřují toxické poškození. Kupfferovy buňky uvolňují reaktivní formy kyslíku (ROS), cytokiny a chemokiny, které indukují extravazaci a aktivaci neutrofilů (Jaeschke et al., 2002).

Silice poleje obecné (*Mentha pulegium*) je pro své aromatické vlastnosti podobná máte, používá se jako ochucovací a vonné činidlo či jako bylinné léčivo. Obsahuje mnoho terpenových složek, hlavním z nich je pulegon, který tvoří až 80 %. Gordon et al. (1982) ve své studii prokázali, že pulegon a dva další terpeny silice poleje obecné (isopulegon a menthofuran) jsou toxické pro játra i plíce. Bylinné léčivo způsobilo při intraperitoneálním podání v dávce 400 mg/kg u myši akutní poškození jater a plic.

Na základě výsledků histologického hodnocení nekrózy, zvýšení hladiny alaninaminotransferasy v plasmě a vyčerpání jaterního glutathionu je R-(+)-pulegon terpenem primárně odpovědným za nekrózu tkáně (Gordon et al. 1982).

Oproti tomu v další studii byly studovány pozitivní účinky monoterpeny, konkrétně geraniolu, který je přítomen v růžovém oleji, citronu, zázvoru nebo pomeranči a má antioxidační, antibakteriální či protizánětlivé účinky. Samcům potkanů byl jednou denně po dobu 30 dní intraperitoneálně podáván geraniol rozpuštěný v kukuřičném oleji (50 mg/kg) a peroxid vodíku (H_2O_2) rozpuštěný v destilované vodě (16 mg/kg). Reaktivní formy kyslíku, zejména superoxid a hydroxylové radikály, a další reaktivní sloučeniny, které nejsou radikály (např. kyselina chlorná nebo H_2O_2) jsou generovány v organismu zejména jako výsledek aerobního metabolismu. Oxidační stres vyvolaný H_2O_2 může ovlivnit složení mastných kyselin v játrech a těle. Geraniol může částečně obnovit oxidační poškození jater, jelikož nelze zcela zvýšit aktivitu jaterní katalasy a regulovat změny jaterních mastných kyselin (procentuální zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin) vyvolané peroxidem vodíku (Ozkaya et al., 2016).

Studie Singh et al. (2012) zkoumala molekulární mechanismy ochrany jater terpeny před hepatotoxicitou způsobenou protizánětlivým a analgetickým léčivem nimesulidem. Hepatotoxicita u myši způsobená nimesulidem (80 mg/kg) byla patrná z histopatologických změn a zvýšených hladin alaninaminotransferasy, aspartátaminotransferasy a bilirubinu. Došlo k významné změně v genové a proteinové expresi a enzymové aktivitě antioxidantů a klíčových redoxních enzymů (indukovatelná NO-synthasa (iNOS), mitochondriální NO-synthasa (mtNOS), superoxidodismutasa, (Cu/Zn-SOD a Mn-SOD), glutathionperoxidasa (GPX) a glutathionreduktasa (GR)). Podání kombinace kamfenu a geraniolu (10 mg/kg) před podáním nimesulidu poskytlo ochranu proti hepatotoxicitě *in vivo*, jak je zřejmé z normalizovaných sérových biomarkerů a histopatologie. Expresie mRNA a aktivita klíčových antioxidantů a redoxních enzymů spolu s oxidačním stresem byly také normalizovány. Kombinace přírodních terpenů kamfenu a geraniolu zabránila poškození buněk a následné hepatotoxicitě indukované nimesulidem (Singh et al., 2012).

2.2 Detoxikační enzymy

Detoxikační enzymy působí v buněčném metabolismu cizorodých látek (xenobiotik) a endogenních sloučenin vzniklých např. při oxidačním stresu, které by mohly způsobit poškození buněk a tkání. Tyto enzymy se tedy účastní udržení homeostázy organismu. Můžeme mezi ně zařadit biotransformační a antioxidační enzymy (Yang et al. 2011).

2.2.1 Biotransformační enzymy

V metabolismu xenobiotik se uplatňují transportní procesy a biotransformační reakce. Biotransformační reakce můžeme rozdělit do dvou fází. První fáze biotransformace je označována jako konverze a zahrnuje reakce oxidační, redukční a hydrolytické. Do druhé skupiny biotransformačních reakcí patří reakce konjugační, při kterých xenobiotikum nebo konverzí vzniklý metabolit reaguje s endogenní sloučeninou. Většina reakcí je katalyzována enzymy, jen malá část xenobiotik je přeměňována neenzymově. Primárním úkolem biotransformačních enzymů je detoxikovat xenobiotika a usnadnit jejich eliminaci. Jako třetí fáze metabolismu xenobiotika bývá označován transport xenobiotika (Skálová et al., 2017). V diplomové práci se budu více věnovat enzymům první fáze biotransformace.

2.2.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou širokou nadrodinou hemoproteinů, které hrají klíčovou roli v metabolismu xenobiotik a jsou také významnými enzymy v metabolismu některých eobiotik. Byly objeveny v roce 1958 a od té doby je jim právem věnována pozornost řady vědeckých pracovišť světa. Jsou výjimečné nejen svým významem, ale také počtem substrátů, počtem katalytických aktivit a indukovatelností.

V lidském organismu jsou CYP nejvíce zastoupené v játrech, ale významný je také jejich výskyt v gastrointestinálním traktu, plicích a ledvinách. V menší míře se CYP vyskytují prakticky ve všech tkáních (např. v mléčné žláze, kůži, mozku, svalech, cévách, placentě, nadledvinkách či varlatech nebo vaječnicích) a specializovaných buňkách (např. v krevních destičkách nebo makrofázích). U prokaryot se CYP nacházejí v cytosolu (v rozpustné formě), u vyšších organismů jsou membránovými proteiny lokalizovány zejména v membránách hladkého endoplasmatického retikula (mikrosomech) nebo v menší míře v membránách mitochondrií. Vyskytují se ve vysokém

počtu isoformů a byly nalezeny ve všech studovaných prokaryotních i eukaryotních organismech (Ortiz de Montellano, 2005; Skálová et al. 2017).

Nadrodinu CYP lze rozdělit na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci apoproteinu na rodiny (značeno první číslicí), podrodiny (značeno velkým písmenem) a jednotlivé isoformy (značeno poslední číslicí). Jednotlivé isoformy se od sebe liší aminokyselinovou sekvencí, z čehož vyplývají jejich odlišné vlastnosti, jako je např. preference určitých substrátů či citlivost k některým inhibitorům. U většiny isoformů byly zjištěny značné rozdíly v zastoupení, afinitě i aktivitě. Rozdílné vlastnosti a zastoupení CYP jsou příčinou významných rozdílů v účasti isoformů na biotransformaci xenobiotik u různých druhů: např. perorální antidiabetikum tolbutamid je u potkanů hydroxylováno pomocí CYP2B1 a 2B2, u králíků CYP3A6 a u lidí CYP2C8 a 2C9 (Skálová et al., 2017).

Mnoho xenobiotik může indukovat nebo inhibovat aktivitu CYP a tyto modifikace často vedou k nežádoucím interakcím a toxicitě. Modulace aktivity biotransformačních enzymů způsobí změnu intenzity i dobu trvání účinku následně podaných léků. Dochází poté buď k několikanásobnému zvýšení plasmatických hladin účinné látky a riziku jejího toxického působení nebo ke snížení plasmatické koncentrace účinné látky pod limit léčebného efektu. Pokud dojde ke snížení koncentrace účinné látky pod terapeutickou hladinu u antibiotik nebo antiparazitik, zvyšuje se nebezpečí vzniku rezistence bakterií či parazitů (Skálová et al., 2017). Při současném podání dvou léčiv může inhibice enzymu jedním léčivem snížit biotransformaci druhého léčiva (Ortiz de Montellano, 2005).

Autoři Brewer a Chen (2017) zdůraznili problém velkého počtu léčiv a doplňků stravy, které byly schváleny Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v USA. Ocenili, že před uvedením na trh v USA jsou léčiva hodnocena z hlediska možnosti inhibovat nebo indukovat CYP, avšak předpisy pro rostlinné doplňky v USA nevyžadují dohled nebo hlášení nežádoucích účinků výrobcem agentuře FDA (Brewer a Chen 2017; Teschke, 2019).

Polymorfismy v rodině CYP by mohly mít obrovský dopad na osud terapeutických léčiv. Polymorfismy CYP2D6, 2C19 a 2C9 představují nejčastější variabilitu metabolismu léčiv v první fázi biotransformace, protože téměř 80 % léčiv, které se dnes používají, je těmito enzymy metabolizováno. Přibližně 5–14 % Kavkazanů, 0–5 % Afričanů a 0–1 % Asiatů nemá aktivitu CYP2D6 a tyto jedinci jsou označováni jako špatní

metabolizátoři. CYP2C9 je dalším klinicky významným enzymem, který vykazuje více genetických variant s potenciálně funkčním dopadem na účinnost a nežádoucí účinky léků, které jsou tímto enzymem metabolizovány. Rozsáhlý polymorfismus se vyskytuje také v jiných CYP genech, jako je např. CYP1A1, 2A6, 2A13, 2C8, 3A4 nebo 3A5, a protože několik z těchto CYP (např. CYP1A1 a 1A2) hraje roli v bioaktivaci mnoha prokarcinogenů, mohou polymorfismy těchto enzymů přispívat k variabilní citlivosti na karcinogenezi (Zhou et al., 2009).

Dále se budu více věnovat vybraným biotransformačním enzymům, které byly studovány v experimentální části této diplomové práce.

CYP1A2

Z podrodiny CYP1A je isoforma CYP1A1 více zastoupena v extrahepatálních tkáních, zatímco isoforma CYP1A2 je primárně exprimována v játrech. Obě isoformy jsou lokalizovány v hladkém endoplasmatickém retikulu (mikrosomech) a jsou hlavními aktivátory kontaminantů životního prostředí, hlavně prokarcinogenů, jako jsou např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), heterocyklické aromatické aminy (HAA) nebo polychlorované bifenyly (PCB), které mohou transformovat na genotoxické produkty. Mezi další významné substráty CYP1A1/2 patří např. kofein, paracetamol, theofylin, estradiol či warfarin. Mezi induktory se řadí některé dioxiny, kofein, omeprazol, PAH, PCB a HAA (Sansen et al., 2007; Skálová et al., 2017). Příjem kávy byl spojen se zvýšeným rizikem nefatálního infarktu myokardu pouze u jedinců s pomalým metabolismem kofeinu (Cornelis et al., 2006).

Farmakologicky se indukce CYP1A projevuje např. slabším účinkem theofylinu u kuřáků, naopak klinicky významná inhibice CYP1A2 je způsobena zejména erytromycinem, klaritromycinem nebo ciprofloxacinem. Indukce exprese CYP1A probíhá prostřednictvím receptoru pro aromatické uhlovodíky (AhR), který patří do rodiny PAS proteinů. PAS proteiny obsahují tzv. PAS (Per-Arnt-Sim) doménu, která zprostředkovává vazbu ligandů AhR a jeho další interakce s proteiny v cytoplasmě i v jádře (Skálová et al., 2017).

CYP2B6

Enzym CYP2B6 je jedním z desítek lidských CYP, které se primárně podílejí na biotransformaci léčiv a dalších xenobiotik. Je primárně exprimován v játrech,

kde se jeho podíl na celkovém množství mikrosomálních CYP odhaduje v rozmezí přibližně 1–10 %, s velkou interindividuální variabilitou na úrovni proteinu. Kromě jater je CYP2B6 také exprimován v kůži, ledvinách a různých částech gastrointestinálního traktu a dýchacího systému včetně plic a nosní sliznice (Zanger a Klein, 2013).

Mezi endogenní látky metabolisované tímto enzymem patří kyselina arachidonová, kyselina laurová, 17 β -estradiol, estron, ethinylestradiol a testosteron. CYP2B6 má význam v metabolismu pesticidů a dalších chemických látek znečišťujících životní prostředí, dále se podílí na biotransformaci taneční drogy „extáze“ (3,4-methylenedioxyamfetamin, MDMA), což vede ke vzniku potenciálně neurotoxických metabolitů. Hraje také malou roli v metabolismu nikotinu (Zanger a Klein, 2013). Ve studii Miksyse (2003) byla porovnána exprese CYP2B6 v mozcích kuřáků a nekuřáků. Hladiny CYP2B6 byly v mozcích kuřáků vyšší, a to zejména v mozkových Purkyňových buňkách a hipokampálních pyramidálních neuronech.

Mezi léčiva metabolizovaná zejména CYP2B6 patří artemisinin, bupropion, cyklofosamid, efavirenz, ketamin a methadon. CYP2B6 je jeden z nejvíce polymorfních CYP genů u lidí a bylo prokázáno, že různé varianty ovlivňují katalytickou aktivitu, transkripční regulaci, sestřih a expresi mRNA i proteinu. Vzhledem k existenci rozsáhlého genetického polymorfismu, silných inhibitorů a induktorů je aktivita CYP2B6 v populaci velmi variabilní. U některých klinicky používaných léčiv, včetně antiretrovirových léků efavirenu a nevirapinu, se ukázalo, že jednonukleotidové polymorfismy CYP2B6 jsou užitečnými prediktory farmakokinetiky a odezvy na léčiva (Wang et al., 2008; Zanger a Klein, 2013).

Klotrimazol, fenobarbital, rifampicin a ritonavir jsou silnými induktory CYP2B6 (Faucette et al., 2004), naopak mezi silné inhibitory CYP2B6 patří např. abortivum mifepriston, antiparkinsonikum selegilin nebo thienopyridinové deriváty klopidogrel a tiklopidin, což jsou léčiva, která selektivně inhibují agregaci destiček a klinicky se již několik let používají pro prevenci atherothrombotických příhod (Zanger a Klein, 2013). Nedávno byl objeven také mírný inhibiční účinek borneolu a isoborneolu na hydroxylaci bupropionu, která je katalyzovaná CYP2B6. Inhibiční účinky vůči CYP2B6 vykazovaly také kafr, mentol či eukalyptol (Seo et al., 2008). Citral a geraniol silně inhibovaly aktivitu CYP2B6 hydroxylasy kompetitivním způsobem. Tato *in vitro* data ukazují, že velké množství těchto dvou monoterpenoidů (citralu a geraniolu) by mohlo interagovat s léčivy, která jsou metabolizována pomocí CYP2B6. Farmakokinetika těchto sloučenin

in vivo by měla být dále zkoumána, aby se určilo, zda má inhibice aktivity CYP2B6 monoterpenoidy klinický význam (Seo et al., 2008).

CYP2C9

Enzymy z podrodiny CYP2C jsou u lidí zastoupeny 4 isoformami: CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19 a v neposlední řadě CYP2C9, což je důležitá isoforma zejména pro metabolismus léčiv. CYP2C9 je lokalizován v játrech v hladkém endoplasmatickém retikulu (mikrosomech). Exprese CYP2C9 je regulována PXR (pregnanový X receptor) a CAR (konstitutivní androstanový receptor), jehož aktivace probíhá dvěma způsoby: přímou aktivací nukleárního receptoru ligandem nebo nepřímo bez vazby na nukleární receptor. Mezi substráty tohoto enzymu patří především léčiva warfarin, tolbutamid, nesteroidní antiflogistika a některá antiepileptika (např. fenytoin) (Stubbins et al., 1996; Skálová et al., 2017).

V klinické praxi je často pozorováno zpomalení metabolismu warfarinu při současném podání amiodaronu, což je inhibitor CYP2C9 stejně jako flukonazol nebo sulfafenazol. Opakem je výrazný vzestup koncentrací s následnými projevy toxicity, který byl pozorován u fenytoinu po současném podání flukonazolu, fluoxetinu či omeprazolu. Tyto situace mohou nastat také v důsledku genetického polymorfismu (Skálová et al., 2017).

Mutace v genu CYP2C9 vedou k expresi tří alelických variant, CYP2C9*1, CYP2C9*2 a CYP2C9*3. Jak CYP2C9*2, tak CYP2C9*3 vykazují změněné katalytické vlastnosti *in vitro* ve srovnání s enzymem divokého typu a jsou spojeny se zvýšeným rizikem nadměrné koagulace a krvácivých příhod u pacientů léčených warfarinem. Exprese CYP2C9*3 je spojena se sníženou clearance S-warfarinu a nebezpečně zhoršenou terapeutickou odpovědí na normální dávky tohoto racemického léčiva. Screening alelických variant CYP2C9 může klinickým lékařům umožnit upravit dávkování léčiva a snížit tak riziko nežádoucích účinků (Steward et al., 1997; Higashi, 2002).

Podrodinu CYP2C lze označit za výjimečné CYP s pouze deaktivčním účinkem, jelikož zatím nebyl nalezen žádný substrát, který by byl isoformami CYP2C metabolizován na toxičtější produkt. Na rozdíl od toxikačního účinku CYP1A, jehož indukce je velmi nežádoucí a může mít závažné důsledky, zvláště pro osoby žijící nebo pracující v silně kontaminovaném prostředí (Skálová et al., 2017).

CYP3A4

CYP3A4 je z hlediska metabolismu léčiv nejvýznamnější isoformou. Vyskytuje se v hladkém endoplasmatickém retikulu (mikrosomech) a to zejména v játrech a ve střevě, v menším množství také v ledvinách, placentě, plicích nebo mozku. Pravděpodobně se podílí na metabolismu až 50 % všech léčiv užívaných v humánní medicíně. Mezi jeho substráty patří mnoho xenobiotik nejrůznější struktury, což způsobuje velká plasticita vazebného místa tohoto enzymu. Nízká substrátová selektivita představuje riziko lékových interakcí.

Exprese CYP3A4 je regulována přes PXR, jehož ligandy jsou např. léčiva rifampicin či dexamethason. PXR je označován jako tzv. nukleární receptor a náleží do rodiny transkripčních faktorů aktivovaných nízkomolekulárními látkami. V těle je ve velké míře přítomen především v játrech, méně v žaludku, ledvinách, tenkém a tlustém střevě (tato lokalizace významně koreluje s expresí CYP3A4 i transportéru P-glykoproteinu) a působí jako tzv. „senzor“ toxických endogenních metabolitů i exogenních chemických látek. Aktivace PXR probíhá přímou vazbou ligandu na receptor, PXR tvoří dimer s retinoidním X receptorem- α (RXR α) a společně rozpoznávají specifické sekvence promotorové DNA regulovaných cílových genů označované jako responzivní element PXR-RE (*PXR response element*) (Kolars et al., 1992; Skálová et al., 2017).

Z hlediska schopnosti indukovat CYP3A4 a aktivovat PXR byl v primárních kulturách lidských hepatocytů od šesti dárců hodnocen vliv 14 léčiv na mRNA a proteinovou expresi a mikrosomální aktivitu CYP3A4. Aktivace PXR korelovala s indukčním potenciálem pozorovaným v kulturách lidských hepatocytů. Klotrimazol, fenobarbital, rifampicin a sulfínpyrazon vysoce aktivovaly PXR a indukovaly CYP3A4; karbamazepin, dexamethason, dexamethason-terc-butylacetát, fenytoin, sulfadimidin a taxol slabě aktivovaly PXR a indukovaly aktivitu CYP3A4, methotrexát a probenecid nevykazovaly žádnou výraznou aktivaci PXR. Ritonavir a troleandomycin vykazovaly výraznou aktivaci PXR, ale žádné zvýšení (v případě troleandomycinu) nebo významné snížení (v případě ritonaviru) mikrosomální aktivity CYP3A4. Dospělo se k závěru, že „*gene reporter assay*“ pro PXR je spolehlivou a doplňkovou metodou pro posouzení indukčního potenciálu léčiv a jiných xenobiotik na CYP3A4 (Luo et al., 2002).

Mezi inhibitory CYP3A4 patří např. makrolidová antibiotika, ketokonazol, lovastatin, chinin nebo grapefruitový džus (Skálová et al., 2017). Bylo prokázáno, že opakované požití grapefruitové šťávy vede ke ztrátě CYP3A4 z epitelu tenkého střeva. U zdravého dobrovolníka došlo ke snížení o 47 % do 4 hodin po konzumaci grapefruitové šťávy (Schmiedlin-Ren et al., 1997).

2.2.1.2 Další vybrané biotransformační enzymy

V experimentální části této diplomové práce jsem se rovněž věnovala enzymům z rodiny aldo-ketoreduktas a karbonylreduktas, proto se o nich stručně zmíním.

AKR1C

Aldo-ketoreduktasy (AKR) představují nadrodinu cytosolických oxidoreduktas, vyskytujících se ve většině živých organismů. Jsou tkáňově specifické a využívají NADPH jako kofaktor při redukci aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy. Dosud bylo identifikováno 15 rodin AKR, jejichž obecným rysem je nízká substrátová specifita a schopnost přeměňovat xenobiotika (daunorubicin, akrolein) i látky endogenního původu (sacharidy, retinal, ketosteroidy) (Skálová et al., 2017).

Podrodina AKR1C zahrnuje čtyři lidské enzymy AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR1C4, které sdílejí vysoké procento shody aminokyselinové sekvence (84–98 %), např. AKR1C1 a AKR1C2 se liší pouze v sedmi aminokyselinových zbytcích. Enzymy AKR1C, s výjimkou AKR1C4, který je specifický pro játra, jsou exprimovány v různých normálních i nemocných tkáních a byly spojeny s několika chorobami, jako je např. myeloidní leukemie, rakovina plic, prsu, prostaty či endometria. Tyto enzymy regulují aktivitu androgenů, estrogenů a progesteronu, fungují jako enzymy první fáze biotransformace, jsou odpovědné za metabolismus a clearance různých xenobiotik, proto se také podílejí na vzniku rezistence vůči různým léčivům (Rižner, 2012).

AKR1C katalyzují redukci nitrosoaminu z tabáku na méně toxický a snadněji eliminovatelný produkt, metabolisují antiemetikum dolasetron a hrají zásadní roli v deaktivaci protinádorového léčiva doxorubicinu a potenciálního cytostatika oracinu (Skálová et al., 2017). Farmakokinetické studie odhalily, že oracin podléhá metabolické inaktivaci redukcí karbonylové skupiny, což přispívá k rezistenci na chemoterapii. Aktivita AKR1C1 v celkové redukci oracinu byla o jeden řád vyšší než aktivita AKR1C2 a 1C4. Podrobné znalosti o všech enzymech zapojených do detoxikace oracinu mohou

pomoci ke zlepšení protinádorového léčebného režimu, a to zejména společnou aplikací příslušných inhibitorů (Wsól et al., 2007).

CBR1

Karbonylreduktasy (CBR) patří do skupiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). U člověka jsou CBR exprimovány ve většině tkání, vysoké hladiny byly nalezeny především v jaterní tkáni, placentě nebo centrální nervové soustavě (Skálová et al., 2017). Jsou to NADPH-dependentní, většinou monomerní, cytosolické enzymy se širokou substrátovou specificitou pro mnoho endogenních a xenobiotických karbonylových sloučenin. Katalyzují redukci endogenních prostaglandinů, steroidů a dalších alifatických aldehydů a ketonů. Rovněž redukují širokou škálu xenobiotických chinonů odvozených od polycyklických aromatických uhlovodíků (Forrest a Gonzalez, 2000). Mezi substráty CBR patří mimo jiné warfarin, menadion (vitamin K3) či antipsychotikum haloperidol (Skálová et al., 2017).

CBR také redukuje antracyklinová protinádorová léčiva daunorubicin a doxorubicin na jejich C-13-hydroxylované metabolity, čímž se mění farmakologické vlastnosti těchto léků (Forrest a Gonzalez, 2000). CBR1 redukuje doxorubicin na metabolit doxorubicinol (Gonzalez-Covarrubias et al., 2009). Snížení aktivity CBR1 pomocí farmakologických inhibitorů může být u pacientů podstupujících chemoterapii užitečným prostředkem ke zmírnění vedlejších účinků doxorubicinu (Olson et al., 2003).

CBR1 chrání buňky před peroxidací lipidů, a jelikož buňky lidského hepatocelulárního karcinomu (HCC) jsou v hypoxických podmínkách vystaveny oxidačnímu stresu, bylo ve studii Taka et al. (2011) testováno, zda je CBR1 upregulována faktorem indukovaným hypoxií (HIF-1 α), pomáhá růstu nádoru při hypoxii a poskytuje chemorezistenci vůči cisplatině a doxorubicinu v HCC. Promotor genu pro CBR1 byl aktivován HIF-1 α , následně nadměrná exprese CBR1 zvýšila přežití buněk snížením oxidačního stresu za hypoxických podmínek při léčbě cisplatinou a doxorubicinem. Kombinovaná terapie inhibitorů CBR1 s cisplatinou nebo doxorubicinem zvyšovala buněčnou smrt v buňkách HCC, což ukazuje, že inhibice CBR1 specifickými inhibitory zvyšuje účinnost protinádorového léčiva v HCC a může se uplatnit jako dobrý molekulární cíl pro vývoj nových protinádorových léčiv pro pacienty s HCC (Tak et al., 2011).

2.2.2 Antioxidační enzymy

Lidské tělo chrání komplexní antioxidační ochrannou síť, která se spoléhá na endogenní enzymové a neenzymové antioxidanty. Tyto molekuly společně působí proti volným radikálům, aby odolávaly jejich škodlivým účinkům na životně důležité biomolekuly a tkáně. Na základě jejich reakce přítomnost volných radikálů je lze rozdělit na antioxidanty první, druhé, třetí a čtvrté linie. Tyto linie obrany zahrnují prevenci vzniku radikálů, zneškodnění radikálů, opravu radikály-vyvolaného poškození a adaptační mechanismy. Role a účinnost antioxidantů první linie obrany, která v zásadě zahrnuje antioxidační enzymy superoxiddismutasy (SOD), katalasu (CAT), glutathionperoxidasy (GPX) a proteiny chelatující přechodné kovy (ceruloplasmin, transferin, feritin), je důležitá a nezbytná v celé obranné strategii antioxidantů, zejména s ohledem na superoxidový anion radikál, který je trvale vytvářen při normálním metabolismu těla, zejména v procesu aerobní respirace v mitochondriích. Do druhé linie obrany patří nízkomolekulární antioxidanty (např. askorbát, α -tokoferol, glutathion), které zneškodňují již vzniklé ROS a přerušují tak řetězovou reakci. Do třetí linie obrany se zapojují enzymy, které opravují poškození biomolekul vzniklé působením ROS. Patří mezi ně různé polymerasy, glykosylasy a nukleasy, které opravují poškozenou DNA, a proteolytické enzymy (Ighodaro a Akinloye, 2018).

V této části se budu věnovat vybraným antioxidačním enzymům, jejichž expresi jsem stanovovala v experimentální části práce.

Superoxiddismutasa

Superoxiddismutasy (SOD) jsou všudypřítomnou rodinou enzymů, které katalyzují přeměnu (dismutaci) superoxidu na peroxid vodíku a molekulární kyslík. Dosud byly biochemicky a molekulárně charakterizovány tři jedinečné a vysoce kompartmentalizované savčí SOD, které se liší kofaktorem neboli atomem kovu hrajícím roli v katalytickém účinku enzymu (Ewing a Janero, 1995; Zelko et al., 2002).

Enzym SOD1 (Cu,Zn-SOD) byl charakterizován jako první, tento homodimer obsahující měď a zinek se nachází téměř výhradně v intracelulárních cytoplasmatických prostorech. Enzym SOD2 (Mn-SOD) obsahuje měď a vyskytuje se jako tetramer v mitochondriích. Poslední charakterizovaný eukaryotický SOD je extracelulární tetramer SOD3 (Cu,Zn-SOD/EC-SOD) také obsahující měď a zinek (Zelko et al., 2002).

Extracelulární prostor je před oxidačním stresem chráněn tímto enzymem, který je vysoce exprimován ve vybraných tkáních včetně krevních cév, srdce, plic, ledvin a placenty. Na svém C-konci obsahuje jedinečnou doménu vázající heparin, která zajišťuje lokalizaci do extracelulární matrix, kde enzym vycytává superoxid. EC-SOD heparin vázající doména může být odstraněna proteolytickým štěpením a tím dojde k uvolnění aktivního enzymu do extracelulární tekutiny. EC-SOD také zachovává bioaktivitu oxidu dusnatého a usnadňuje expresi genu indukovanou hypoxií. Ztráta aktivity enzymu přispívá k patogenezi řady onemocnění zahrnující tkáně s vysokou hladinou konstitutivní exprese EC-SOD (Nozik-Grayck et al., 2005).

Molekulární porozumění každému z genů SOD se ukázalo jako užitečné při dešifrování jejich biologických rolí. Například řada mutací jednotlivých aminokyselin v SOD1 byla spojena s familiární amyotrofickou laterální sklerózou. Knock-out genu SOD2 u myši má za následek smrtící kardiomyopatii. Jediná mutace aminokyselin v lidském SOD3 je spojena s 10 až 30násobným zvýšením hladin SOD3 v séru (Zelko et al., 2002).

Katalasa

Katalasy (CAT) nebo přesněji hydroperoxidasy jsou jednou z nejstudovanějších tříd enzymů. Existuje mezi nimi určitá rozmanitost a lze je rozdělit do čtyř skupin: monofunkční CAT, bifunkční katalasu-peroxidasu, minoritní CAT a nehemové CAT. Typická monofunkční katalasa obsahující hem je v přírodě nejrozšířenější, je to 240 kilodaltonový (kDa) tetramerní protein se čtyřmi podobnými podjednotkami. Každá polypeptidová podjednotka má hmotnost 60 kDa a obsahuje jediný ferriprotoporfyrin. Katalasová aktivita tkání se velmi liší, nejvyšší je v játrech a ledvinách, v pojivové tkáni je naopak nízká (Chelikani et al., 2004; Ighodaro a Akinloye, 2018).

Enzym katalasa je považována za hlavní regulátor metabolismu peroxidu vodíku. Celková reakce katalyzovaná katalasami je degradace dvou molekul peroxidu vodíku na vodu a kyslík: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Peroxid vodíku je při vysokých koncentracích toxický, zatímco při nízkých koncentracích se zdá, že moduluje některé fyziologické procesy, jako je signalizace při buněčné proliferaci, apoptose, metabolismu sacharidů nebo aktivaci trombocytů. Mutace genu katalasy byly detekovány ve spojení s diabetes mellitus, hypertenzí a vitiligem, což je neinfekční kožní porucha. Snížení katalasové

aktivity u pacientů s nádory je spíše způsobeno sníženou syntézou enzymů než mutacemi v genu pro CAT (Góth et al., 2004).

Glutathionperoxidasa

Glutathionperoxidasa (GPX) je důležitý intracelulární enzym, který v mitochondriích a cytosolu za účasti koenzymu glutathionu štěpí peroxidy vodíku na vodu a peroxidy lipidů na jejich odpovídající alkoholy, a tím chrání buňky před oxidačním stresem. Dosud bylo identifikováno osm enzymů: GPX1 – GPX8, které se liší strukturou, lokalizací, funkcí a závislostí na selenu (Ighodaro a Akinloye, 2018).

GPX1 je nejhojnějším typem, nachází se v cytoplasmě téměř všech savčích tkání a jeho substrátem je zejména peroxid vodíku. GPX4 má vysokou preferenci pro lipidové hydroperoxidy; je také exprimován téměř v každé savčí buňce, i když v mnohem nižších hladinách (Muller et al., 2007). GPX2 a GPX3 jsou lokalizovány extracelulárně. GPX2 se nachází v gastrointestinálním traktu, především ve střevě. Ledvina je vzhledem k ostatním tkáním primárním místem exprese pro GPX3. Většina forem GPX má tetramerní strukturu, ale GPX4 (též fosfolipidová GPX) je monomer a liší se substrátovou specifitou, má také mitochondriální isoformu, která zprostředkovává apoptotickou odpověď na oxidační stres. GPX5 až GPX8 se liší od jiných glutathionperoxidas v tom, že je v nich selenocystein nahrazen redoxně aktivním cysteinovým zbytkem a jejich aktivita je tedy nezávislá na selenu (Ighodaro a Akinloye, 2018).

Ateroskleróza u pacientů s diabetem mellitem 2. typu byla spojena se zvýšeným oxidačním stresem. GPX1 hraje důležitou roli v antioxidační obraně cévní stěny. Výsledky studie Hamanishiho et al. (2004) naznačují, že genetické polymorfismy v GPX1 jsou spojeny s rizikem kardiovaskulárních a periferních vaskulárních onemocnění u diabetiků 2. typu. Také rakovina prsu může souviset s oxidačním stresem. Konkrétně polymorfismus GPX1 Pro198Leu je spojován s rizikem vzniku rakoviny plic a prsu u žen (Ravn-Haren et al., 2006) a rakoviny prostaty u mužů (Arsova-Sarafínovska et al., 2009). Individuální vnímavost k rakovině prostaty může být modulována polymorfismem GPX1 a v kombinaci genetických faktorů podílejících se na oxidační reakci s environmentálními karcinogeny může hrát důležitou roli v karcinogenezi prostaty (Arsova-Sarafínovska et al., 2009).

Glutathion-S-transferasa

Glutathion-S-transferasy (GST) jsou jednou z nejdůležitějších rodin detoxikačních enzymů v přírodě, na základě proteinové sekvence a struktury se dělí na cytosolické (13 tříd: alfa, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi a omega), mitochondriální (třída kappa) a mikrosomální GST (4 podskupiny MAPEG I-IV). Mitochondriální a mikrosomální GST jsou velmi diverzifikované a vzájemně nepodobné. Cytosolické GST jsou poměrně konzervované, obvykle mívají až 40% sekvenční homologii (Eaton, 1999; Oakley, 2011) a vyskytují se ve formě homodimerů nebo heterodimerů. Jednotlivé isoformy cytosolických GST se liší orgánovou distribucí, např. v játrech je vysoce exprimovaná třída A a velmi málo třída P, která má zvýšenou expresi naopak v proliferujících (např. nádorových) buňkách (Skálová et al., 2017).

GST katalyzují konjugaci glutathionu (GSH) s různými elektrofilními látkami, mají širokou substrátovou specificitu pro mnoho xenobiotických karbonylových sloučenin včetně oxidů arenu, nenasycených karbonylů, organických halogenidů a dalších substrátů. Byla identifikována celá řada endogenních substrátů, např. vedlejších produktů aktivity ROS (Strange et al., 2001).

Některé lidské isoformy GSTA (GSTA1 a GSTA2) vykazují též peroxidasovou aktivitu vůči produktům peroxidace lipidů, např. hydroperoxidům mastných kyselin a fosfolipidovým hydroperoxidům. GSTA1 efektivně redukuje produkt peroxidace kyseliny linolové, 13-hydroperoxyoktadekadienovou kyselinu, na odpovídající hydroxyderivát. Isoformy GSTM1 a GSTM2 mají jen slabou na selenu nezávislou peroxidasovou aktivitu (Boušová a Skálová, 2012).

GST fungují také jako transportní proteiny. Izoenzym GSTA se nachází v ledvinách, a především v centrilobulárních hepatocytech a je tedy citlivým a relativně specifickým biomarkerem pro jaterní buňky (Smith et al., 2013). Sérová GSTB je zvýšena u akutní hepatitidy virového nebo lékového původu, přičemž se zvyšuje pětkrát až desetkrát více než aminotransferasy. Bylo pozorováno masivní zvýšení enzymu při toxickém působení paracetamolu, u jaterních metastáz a při neléčené hypertyreóze. Kationtová forma GSTB se vyskytuje v játrech jako protein vázající bilirubin (ligandin), zatímco aniontové formy jsou přítomny v plicích, svalech a erythrocytech (McIntyre a Rosalki, 1994).

Působení induktorů a inhibitorů GTS může výrazně ovlivnit metabolismus léčiv podléhajících konjugaci s GSH, což může mít farmakologické a toxikologické důsledky. Indukční účinek na GST vykazují barbituráty, PAH či thiol-reaktivní sloučeniny (Skálová et al., 2017). Studie Steinkellnera (2005) uvádí, že káva u lidí indukuje GSTP a naznačují tak, že konzumace kávy může vést k ochraně před polycyklickými aromatickými uhlovodíky (Steinkellner et al., 2005). Mezi inhibitory GST patří např. bilirubin, žlučové kyseliny a indometacin (Skálová et al., 2017). Kurkumin byl také účinným inhibitorem aktivity cytosolické GST v játrech potkanů (Oetari et al., 1996).

Aktivitu GST ovlivňuje mimo jiné genetický polymorfismus, u člověka je nejběžnější delece genu pro GSTM1, která detoxikuje PAHy, a byla popsána u téměř 50 % bělošské a 90 % polynéské populace. U homozygotů, u nichž zcela chybí tento protein, byla zaznamenána větší náchylnost k poškození DNA a zvýšené riziko rozvoje rakoviny plic. Dalším častým polymorfismem je delece genu kódujícího GSTT1 nebo GSTP1, u něhož byly popsány 4 různé bodové mutace modifikující aktivitu (zvýšení i snížení) mutovaného enzymu (Skálová et al., 2017).

GST detoxikují potenciálně mutagenní a toxické elektrofilní s DNA, včetně metabolitů několika chemoterapeutických látek, z nichž některé jsou podezřelé z karcinogenity. Polymorfismy v genech, které kódují GST, mění náchylnost na chemoterapii indukovanou karcinogenezi, konkrétně na akutní myeloidní leukemii související s terapií (t-AML), což je devastující komplikace dlouhodobého přežití rakoviny. Vysvětlení genetických determinant může pomoci identifikovat jedince se zvýšeným rizikem rozvoje t-AML. Dědičnost alespoň jedné alely Val na kodonu 105 GSTP1 představuje signifikantně zvýšené riziko vzniku t-AML po cytotoxické chemoterapii ale ne po radioterapii (Allan et al., 2001).

Glutathionreduktasa

Glutathionreduktasa (GR) je flavoprotein, který katalyzuje redukcí oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovanou thilovou formu glutathionu (GSH) za účasti NADPH jako donoru elektronů. Skládá se ze dvou identických podjednotek, z nichž každá má hmotnost 55 kDa. GR se uplatňuje při detoxikaci peroxidů a volných radikálů vytvořených v mitochondriích, je důležitý pro antioxidační ochranu a udržování redoxního potenciálu buňky (Čolák a Žorić, 2019).

V kvasinkách a lidských buňkách jediný gen exprimuje více než jednu formu glutathionreduktasy, která je určena k pobytu v cytoplasmě nebo k translokaci do různých organel. V rostlinách byly popsány dva geny, hmyz a kinetoplastidy (skupina protozoí včetně *Plasmodia* a *Trypanosoma*) obecně neexprimují glutathionreduktasu nebo biosyntetické enzymy glutathionu. Místo toho exprimují buď thioredoxinový systém nebo trypanothionový systém (Couto et al., 2016).

Mezi poruchy, které byly spojeny s nedostatkem tohoto enzymu v červených krvinkách, byly zahrnuty nemoci jako je hemofilie, erythroleukemie, hemoglobinopatie C a Gaucherova choroba. Tyto poruchy však nemohly být způsobeny nedostatkem enzymu. Bylo zjištěno, že společným faktorem u pacientů byl nízký příjem riboflavinu v potravě. Léčba riboflavinem u anemických pacientů s deficitem glutathionreduktasy vedla

ke korekci deficitu enzymu, ale neměla žádný vliv na anemii (Beutler, 1972).

Výsledky studie Murakamiho et al. (1989) ukazují, že snížení hladin redukované formy glutathionu v erythrocytech diabetiků je způsobeno narušenou syntézou glutathionu, a že zvýšení hladin GSSG je způsobeno sníženou transportní aktivitou GSSG membránou erythrocytů společně se snížením aktivity glutathionreduktasy. Tato data také naznačují, že poškození metabolismu glutathionu oslabuje obranný mechanismus proti oxidačnímu stresu v erythrocytech diabetiků.

3. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv monoterpenu citralu na expresi vybraných biotransformačních a antioxidačních enzymů v HepaRG buňkách. Dílčím cílem bylo stanovení cytotoxicity citralu na HepaRG buňky pomocí testu neutrální červeně. K dosažení cílů bylo třeba provést:

- Rozmražení HepaRG buněk, počítání buněk v Bürkerově komůrce, pasážování, nasazení, kultivace a ovlivnění buněk citralem a induktory (rifampicin, β -naftoflavon, oltipraz)
- Provést test cytotoxicity pomocí roztoku neutrální červeně (NRU test)
- Stanovit genovou expresi CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4, AKR1C, CBR1, SOD1/2, CAT, GPX1, GPX4, GSTA, GSTP a GR pomocí qPCR
- Stanovit koncentraci proteinu ve vzorcích a optimalizovat metodu Western blotting, následně stanovit proteinovou expresi CYP2C9, CYP3A4, AKR1C3 a CBR1

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy CP225D – Sartorius
- ChemiDoc MP Imaging System – BioRad
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos – Thermo Fisher Scientific
- CO₂ inkubátor Forma – Thermo Fisher Scientific
- Hlubokomrazicí box – Arctiko
- Laboratorní váhy M-prove – Sartorius
- Laminární box Aura Vertical S.D.4 – BioAir
- Magnetická míchačka – Heidolph
- Mini-PROTEAN Tetra Cell – BioRad
- NanoDrop 2000 – Thermo Fisher Scientific
- PCR cyklér MJ Mini Thermal Cycler – BioRad
- PCR QuantStudio 6 Flex – Applied Biosystems
- pH metr WTW pH level 2 – inoLab
- Spektrofotometr NanoQuant Infinite M200 Pro – Tecan
- Thermomixer Comfort – Eppendorf
- Trans-Blot Turbo Transfer System – BioRad
- Vortex-V-1 plus – Biosan
- ostatní běžné laboratorní vybavení (Bürkerova komůrka, buničina, falkonky, kádinky, kahan, kultivační destičky, kultivační lahve, mikrozskumavky, pipety a špičky Eppendorf, rukavice apod.)

4.2 Použité chemikálie a roztoky

- Akrylamid/bis-akrylamid 37,5:1 (40% w/v) – Serva
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit – Thermo Fisher Scientific
- Deoxynukleotidy (dNTP) – Generi Biotech
- Detergent RNaseZAP – Sigma Aldrich
- Diethylpyrokarbonát (DEPC) – Biogen
- Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma Aldrich
- Dithiotreitol (DTT) – New England Biolabs
- DNasa I – New England Biolabs
- DNasa I pufr – New England Biolabs
- Dodecylsírán sodný (SDS) – Lach-Ner
- Ethanol 99% – Sigma-Aldrich
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Penta
- Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA) – Sigma Aldrich
- Fenylmethansulfonylfluorid (PMSF)
- Fetální hovězí sérum (FBS) – Sigma Aldrich
- Fosfátový pufr (PBS) – Penta
- Glycin – Sigma Aldrich
- Hovězí sérový albumin (BSA, 20%) – Sigma Aldrich
- Hydrokortison hemisukcinát – Sigma Aldrich
- Chemiluminiscenční detekční činidla (Amersham™ ECL™ Prime Luminol Enhancer solution a Amersham™ ECL™ Prime Peroxide solution) – GE Healthcare
- Chlorid sodný (NaCl) – Penta
- Chloroform – Sigma Aldrich

- Insulin – Sigma Aldrich
- Isopropanol – Sigma Aldrich
- Kultivační médium Gibco Williams' Medium E, GlutaMAX™ Supplement – Thermo Fisher Scientific
- Náhodné hexamery – Generi Biotech
- Nespecifické sondy SYBR green I (Xceed qPCR SG Mix) – Institut aplikovaných biotechnologií, Praha
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) – Sigma Aldrich
- Persíran amonný (APS) – Sigma Aldrich
- Primery – Generi Biotech
- Reverzní transkriptasa (RT) ProtoScript II – New England Biolabs
- RT pufr ProtoScript II – New England Biolabs
- Sušené odstředěné mléko – Sigma Aldrich
- Syntetický penicilin-streptomycin (Pen/Strep) – Sigma Aldrich
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) – Penta
- Tris-pufrovaný fyziologický roztok (TBS)
- Trizol (TriReagent) – Sigma Aldrich
- Tween 20 – Sigma Aldrich
- ostatní běžné chemikálie čistoty p.a.

4.3 Buněčná linie

K práci byla použita buněčná linie HepaRG buněk od firmy BIOPREDIC International, což jsou buňky izolované od dárce s cholangiokarcinomem, které nesou vlastnosti časných jaterních progenitorových buněk i zralých hepatocytů (web 1).

4.3.1 Příprava kultivačních médií

Kultivační média byla připravována sterilně v laminárním boxu. Byl používán jednorázový spotřební materiál a nádoby sterilizované pomocí autoklávu. Laminární box byl vysvícen UV lampou po dobu 20 – 30 minut a povrchy boxu byly vytřeny ethanolem.

4.3.1.1 Růstové médium

Růstové médium bylo připraveno smícháním 500 ml média Williams' Medium E, GlutaMAX™ Supplement s:

- 50 ml FBS
- 1,2 ml Pen/Strep
- 275 µl insulin (výsledná koncentrace v médiu 5 µg/ml)
- 13,3 mg hydrokortison hemisukcinát (výsledná koncentrace v médiu 50 µM)

4.3.1.2 Diferenciační médium

Diferenciační médium bylo připraveno smícháním růstového média s DMSO (výsledná koncentrace 2% DMSO).

4.3.2 Rozmrazování buněk

Do plastové zkumavky bylo připraveno 4,5 ml předehřátého kultivačního růstového média (37 °C) na 0,5 ml zamražené buněčné suspence (nutno zředit obsah 10×). Zkumavka s buněčnou suspensí byla zahřáta ve vodní lázni cca 1–2 min tak, aby došlo k téměř úplnému roztavení obsahu, a otřena lihem. Obsah zkumavky byl sterilně přenesen do plastové zkumavky s médiem, prázdná zkumavka byla několikrát vypláchnuta trochou média.

Poté byly buňky spočítány pomocí trypanové modři (viz. kapitola 4.3.3 Počítání buněk v Bürkerově komůrce). Dle koncentrace a objemu byla suspence stočena

na centrifuzi 3 minuty při 4 °C a 500 × g. Dále byl odstraněn supernatant, přidáno nové médium a buňky byly resuspendovány. Do 25 cm² lahve bylo nasazeno 1,5 × 10⁶ buněk v 5 ml média. Po 24 hodinách v inkubátoru (vytemperovaného na 37 °C v atmosféře 5 % CO₂) byla zkontrolována morfologie buněk a vyměněno médium.

4.3.3 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Bürkerova komůrka je tvořena silným podložním sklem se dvěma vyrytými počítacími sítěmi s přesně danou plochou a hloubkou (Obr. 2). Počítací síť obsahuje 9 velkých čtverců (každý o ploše 1 mm²), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců, jejichž plocha je 0,04 mm². Při počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky je nejprve nanesen malý objem testované suspence mezi krycí a podložní sklo, poté je takto připravená počítací komůrka vložena do zorného pole světelného mikroskopu a po zaostření se může přistoupit k samotnému počítání částic, které se nacházejí uvnitř čtverce, a částic, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkají dvou stanovených stran (web 2).

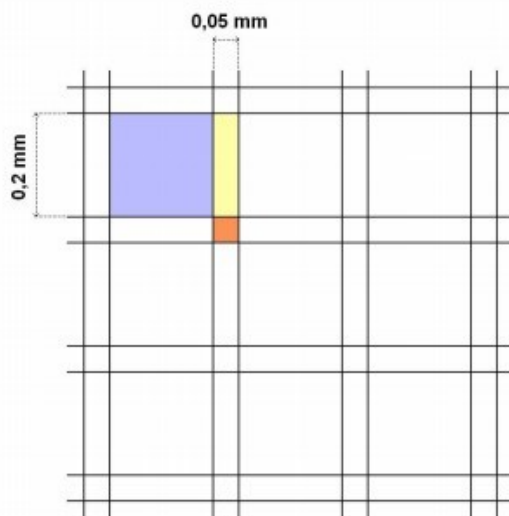


Schéma Bürkerovy komůrky



Bürkerova komůrka

Obrázek 2 – Bürkerova komůrka, zdroj: web 3 (<http://patofyziologie.lfp.cuni.cz/wp-content/uploads/2018/09/pocitani.pdf>)

Pro levné a jednoduché zhodnocení životaschopnosti buněk se používá test s trypanovou modří, což je pro živé buňky nepropustné barvivo, při kontaktu s roztokem

trypanové modři zůstávají bezbarvé. Buňky s porušenou integritou membrány se zbarví tmavě modře (Celis, 2006).

Deset μl dobře promíchaných resuspendovaných buněk bylo smícháno s 10 μl trypanové modři. Buněčná suspence s barvivem byla promíchána na vortexu a do komůrky bylo napipetováno $2 \times 9 \mu\text{l}$.

Pro výpočet počtu buněk v 1 ml buněčné suspence byla použita rovnice:

$$c = \frac{x \times 2}{5} \times 10^4$$

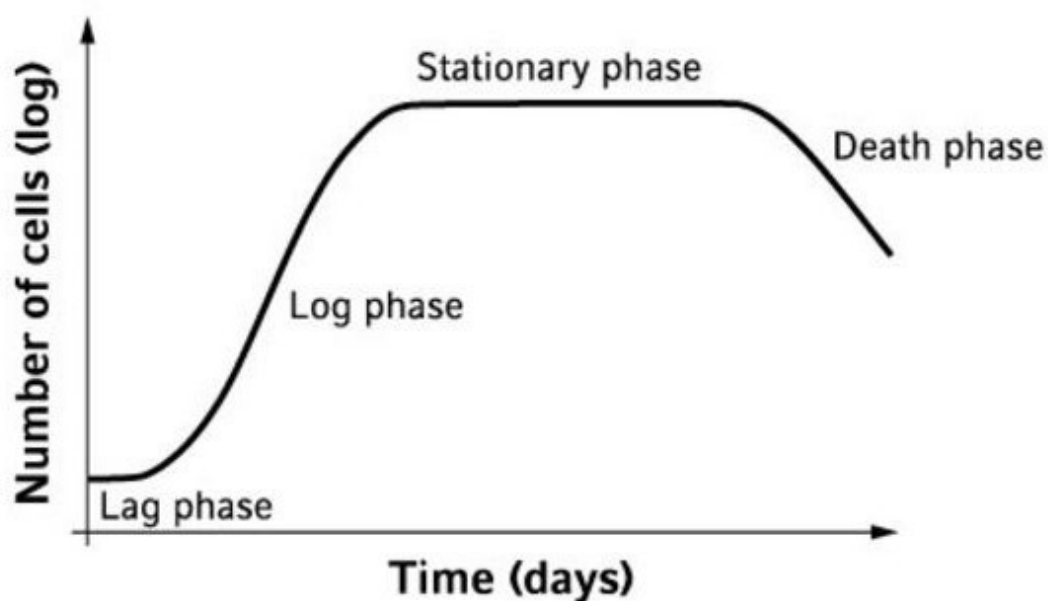
- c počet buněk na 1 ml buněčné suspence (počet buněk/ml)
x hodnota zjištěná z Bürkerovy komůrky
5 počet počítaných čtverců
2 zředění
 10^4 přepočet na 1 ml suspence

4.3.4 Pasážování buněk

Většina buněčných kultur potřebuje ke své proliferaci kontakt s podkladem – rostou tedy tzv. adherentně a postupně pokryjí celé dno kultivační nádoby – vytvoří monovrstvu. V tomto stádiu již není možná jejich další proliferace a je nutné přistoupit k pasáži neboli přenesení části buněčné populace do nových kultivačních nádob.

Růstová křivka (Obr. 3) poskytuje informace o chování během kultivace.

- Statická (lag) fáze: Buňky se zotaví ze subkultivace, připojí se k povrchu a připraví se na buněčné dělení.
- Exponenciální (log) fáze: Buňky rostou exponenciálně, intenzivně se množí do vyčerpání živin.
- Stacionární (plató) fáze: Kultura je spojitá a buněčný růst se zpomaluje nebo dokonce zastavuje.
- Fáze smrti: Buňky začnou umírat a oddělují se od povrchu (Čedíková et al., 2012; web 4).



Obrázek 3 – Růstové fáze buněk, zdroj: <https://handling-solutions.ependorf.com/cell-handling/reproducibility/scientific-background/everyday-culture-practice/>

Buňky byly rozmražené a nasazené do 25 cm² kultivační lahve v 15. pasáži. Po dobu dvou týdnů se buňky nechaly růst v růstovém médiu (výměna média 2× týdně), poté byly znovu spočítány a pasážovány do nových větších 75 cm² kultivačních láhví. Před vlastním nasazením na pokusy byly buňky takto dva týdny kultivovány a následně pasážovány do nových lahví celkem třikrát (16., 17. a 18. pasáž), aby bylo zajištěno dostatečné množství buněk.

Při pasážování buněk byly nejprve předeřáty trypsin, PBS a růstové médium na teplotu 37 °C. Množství buněk bylo zkontrolováno pod mikroskopem, rovněž tak čírost média z důvodu případné kontaminace. Všechny pomůcky byly před umístěním do laminárního boxu povrchově vydezinfikovány. Hrdlo kultivačních lahví a nádob s chemikáliemi bylo před a po použití sterilizováno plamenem z kahanu. V laminárním boxu bylo slito původní médium z kultivační lahve do odpadové kádinky a buňky byly dvakrát opláchnuty 8 ml PBS pufru. Dále byly přidány 3 ml trypsinu, který uvolní buňky z povrchu kultivační lahve. Po tříminutové inkubaci při 37 °C došlo k opětovné kontrole pod mikroskopem a následné neutralizaci trypsinu přidáním 8 ml růstového média. Buňky byly po neutralizaci zhomogenizované pipetou a přeneseny do plastové

zkumavky, kultivační lahev byla ještě vypláchnuta dalšími 3 ml růstového média a obsah byl přidán k suspenzi v plastové nádobce.

4.3.5 Nasazení buněk

Po dvou týdnech od 18. pasáže byly buňky spočítány a nasazeny (19. pasáž) do 96jamkových ($0,009 \times 10^6$ buněk na jamku a 0,1 ml média), 12jamkových ($0,09 \times 10^6$ buněk na jamku a 1 ml média) a 6jamkových ($0,2 \times 10^6$ buněk na jamku a 2 ml média) kultivačních destiček.

První dva týdny se nechaly buňky růst v růstovém médiu (výměna média 2× týdně). Po dvou týdnech, kdy byly buňky opět pěkně porostlé, začalo jejich diferencování. HepaRG buňky diferencují v přítomnosti DMSO, proto při další výměně média již nebylo k buňkám přidáno růstové médium, ale růstové a diferenciací médium v poměru 1:1 (1% DMSO) z důvodu postupné adaptace buněk na přítomnost vyšší koncentrace DMSO v médiu. Při následné výměně média se k buňkám přidávalo již samotné diferenciací médium (2% DMSO). Buňky se nechaly diferencovat rovněž po dobu dvou týdnů (výměna média 2x týdně). Takto již rozdiferencované buňky lze použít do následujících pokusů.

4.4 Studium cytotoxicity

Pro hodnocení cytotoxicity byla použita hodnota IC_{50} , což je střední inhibiční koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu buňky (Zanders, 2011). Diferencované HepaRG buňky byly ovlivněny různými koncentracemi citralu, jež byly připraveny rozpuštěním látky v DMSO. Příprava roztoků probíhala vždy v laminárním boxu. Zásobní roztoky byly připraveny 1000x koncentrovanější, pomocí základních výpočtů byly připraveny koncentrované zásobní roztoky citralu: 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,01 M. Takto koncentrované roztoky byly poté ještě 1000x zředěny v růstovém médiu, tudíž výsledná koncentrace citralu v médiu byla: 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,01 mM. Výsledný objem rozpouštědla (0,1% DMSO) je díky tomu všude stejný a nízký. Na destičku do 6 jamek pod sebou bylo vždy pipetováno 100 μ l kontrolního média či média s danou koncentrací citralu tak, aby v jednotlivých sloupcích byla stejná koncentrace. Destičky s různými koncentracemi citralu, negativní (0,1% DMSO) a pozitivní (10% DMSO) kontrolou byly inkubovány 24, 48 a 72 hodin v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO_2 . Poté byly vyhodnoceny testem s neutrální červení. Negativní kontrola (0,1% DMSO)

představuje 100% buněčnou viabilitu, pozitivní kontrola (10% DMSO) zase 0% buněčnou viabilitu.

4.4.1 Neutral red uptake test

Neutral red uptake test (NRU) neboli test cytotoxicity neutrální červení je test životnosti buněk, jehož základem je inkorporace a navázání neutrální červeně do živých buněk. Toto supravitální barvivo penetruje buněčnou membránu neionizovanou pasivní difúzí a akumuluje se převážně v lyzosomech, které udržují pH nižší, než je pH okolní cytoplazmy. Udržování protonového gradientu na membráně lyzozomu je energeticky náročné, proto ztráta gradientu pH při poškození buňky nebo buněčné smrti způsobí zvýšení propustnosti membrány a vyplavení neutrální červeně. Spektrofotometricky lze změřit pokles absorbance a rozlišit tak buňky živé, poškozené nebo mrtvé (Riddell et al., 1986; Repetto et al., 2008).

4.4.1.1 Použité roztoky a postup NRU

- roztok neutrální červeně (3,3 mg/ml)
- fixační roztok (1 g/100 ml CaCl₂ v 0,5% roztoku formaldehydu)
- lyzační roztok (1% CH₃COOH v 50% ethanolu)

Z destiček bylo odsáto expoziční médium a přidáno 200 µl roztoku neutrální červeně rozpuštěné v médiu do výsledné koncentrace 40 µg/ml. Poté byly destičky umístěny do inkubátoru, kde byly inkubovány 2–3 hodiny. Po inkubaci bylo odsáto veškeré médium a k buňkám pipetováno 100 µl fixačního roztoku. Destičky byly ponechány 15 minut při pokojové teplotě. Poté byl fixační roztok odsát, pipetováno 200 µl lyzačního roztoku a třepáno 30 minut na třepáče (25 °C, 300 rpm). Působením lyzačního roztoku dojde k rozrušení buněk, vylití neutrální červeně a obarvení suspence v jednotlivých jamkách.

Absorbance byla odečtena při 540 nm na přístroji Tecan Infinite M200 v programu Magellan, naměřené hodnoty byly převedeny do programu Microsoft Excel a dále zpracované. Od všech získaných hodnot byl odečtený průměr hodnoty absorbance pozitivní kontroly, jež představuje 0% viabilitu buněk, dále byly výsledné hodnoty absorbancí přepočítány na procenta pomocí průměrné hodnoty negativní kontroly (100%

viabilita). Následně bylo procentuální vyjádření buněčné viability v jednotlivých sloupcích zprůměrováno a byla stanovena směrodatná odchylka. Každý experiment byl minimálně dvakrát zopakován, do grafu byl vnesen průměr výsledků jednotlivých experimentů společně s odpovídající směrodatnou odchylkou.

4.5 Ovlivnění buněk pro Western blotting a qRT-PCR analýzu

Diferencované HepaRG buňky byly ovlivněny citralem a induktory (rifampicin, β -naftoflavon, oltipraz). Zásobní roztoky induktorů a jednotlivých koncentrací citralu byly připraveny rozpuštěním látek v DMSO. Příprava roztoků probíhala vždy v laminárním boxu.

Zásobní roztoky byly připraveny 1000x koncentrovanější, pomocí základních výpočtů byly připraveny koncentrované zásobní roztoky: 10 mM rifampicin, 10 mM β -naftoflavon, 30 mM oltipraz, 10 mM citral, 30 mM citral a 100 mM citral. Následně byly takto koncentrované roztoky ještě 1000x zředěny v růstovém médiu, aby výsledná koncentrace látek v médiu byla: 10 μ M rifampicin, 10 μ M β -naftoflavon, 30 μ M oltipraz, 10 μ M citral, 30 μ M citral, 100 μ M citral. Výsledný objem rozpouštědla (0,1% DMSO) je tak všude stejný a nízký. Tomu odpovídá také kontrola (rovněž 0,1% DMSO), která „neutralizuje“ případný vliv nízké koncentrace DMSO v buňkách.

Původní médium bylo z destiček odsáto a následně bylo přidáno médium s testovanými látkami v objemu odpovídajícímu velikosti jamky: 1 ml pro 12jamkové destičky (pro měření genové exprese pomocí polymerázové řetězové reakce - PCR), 2 ml pro 6jamkové destičky (pro měření proteinové exprese pomocí Western blottingu - WB). Ovlivněné buňky byly inkubovány 12 a 24 hodin pro PCR, 24 a 48 hodin pro WB při 37 °C, 5 % CO₂. Vzorky pro PCR (kontrola, induktory, citral) byly připraveny v triplikátech. Kontrolní vzorky pro WB byly připraveny v hexaplikátech, ostatní vzorky pro WB (induktory, citral) v kvadruplikátech.

Po inkubaci následoval sběr vzorků. Všechny kroky byly vykonávány na ledě. Z destiček bylo odsáto médium, buňky byly dvakrát opatrně a nesterilně opláchnuty 1–2 ml PBS (dle velikosti jamek). Po odsátí PBS bylo k buňkám přidáno 500 μ l Trizolu, který buňky zlyzuje (PCR, viz. kapitola 4.6.1 Izolace Trizolem), anebo 300 μ l lyzačního pufru, který, jak vypovídá název pufru, buňky zlyzuje (WB, viz. kapitola 4.7.1 Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blotting). Po 5minutovém působení zmíněných

činidel byly buňky pomocí škrabky odděleny od povrchu jamek a buněčná suspence byla přenesena do nových mikrozkušavek. Vzorky byly uloženy do hlubokomrazacího boxu a uchovávány při -80 °C.

4.6 Stanovení genové exprese

Polymerázová řetězová reakce (PCR) dozrála z laboratorně a časově náročné, nízkokapacitní kvalitativní gelové techniky na snadno automatizovanou, rychlou a vysoce výkonnou kvantitativní technologii. Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) se stala referenční technologií pro detekci a kvantifikaci nukleových kyselin ve výzkumném, diagnostickém, forenzním a biotechnologickém prostředí (Bustin, 2010).

Ačkoli nemusí být nutně citlivější než běžné RT-PCR (reverzní transkripce s následným PCR), mají testy RT-qPCR několik výhod. Jednou z nich je využití fluorescenční sondy, díky které je možné sledovat amplifikační produkty během každého cyklu PCR reakce. Existuje jen malá variabilita mezi testy, což pomáhá vytvářet spolehlivé a reprodukovatelné výsledky (Bustin a Mueller, 2005).

4.6.1 Izolace RNA Trizolem

Trizol je specifická směs fenolu a guanidinisothiokyanátu, což umožňuje selektivní izolaci celkové RNA (tRNA, rRNA, mRNA, microRNA) z malého množství tkání či buněk. Při izolaci RNA zůstává zachována její integrita během homogenizace tkáně, přidavkem chloroformu a následným stočením dojde k rozdělení směsi na vodnou a organickou fázi, přičemž RNA bude výhradně v horní vodné fázi. Následuje selektivní vysrážení RNA pomocí isopropanolu, který umožní izolaci čisté RNA (Chomczynski a Sacchi, 1987).

Těsně před izolací RNA je nezbytné ošetřit pracovní plochu laminárního boxu detergentem RNaseZAP a vychladit centrifugu na 4°C. Po ovlivnění buněk testovanými látkami a sběru buněk pomocí Trizolu do mikrozkušavek (viz. kapitola 4.5 Ovlivnění buněk pro Western blotting a qRT-PCR analýzu) bylo k buňkám přidáno 100 µl chloroformu a v ruce 15 sekund třepáno celým stojánkem najednou. Vzorky byli ponechány

2–3 minuty při laboratorní teplotě, poté stočeny v centrifuze vychlazené na 4 °C, 15 minut při 12 000 × g. Horní vodná fáze (cca 250 µl) byla opatrně přepipetována do nových, popsaných 1,5 ml zkumavek. Pokud by došlo k doteku špičky s mezifází nebo dolní

organickou fází, mohlo by dojít ke kontaminaci vzorku genomovou DNA a proteiny. Lze případně znovu stočit a odebrání horní fáze opakovat. K přepipetované horní fázi bylo přidáno 250 μ l isopropanolu a v ruce promícháno. Vzorky se nechaly stát při laboratorní teplotě 10 minut. Absolutní ethanol byl naředěn na 75% ethanol DEPC vodou (redestilovaná voda (ddH₂O) byla ošetřena 0,1% diethylpyrokarbonátem (DEPC), protřepána a nechána stát přes noc, poté autoklávována 20 minut při 120 °C). Vzorky byly stočeny v centrifuze 10 minut při 4 °C a 12 000 \times g. Po stočení byl pipetou opatrně odstraněn supernatant tak, aby nedošlo k odsátí pelety RNA, peleta byla omyta 0,5 ml 75% ethanol. Vzorky byly v ruce protřepány a stočeny na centrifuze 5 minut, při 4 °C a 7 500 \times g. Supernatant byl znovu opatrně odstraněn pipetou, nesmí dojít k odsátí pelety, která může být průhledná. Peleta byla usušena na vzduchu zhruba 2 minuty a rozpuštěna ve 40 μ l DEPC vody. Následně byly vzorky promíchány na vortexu, poté se nechaly stát asi 5 minut při laboratorní teplotě a znovu promíchány. Peleta byla rozpuštěná a vzorky byly uloženy na led.

4.6.2 Měření koncentrace a čistoty RNA na NanoDropu

Kvantifikace DNA a RNA pomocí absorpční a fluorescenční spektroskopie je po desetiletí výkonným nástrojem v biologických vědách. Klasické metody kvantifikace nukleových kyselin vyžadují vyplnění kyvet nebo kapilár vzorkem. Pokroky ve fotonických technologiích vyústily v průkopnický nízkoobjemový systém, který kombinuje technologii optických vláken s vlastními fyzikálními vlastnostmi vzorku, čímž se dramaticky sníží objemy měření a odstraní se tak potřeba kyvet a kapilár (Ausubel et al., 2001).

Nejprve je potřeba nachystat si pomůcky (pipetu, špičky, buničinu, redestilovanou vodu, kádinku na odpad, fix, USB-flash disk) a vzorky. Na PC byl otevřen program NanoDrop, na přístroji odklopena páčka a napipetováno 2 μ l vody na očištění. Po přiklopení páčky následovalo měření. Spodní a horní hrot byl otřen buničinou. V otevřené tabulce bylo nastaveno měření RNA. Po nanesení a změření 2 μ l vody jako slepého vzorku, byla voda otřena buničinou. Vzorky byly jednotlivě promíchány na vortexu a napipetovány na spodní hrot. Do počítače byl vždy napsán název vzorku a změřena jeho koncentrace RNA. Z NanoDropu byla celá tabulka s údaji exportována a uložena na flash disk.

Z tabulky je možné vyčíst následující údaje: koncentraci; čistotu I (kontaminace proteiny) – poměr absorbancí A260(DNA)/A280(proteiny) by měl být větší než 1,8; čistotu II (kontaminace fenolem) – hodnota by se měla blížit 2, ale většinou je kolem 1.

Po měření na NanoDropu následovalo ošetření DNasou. Také je možné vzorky opět uložit do hlubokomrazícího boxu při -80 °C pro pozdější zpracování.

4.6.3 Ošetření DNasou

4.6.3.1 Příprava roztoků pro ošetření DNasou a postup

- DEPC H₂O – redestilovaná voda (ddH₂O) byla ošetřena 0,1% diethylpyrokarbonátem, protřepána a nechána stát přes noc, poté autoklávována 20 minut při 120 °C
- Zásobní roztok 0,5 M EDTA pH 8,0 – bylo naváženo 18,61 g EDTA a rozpuštěno v cca 80 ml DEPC vody, postupně bylo přidáno 2 g NaOH, dokud se EDTA nerozpustila (pH 8) a poté doplněno vodou do 100 ml
- 0,1 M EDTA pH 8,0 – naředěný zásobní roztok 0,5 M EDTA a DEPC H₂O v poměru 1:4
- DNasa a DNase pufr

K odstranění případné kontaminace vzorků genomovou DNA slouží ošetření vzorků RNA DNasou, která je specifická vůči DNA. Z koncentrace RNA bylo vypočítáno v kolika mikrolitrech vzorku jsou 4 µg RNA a kolik je zapotřebí přidat DEPC H₂O. DNasa byla naředěna pufrům v poměru 1:3 podle počtu vzorků (42 vzorků + 3 navíc).

Byla připravena reakční směs o celkovém objemu 30 µl do 0,5 ml zkumavek:

- 4 µg RNA (přepočítat podle změřené koncentrace)
- x µl DEPC H₂O (dopočítat do objemu 26 µl)
- 4 µl naředěné DNasy

K vypočítanému množství DEPC H₂O bylo přidáno odpovídající množství RNA a 4 µl naředěné DNasy. Vzorky byly promíchány, mírně stočeny a inkubovány

v termomixéru Eppendorf 25 minut při 37 °C s frekvencí třepání 500 rpm. Poté byl ke vzorkům přidán 1,5 µl 0,1 M EDTA, následovalo opět mírné stočení a inkubace 10 minut při 75 °C (inaktivace DNasy). Vzorky byly vyndány z termomixéru a umístěny do ledu, dále bylo ke každému přidáno 8,5 µl DEPC H₂O (celkový objem vzorků je 40 µl). Výsledná koncentrace ošetřené RNA je 0,1 µg/µl. Takto ošetřená RNA byla připravena na reverzní transkripci. Vzorky byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

4.6.4 Reverzní transkripce

Principem reverzní transkripce je převedení RNA reverzní transkriptázou (RNA-dependentní DNA polymerasa) na jednořetězcovou cDNA (complementary DNA) s použitím jednoho primeru (Bustin a Mueller, 2005).

4.6.4.1 Použité reagensie a postup

- Reverzní transkriptasa (RT) – ProtoScript II
- Reakční pufr – dodáván spolu s RT
- DTT – 10 ×, dodáván s RT
- RNaseIN – inhibitor RNasy
- Směs deoxynukleotidů (dNTP) – koncentrace se liší u každého výrobce, 5 mM
- náhodné hexamery – N6
- DEPC H₂O

Z 8 µl RNA ředěné na 0,1 µg/µl a 1 µl náhodných hexamerů byla připravena směs do 0,2 ml zkumavek. Vzorky byly promíchány na vortexu, stočeny a vloženy do zapnutého PCR cykléru (MJ mini, BioRad). Po zaklapnutí víka a dotažení zeleným kolečkem byla v menu vybrána metoda PMCDNA a proces byl spuštěn tlačítkem RUN. V PCR cykléru se vzorky předehejí 5 minut na 65 °C, poté byl cyklér pozastaven tlačítkem PAUSE, bylo povoleno zelené kolečko, otevřen cyklér a vzorky byly vyndány do chladicího stojánku. Během zahřívání byl připraven mastermix RT dle počtu vzorků (+ 3 navíc). Bylo smícháno:

- 4 µl reakčního pufru 5 ×
- 2 µl DTT
- 4 µl dNTPs
- 0,5 µl RT
- 0,5 µl DEPC H₂O

Ke stočeným vzorkům umístěným v mrazicím stojánku bylo přidáno 11 µl mastermixu RT, promíchané a stočené vzorky byly dány zpět do cykléru a byl zmáčknut ENTER. Tato reakční směs (celkem 20 µl) je nejdříve zahřáta 10 minut na 25 °C, poté zahřívána 50 minut na 42 °C (syntéza cDNA) a 5 minut na 85 °C (denaturace RT). Po reakci bylo do směsi přidáno 120 µl redestilované vody, čímž byla připravená cDNA zředěna 7 ×. Do následných PCR reakcí bylo přidáváno 2 µl ředěné cDNA (odpovídá 20 ng RNA). Takto připravenou cDNA lze uchovávat při -20°C.

4.6.5 Kvantitativní PCR v reálném čase

4.6.5.1 Reagencie pro kvantitativní PCR v reálném čase a postup

- Směs SYBR Green I – 2 × koncentrovaný, obsahuje: DNA-polymerasu, dNTPs, SGI a pufr
- Forward primer – ředěný na koncentraci 5 µM
- Reverse primer – ředěný na koncentraci 5 µM
- redestilovaná voda
- ředěná cDNA (1:4)

Do 0,5 ml mikrokumavky byl napipetován mastermix pro cílový či referenční gen, jehož objem byl vypočítán pro 14 vzorků v duplikátech. Objem mastermixu na jednu jamku 384jamkové destičky byl 6 µl (4,2 µl SG mixu, 0,32 µl F+R primeru a 1,48 µl vody). Mastermix byl automatickou pipetou přenesen na 384jamkovou destičku, poté k němu byly přidány 2 µl vzorku, výsledný objem tak činil 8 µl na jamku. Do jamek s negativní kontrolou (NTC, *no template control*), která umožní zjistit případnou

kontaminaci, byla místo cDNA pipetována redestilovaná voda. Destička byla uzavřena lepící folií, stočena v centrifuze a umístěna do PCR cykléru, dále byl spuštěn program QuantStudio 6. Data byla exportována do programu Microsoft Excel. Pro normalizaci byl použit geometrický průměr Ct hodnot dvou referenčních genů: tyrosin-3-monooxygenasa/tryptofan-5-monooxygenasa aktivačního proteinu zeta (YWHAZ) a sukcinátdehydrogenasa (SDHA). Relativní exprese byla spočítána $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodou. V Tab. 1 jsou uvedeny nukleotidové sekvence použitých primerů.

Tabulka 1 - Nukleotidové sekvence použitých primerů

Gen	Forward primer	Reverse primer
CYP1A2	CTTCCCTGAGAGTAGCGATGAGA	GCAGTCTCCACGAACTCATGAG
CYP2B6	CAGCTTCCGAGGGTACATCA	AGGATTGAAGGCGTCTGGTT
CYP2C	TTTGGGATGGGAAGAGGAG	GGAGCACAGCCCAGGAT
CYP3A4	CCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGG	CTGGTGTTCAGGCACAGA
AKR1C	ATGAGGAGCAGGTTGGACTG	GCTTTGAAGTGTAGAATATGTCTTCT
CBR1	TTGGTACCCGAGATGTGTGC	CTTGGGGTTTTATTAGAGGGAG
CAT	GAGAAGTGC GGAGATTCAACAC	TCACATAGAATGCCCGCACC
GPX1	TATCGAGAATGTGGCGTCCC	TCTTGGCGTTCTCCTGATGC
GPX4	GAGATCAAAGAGTTCGCCGC	TGCTGAACATATCGAATTTGACG
GR	TGCGTGAATGTTGGATGTGT	CCCTCACA ACTTGGAAAGCC
GSTA	TGCCAGCAAATACAACCTCT	TCACCCAAATCTGCTATACCTTC
GSTP	AGCCTTTTGAGACCCTGCTG	GTCAGCGAAGGAGATCTGGTC
SOD1/2	ATCCAGAAAACACGGTGGGC	TCACATTGCCCAAGTCTCCA
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT
SDHA	TGGGAACAAGAGGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG

4.7 Stanovení proteinové exprese

Stanovení proteinové exprese probíhalo pomocí metody Western blotting, což je biochemická technika používaná v buněčné a molekulární biologii. Použitím westernového přenosu je možné identifikovat specifické proteiny z komplexní směsi proteinů extrahovaných z buněk. Technika kombinuje elektroforézu a imunoanalýzu, dochází k separaci proteinů podle velikosti, přenosu na pevný podklad, značení cílového proteinu pomocí specifické primární a sekundární protilátky a vizualizaci (Yang, 2012).

4.7.1 Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blotting

4.7.1.1 Zásobní roztoky pro ředění vzorků

Zásobní roztok 4 × SDS vzorkového pufru pro denaturující elektroforézu byl připraven smícháním:

- 4 ml 1 M Tris/HCl pufru pH 6,8
- 9,41 ml 85% glycerolu
- 1,2 g SDS
- 0,617g DTT
- 0,1 g bromfenolové modři
- doplněno do 20 ml redestilovanou vodou

Lyzační pufr byl připraven smícháním:

- 50 ml 1 M Tris/HCl pufru pH 7,4
- 8,766 g NaCl
- 117,65 ml 85% glycerolu
- 10 ml Triton X-100
- 0,58 g EDTA
- 0,76 g EGTA
- 8,52 g β -glycerolfosfátu
- 2,09 g fluoridu sodného
- 4,46 g pyrofosfátu sodného
- 0,3085 g DTT
- 0,03678 g vanadičnanu sodného
- doplněno do objemu 1 l redestilovanou vodou

Po ovlivnění buněk testovanými látkami a sběru buněk pomocí lyzačního pufru do mikrozkušavek (viz. kapitola 4.5 Ovlivnění buněk pro Western blotting a qRT-PCR analýzu) byly vzorky zhomogenizovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru (3×10 sekund) a 10 minut ponechány na ledě. Dále byly vzorky vloženy do centrifugy předem vychlazené na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a centrifugovány 5 minut při $12\,000 \times g$. Po stočení byl odebrán alikvotní objem supernatantu z každého vzorku kvadruplikátu/hexaplikátu do jedné nové mikrozkušavky, tím vznikl směsný vzorek. Následně byla stanovena celková koncentrace proteinu ve směsném vzorku (viz. kapitola 4.7.2 BCA stanovení bílkoviny).

Dále byly vzorky dle vypočítané koncentrace (viz. kapitola 4.7.2 BCA stanovení bílkoviny) naředěny pomocí lyzačního pufru a koncentrovaného vzorkového pufru ($4 \times \text{SDS}$). Po naředění byly vzorky denaturovány 5 minut při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, umístěny na led a připraveny k elektroforéze. Takto naředěné a denaturované vzorky lze uchovávat v mrazicím boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před každou novou elektroforézou byly vzorky znovu denaturovány a umístěny na led.

4.7.2 BCA stanovení bílkoviny

Kyselina bicinchoninová (BCA) je široce používána pro stanovení koncentrace proteinu z důvodu jejího snadného použití a vysoké citlivosti. Test je založen na dvou chemických reakcích, nejprve probíhá redukce měďnatých iontů (Cu^{2+}) bílkovinou na měďné ionty (Cu^{+}), druhým krokem je chelatace jednoho Cu^{+} se dvěma BCA molekulami za vzniku intenzivního purpurového komplexu (Huang, 2010), který má maximální absorbanci při 562 nm a jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku (Smith et al., 1985). Koncentrace proteinu v roztoku se stanoví porovnáním této absorbance se standardní křivkou absorbance hovězího sérového albuminu (BSA) (Huang, 2010).

4.7.2.1 Příprava roztoků a kalibrační přímka

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

Pro stanovení koncentrace proteinu byla použita sada Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Zásobní roztok BSA (2 mg/ml) byl do jednotlivých zkumavek naředěn redestilovanou vodou na požadované koncentrace: 1000 µg/ml, 800 µg/ml, 600 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml a 0 µg/ml. Jak již bylo naznačeno výše, roztok BSA slouží jako standardní roztok k vytvoření kalibrační křivky a výpočtu koncentrace proteinu ve vzorcích. Pro stanovení proteinové koncentrace bylo ze směsného vzorku odebráno 7 µl, které byly následně 8 × naředěny redestilovanou vodou, aby tato koncentrace spadala do rozmezí koncentrací kalibrační křivky. Do 96jamkové destičky bylo v kvadruplikátu napipetováno 10 µl roztoku ze zkumavek se známým obsahem bílkoviny (0 až 1000 µg/ml) a 10 µl roztoku vzorku. Dále k nim bylo pomocí multikanálové pipety přidáno 200 µl pracovního roztoku C. Po důkladném promíchání byla 96jamková destička inkubována 30 minut při 37 °C a 300 rpm. Absorbance roztoku byla měřena při 562 nm pomocí přístroje Tecan Infinite M200 v programu Magellan.

Po změření koncentrace bílkoviny ve vzorcích bylo vypočítáno ředění jednotlivých vzorků lyzačním pufrům s inhibitory proteas a zásobním vzorkovým pufrům (4 × SDS) tak, aby koncentrace bílkoviny byla 1 µg/µl a SDS tvořilo ¼ z celkového objemu. Takto naředěné vzorky jsou připraveny pro denaturující elektroforézu (Smith et al., 1985).

4.7.3 Elektroforéza a Western blotting

4.7.3.1 Zásobní roztoky pro elektroforézu proteinů na polyakrylamidovém gelu

- 4 M HCl – Do 150 ml redestilované vody bylo přidáno 88 ml koncentrované HCl a doplněno redestilovanou vodou do 250 ml. Roztok byl uchováván v lednici.
- AA + bisAA (akrylamid + bis-akrylamid) – Komerčně dodaný 40% (w/v) roztok uchovávaný v lednici.
- 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8 – Bylo naváženo 18,5 g Trisu, přidáno 75 ml redestilované vody a na magnetické míchačce rozpuštěno. Na pH metru bylo upraveno pH pomocí 4 M HCl a v odměrné baňce doplněno do 100 ml. Roztok byl uchováván v lednici.
- 0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8 – Bylo naváženo 6 g Trisu, přidáno 75 ml redestilované vody a na magnetické míchačce rozpuštěno. Na pH metru bylo

upraveno pH pomocí 4 M HCl a v odměrné baňce doplněno do 100 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

- 10% SDS – Bylo naváženo 10 g SDS, rozpuštěno v 80 ml redestilované vody a v odměrné baňce doplněno do 100 ml. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.
- Isobutanol nasycený vodou – Byl smíchán čistý isobutanol s redestilovanou vodou a protřepán. V horní vrstvě je isobutanol nasycený vodou. Roztok byl uchováván v lednici.
- 10% APS – Těsně před použitím bylo rozpuštěno 40 mg persíranu amonného ve 400 μ l redestilované vody. Toto množství odpovídá přípravě dvou gelů (tloušťka gelové vrstvy 1,5 mm).
- Koncentrovaný elektrodotový pufr – Bylo naváženo 72 g glycinu, 15 g Trisu, 5 g SDS a rozpuštěno v 900 ml redestilované vody. Na pH metru bylo upraveno pH na 8,3 pomocí 4 M HCl a v odměrné baňce doplněno do 1000 ml, poté rozlito do 100 ml plastových nádobek a zamraženo.
- Elektrodotový pufr – Bylo smícháno 100 ml zásobního koncentrovaného elektrodotového pufru s 400 ml redestilované vody.

4.7.3.2 Příprava gelu

Nalévací stojánek, skla, skla se spacerem, spony, hřebínky byly důkladně omyty saponátem, opláchnuty redestilovanou vodou a lihomethanolem. Po zaschnutí bylo sklo a sklo se spacerem přiloženo k sobě a spojeno sponami. Aby gel nevytekl, je možné skla zesponu obalit parafilmem. Spojená skla byla přiložena na gumovou podložku v nalévacím stojánku, přitlačena a přichycena vrchním kolíkem. Mezi takto připravená skla byl pipetován roztok separačního gelu, který byl připraven následovně.

Pro přípravu dvou 10% separačních gelů o výsledné tloušťce 1,5 mm bylo smícháno:

- 9,8 ml redestilované vody
- 5 ml 1,5 M Tris-HCl pufru pH 8,8
- 5 ml 40% (w/v) roztoku AA + bisAA
- 200 μ l 10% SDS

- 200 μ l roztoku APS
- 16 μ l TEMED (nutno pracovat v digestoři)

Roztok na přípravu separačního gelu byl pořádně promíchán a ihned pipetou nanesen mezi skla do výšky cca 3 cm od horního okraje skla se spacerem. Aby se zabránilo nadměrnému odpařování vody z povrchu gelu, vyrovnal se povrch gelu a odstranily se případné bublinky, byl separační gel opatrně převrstven cca 200 μ l isobutanolu nasyceného vodou. Gel polymeroval 60 minut, poté byl isobutanol opatrně slit a prostor mezi skly vysušen filtračním papírem tak, aby se nedotkl gelu. Dále byl namíchán roztok na přípravu zaostřovacího gelu.

Pro přípravu dvou 4% zaostřovacích gelů o výsledné tloušťce 1,5 mm bylo smícháno:

- 6,42 ml redestilované vody
- 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pufru pH 6,8
- 0,98 ml 40% (w/v) roztoku AA + bisAA
- 100 μ l 10% SDS
- 200 μ l roztoku APS
- 16 μ l TEMED (nutno pracovat v digestoři)

Roztok na přípravu zaostřovacího gelu byl pořádně promíchán a ihned pipetou opatrně nanesen mezi skla na spodní gel až po horní okraj krycího skla. Následně byl mezi skla zasunut hřebínek až po drážky tak, aby mezi gelem a hřebínkem nevznikly bublinky. Gel byl nechán polymerovat 30 minut. Takto připravené gely lze uchovávat v chladícím boxu nanejvýš 2–3 dny.

4.7.3.3 Denaturující elektroforéza

Náředené vzorky byly umístěny do předehřátého termobloku a nechaly se 5 minut denarovat při 95 °C, poté byly dány na led. Skla s gely byla vytažena ze stojánku, opláchnuta pod tekoucí vodou a opatrně z nich byly vyndány hřebínky. Jamky byly propláchnuty redestilovanou vodou. Poté byla skla s gely přitlačena na těsnění stojánku

se soustavou elektrod krycím sklem dovnitř, přitažena sponami a vložena do elektroforetické vany. Do vnitřního prostoru stojánku se soustavou elektrod byl nalit elektrodotový pufr tak, aby byl ponořen celý gel, vně soustavy elektrod byl elektrodotový pufr nalit po výrobcem vyznačené rysky. Pufr z vnitřní části byl po skončení elektroforézy vylit a vždy byl použit nový pufr. Pufr z vnější části byl použit opakovaně.

Denaturované a zchlazené vzorky byly promíchány na vortexu a pomocí pipety bylo do jamek opatrně napipetováno 20 μ l vzorku. Do krajních jamek bylo napipetováno 1,5 μ l molekulového standardu. Vanička byla přiklopena víčkem, umístěna do nádoby s ledem a připojena ke zdroji. Bylo nastaveno napětí 90 V a spuštěna elektroforéza. Vzorky se nechaly separovat až do chvíle, kdy dosáhly rozhraní zaostřovacího a separačního gelu (cca 30 minut), poté došlo ke zvýšení napětí na 150 V. Elektroforéza byla vypnuta, až čelo doputovalo ke spodnímu okraji gelu. Stojánek byl vytažen z elektroforetické vaničky, elektrodotový pufr z vnitřní části byl vylit do výlevky a z vnější části přelit zpět do lahve a uchovávan v lednici. Po povolení spon byla skla s gelem vytažena a pomocí klínku rozevřena. Zaostřovací gel a modře obarvená spodní část gelu byly odstraněny.

4.7.4 Imunobloting

4.7.4.1 Zásobní roztok na imunobloting a postup

- Blotovací pufr – Bylo naváženo 6,06 g Trisu (25mM) a 28,8 g glycinu (192 mM) a rozpuštěno v 500 ml redestilované vody. Dále bylo přidáno 400 ml methanolu a doplněno v odměrné baňce do 2000 ml. Roztok byl uchovávan v lednici.
- 0,1 M Tris pufr, pH 8,0 – Bylo naváženo 12,11 g Trisu a rozpuštěno v 800 ml redestilované vody. Na pH metru bylo upraveno pH na 8,0 pomocí 4 M HCl a v odměrné baňce doplněno do 1000 ml. Roztok byl uchovávan v lednici.
- 0,05% TBST (směs tris-pufrovaného fyziologického roztoku (TBS) a Tweenu 20) – Bylo naváženo 8,77 g NaCl a rozpuštěno v 300 ml redestilované vody. Poté bylo přidáno 0,5 ml Tweenu 20, 100 ml 0,1 M Tris pufru (pH 8,0) a doplněno v odměrné baňce do 1000 ml. Roztok byl uchovávan v lednici.
- TBS – Bylo naváženo 8,77 g NaCl a rozpuštěno v 300 ml redestilované vody. Poté bylo přidáno 100 ml 0,1 M Tris pufru (pH 8,0) a doplněno v odměrné baňce do 1000 ml. Roztok byl uchovávan v lednici.

- Primární protilátky – Byly použity zásobní protilátky (Abcam) a zředěny dle instrukcí výrobce TBST pufrům s 1% BSA. Zředěné protilátky se dají použít opakovaně, byly skladovány v mrazícím boxu a před použitím včas vytaženy a rozmrazeny.
- Sekundární protilátky – Byly použity zásobní protilátky (Santa Cruz Biotechnology) a zředěny dle instrukcí výrobce TBST pufrům s 1% BSA. Zředěné protilátky se dají použít opakovaně, byly skladovány v mrazícím boxu a před použitím včas vytaženy a rozmrazeny.

Oříznutý gel z předchozího kroku, nitrocelulósová membrána a dva kusy silného filtračního papíru byly vloženy do blotovacího pufru v plastové krabici s víčkem asi na 20 minut. Blotování probíhalo pomocí přístroje Trans-Blot Turbo (BioRad). Do vysunutého šuplíku z přístroje byl blotovací sendvič skládán směrem odspodu nahoru. První byl vložen jeden silný filtrační papír, poté membrána, gel a druhý filtrační papír. Gel je třeba uhladit válečkem, aby mezi ním a membránou nevznikly bubliny. Na blotovací šuplík bylo opatrně přiloženo víčko a uzamknuto kolečkem. Přístroj s vloženým šuplíkem byl zapnut tlačítkem na boku přístroje. Na obrazovce se zobrazilo Select protocol, byl vybrán List → BioRad defined → 2 MINI či 1 MIDI, v menu byl poté vybrán 1,5 mm gel a čas byl nastaven na 25 minut. Metoda byla spuštěna tlačítkem Run, podle toho, kde byly gely umístěny bylo vybráno A: Run či B: Run, popřípadě oboje. Po skončení přenosu byl šuplík vytažen, odemknut a víčko opatrně sundáno. Po nadzvednutí filtračního papíru bylo zkontrolováno, zda se barva z molekulového standardu přenesla na membránu. Na membránách byly propisovací tužkou poznačeny nejvýraznější proužky markeru – 25, 37, 50, 75 kDa (Towbin et al., 1979).

4.7.5 Detekce proteinů

Ihned po označení nejvýraznějších proužků markeru byla membrána nůžkami rozstříhána na proužky podle velikosti proteinů, které budou detekovány. Jednotlivé proužky membrány byly pinzetou opatrně vloženy do speciálních krabiček na Western blotting s redestilovanou vodou a třikrát opláchnuty, aby byl odstraněn zbytek blotovacího pufru. Krabičky byly umístěny na laboratorní kývačku, kde byly po celou dobu inkubace. Zatímco probíhalo blotování, byl připraven roztok 5% mléka v 0,05%

TBST pufru, který byl po opláchnutí membrán redestilovanou vodou nalit na membrány. Povrch membrány je nutné tzv. zablokovat, jelikož je schopný vázat proteiny (antigeny i následně přidané protilátky). Proteiny mléčného kaseinu z roztoku se tak mohou navázat na všechna místa membrány, kam se dosud nenařadily proteiny při přenosu, což výrazně pomáhá snížit šum pozadí a zabraňuje falešné pozitivitě. Blokování mlékem probíhalo alespoň dvě hodiny, poté bylo mléko slito. Membrány byly opláchnuty redestilovanou vodou, po okapání na papír byla do krabiček nalita primární protilátka a nechána inkubovat přes noc v chladicí místnosti. Druhý den byly primární protilátky přelity zpět do zkumavek a zamrazeny pro další použití. Následně byly membrány oplachovány 0,05% TBST pufrům 6 × 5 min. Poté byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou cca 90 minut. Použité komerčně dodávané myší nebo králičí sekundární protilátky proti primárním protilátkám jsou konjugovány s křenovou peroxidasou umožňující následnou vizualizaci. Po inkubaci byly membrány opět oplachovány 0,05% TBST pufrům 6 × 5 min. Po posledním opláchnutí byl do krabiček nalit roztok TBS, aby nedocházelo k dalšímu vymývání protilátek.

Pro detekci bylo použito chemiluminiscenční detekční činidlo (Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent), reakce probíhala na principu reakce činidla (substrátu) a již zmíněné křenové peroxidasy. Substrát byl připraven těsně před použitím smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1. Detekce probíhala na přístroji ChemiDoc MP Imaging systém (BioRad) pomocí programu Image Lab. Na proužek membrány, který byl opatrně vyndán z krabičky a pinzetou umístěn na eurofolii, bylo napipetováno zhruba 250 µl substrátu tak, aby byla pokryta celá plocha membrány. Roztok se dle instrukcí od výrobce nechal působit 5-6 minut při pokojové teplotě, poté byl přebytečný roztok odstraněn přidržením membrány proti papírovému ubrousku. Následně byl proužek na eurofolii umístěn do kamerového prostoru. V počítači byl zvolen program *Chemi*, doba expozice byla upravena dle intenzity bandů. Dále byla zhotovena fotografie membrány pomocí programu *Colorimetric*, což slouží k ujištění, že na membráně není nic, co by změnilo intenzitu bandů. K vyhodnocení byl použit tentýž program, ve kterém byly bandy manuálně označeny a data v programu Microsoft Excel včetně zhotovených fotografií byla uložena na USB-flash disk.

Následně byla provedena relativní kvantifikace studovaných proteinů, denzita jednotlivých proužků byla vztažena na denzitu proužku proteinu kalnexinu, což je protein endoplasmatického retikula, který je v buňkách trvale exprimován (Ellgaard a Frickel,

2003). Stanovení každého studovaného enzymu včetně stanovení kalnexinu bylo provedeno minimálně ve dvojím opakování. V programu Microsoft Excel byl následně vyhodnocen poměr intenzity signálu studovaného enzymu k intenzitě signálu proteinu kalnexinu ze stejné membrány. Hodnota míry exprese 1,0 byla přiřazena ke kontrolním vzorkům, které nebyly inkubovány s žádnou látkou. K této hodnotě byly následně vztaheny naměřené hodnoty exprese u ovlivněných vzorků. Dále byl z vypočítaných relativních expresí daných enzymů vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

4.8 Statistická analýza

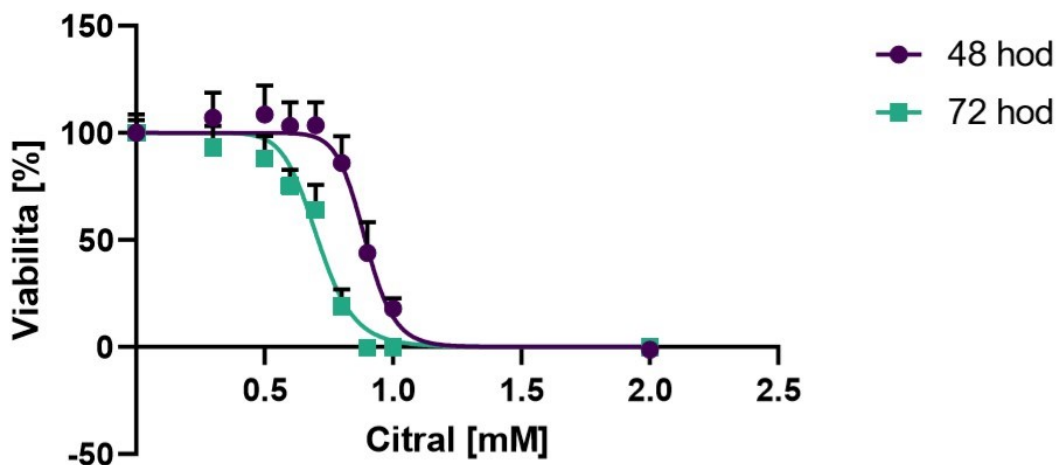
Všechny experimenty (vzorky pro PCR (kontrola, induktory, citral) byly připraveny v triplikátech, kontrolní vzorky pro WB byly připraveny v hexaplikátech, ostatní vzorky pro WB (induktory, citral) v kvadruplikátech) byly opakovány minimálně dvakrát. Výpočty byly provedeny v programu Microsoft Excel a GraphPad Prism verze 8.2.1. Statistická významnost byla hodnocena pomocí One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem. Změny byly považovány za významné, pokud $p < 0,05$.

5. VÝSLEDKY

5.1 Buněčná viabilita – NRU test

Pro stanovení vlivu citralu na životnost HepaRG buněk byl použit test cytotoxicity neutrální červení. Akumulované množství neutrální červeně v buňkách je přímo úměrné množství živých buněk. Pro hodnocení cytotoxicity byla použita hodnota IC_{50} , která byla vyhodnocena pomocí programu GraphPad použitím nelineární regrese a následně rovnicí: inhibitor vs. normalizovaná odpověď – variabilní sklon.

Vliv různých koncentrací citralu (5, 4, 3, 2, 1; 0,5, 0,1; 0,01 mM) na HepaRG buňky byl vyhodnocen po 48 a 72 hodinách inkubace. Jelikož HepaRG buňky při 0,5 mM koncentraci citralu vykazovali téměř 100% viabilitu a při 1,0 mM již 0% viabilitu, byl NRU test proveden znovu, kde došlo k úpravě koncentrací citralu (0,3; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1; 2 mM). Následně byl ze získaných výsledků sestrojen graf závislosti viability buněk [%] na koncentraci citralu [mM] (Obr. 4).



Obrázek 4 – Vliv citralu na viabilitu HepaRG buněk po 48 a 72 hodinách inkubace stanovené pomocí metody NRU. Každý bod je uveden jako procentuální podíl kontroly (100 %) a představuje průměr ze dvou měření $\pm SD$.

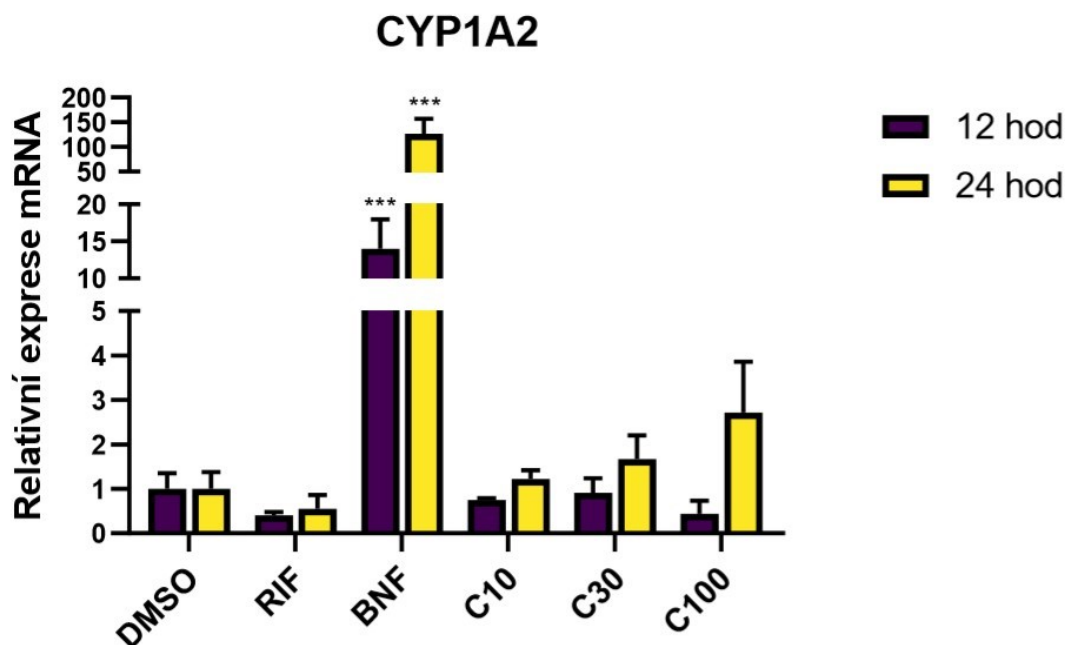
Z inhibiční křivky v grafu vyplývá, že při 72hodinové inkubaci buněčné linie s citralem postačí menší koncentrace citralu k usmrcení HepaRG buněk. Již 0,9 mM citral způsobí 0% viabilitu, v případě 48hodinové inkubace je to 2 mM citral. Hodnota IC_{50} byla u 48hodinové inkubace 0,892 mM a u 72hodinové inkubace 0,708 mM.

5.2 Vliv citralu na expresi mRNA

V následujících kapitolách je popsán vliv induktorů (10 μM rifampicin, 10 μM β -naftoflavon) a citralu (10 μM , 30 μM , 100 μM) na expresi mRNA biotransformačních enzymů v HepaRG buňkách. Dále byl zkoumán vliv citralu ve stejných koncentracích na expresi mRNA antioxidantních enzymů, jako induktor byl použit oltipraz v 10 μM koncentraci. Každý bod v grafech představuje průměr z trojího měření duplikátů jednotlivých vzorků.

5.2.1 Vliv citralu na genovou expresi CYP1A2

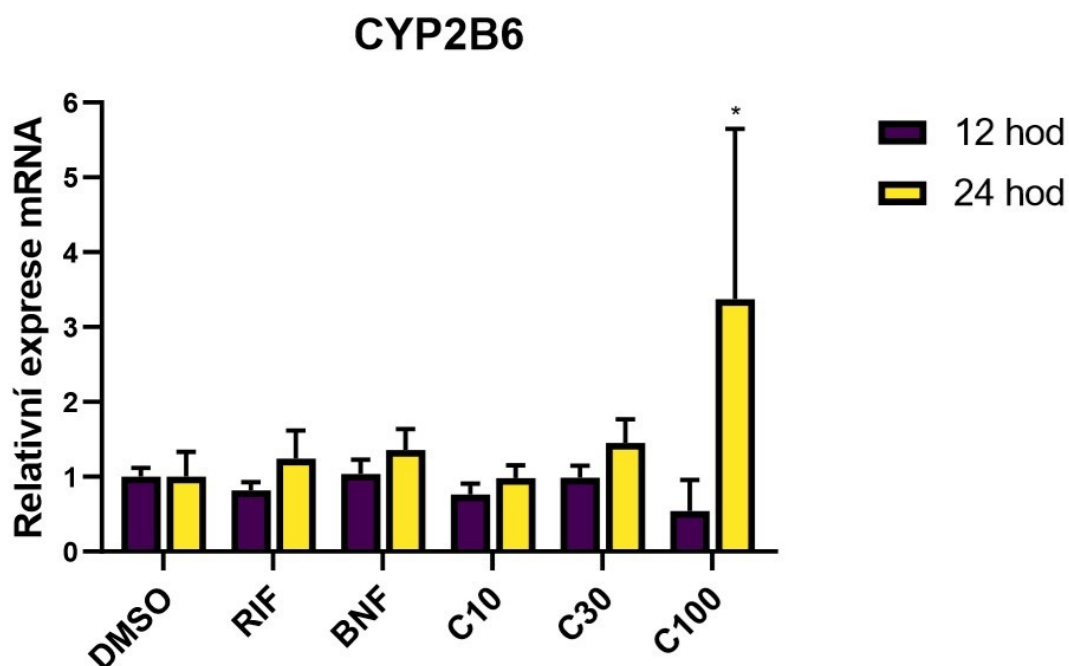
BNF je syntetický derivát přírodně se vyskytujícího flavonoidu, není toxický ani karcinogenní a indukuje expresi CYP1A prostřednictvím aktivace arylového uhlovodíkového receptoru (Xiao et al., 2009). V experimentu byla zaznamenána signifikantní změna exprese CYP1A2 v případě BNF, který indukoval tento enzym 14 \times při 12hodinové inkubaci a až 127 \times v případě 24hodinové inkubace. Citral 100 μM zvýšil expresi mRNA CYP1A2 3 \times po 24 hodinách inkubace, ale tento účinek nebyl statisticky významný (Obr 5).



Obrázek 5 – Vliv citralu na genovou expresi CYP1A2. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)

5.2.2 Vliv citralu na genovou expresi CYP2B6

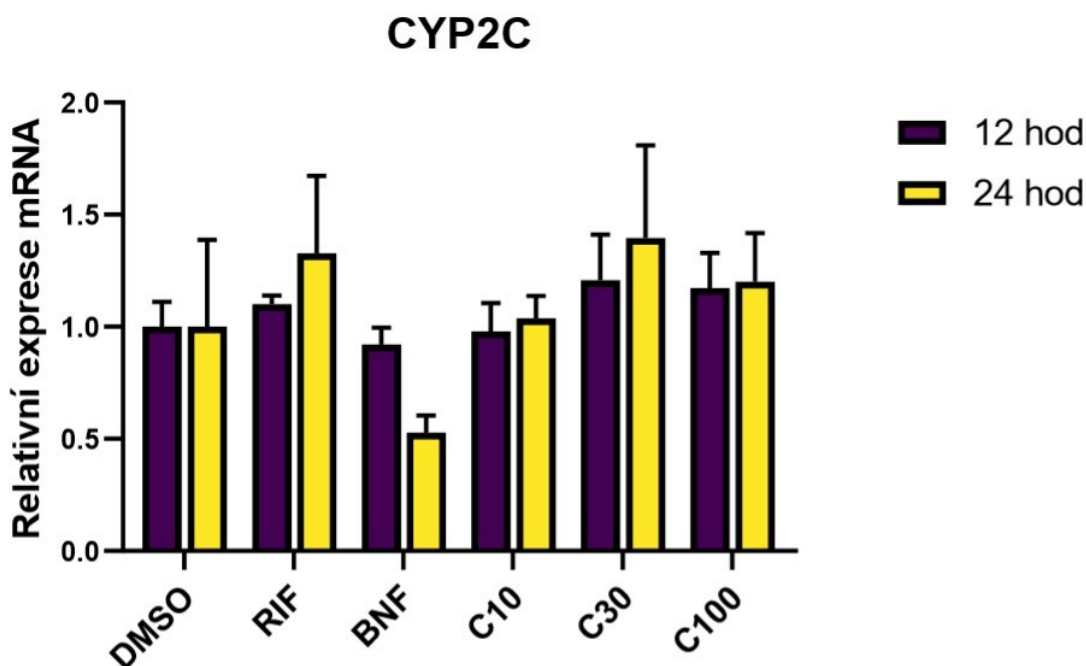
Změny genové exprese CYP2B6, které jsou uvedené v Obr. 6, nebyly u většiny studovaných látek statisticky významné, prakticky nedošlo k žádné indukci nebo inhibici tohoto enzymu. Signifikantní rozdíly jsou vidět pouze u 100 μ M citralu při 24hodinové inkubaci, kde citral indukoval expresi CYP2B6 3,4 \times , avšak SD byla více jak 2,28 (67,5 %). Při takto velké odchylce při měření nelze jednoznačně říct, že je citral induktorem tohoto enzymu.



Obrázek 6 – Vliv citralu na genovou expresi CYP2B6. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.3 Vliv citralu na genovou expresi CYP2C

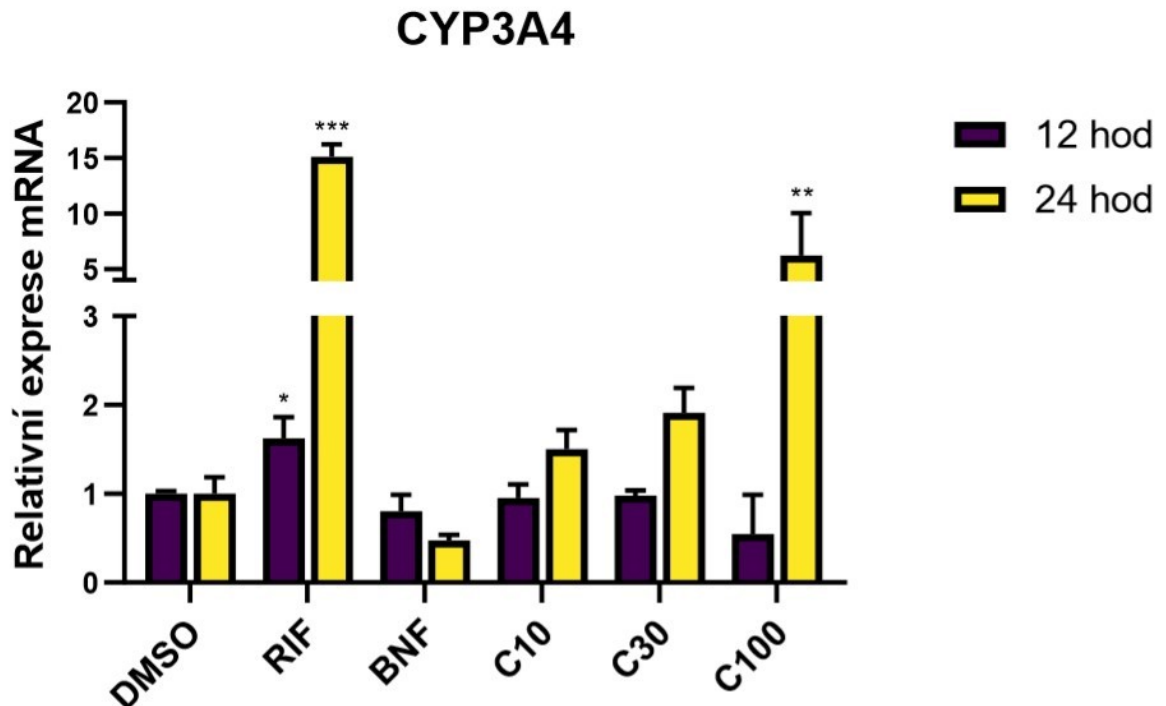
Pro stanovení genové exprese CYP2C byl použit primer, který je schopný zachytit všechny lidské isoformy tohoto enzymu: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. Z Obr. 7 vyplývá, že studované induktory ani citral nemají na genovou expresi CYP2C velký vliv. Lze pozorovat mírnou indukci RIF i 30 μ M citralu a mírnou inhibici BNF při 24hodinové inkubaci. Ve všech případech se však jedná o nesignifikantní změny v rámci směrodatné odchylky.



Obrázek 7 – Vliv citralu na genovou expresi CYP2C. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.4 Vliv citralu na genovou expresi CYP3A4

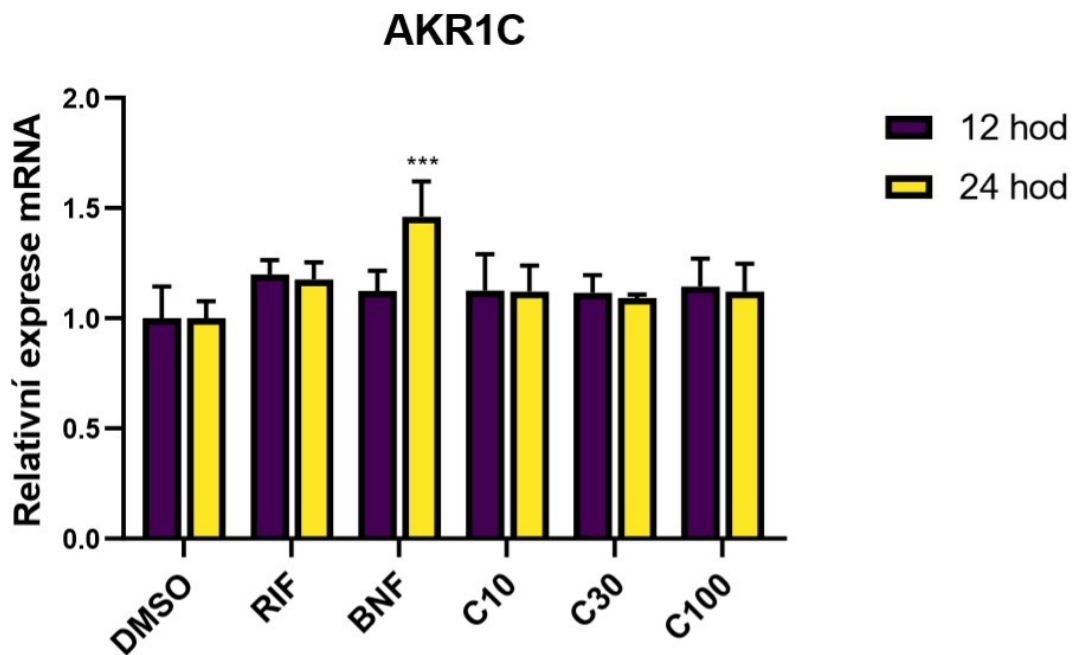
Rifampicin jakožto známý induktor CYP3A4 vykazoval signifikantní mnohonásobné zvýšení genové exprese tohoto enzymu, v případě 24hodinové inkubace až $15,1 \times$. O něco menší, ale také signifikantní indukce $6,2 \times$ byla zaznamenána v případě 24hodinové inkubace s citralem v $100 \mu\text{M}$ koncentraci (Obr. 8).



Obrázek 8 – Vliv citralu na genovou expresi CYP3A4. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37°C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)

5.2.5 Vliv citralu na genovou expresi AKR1C

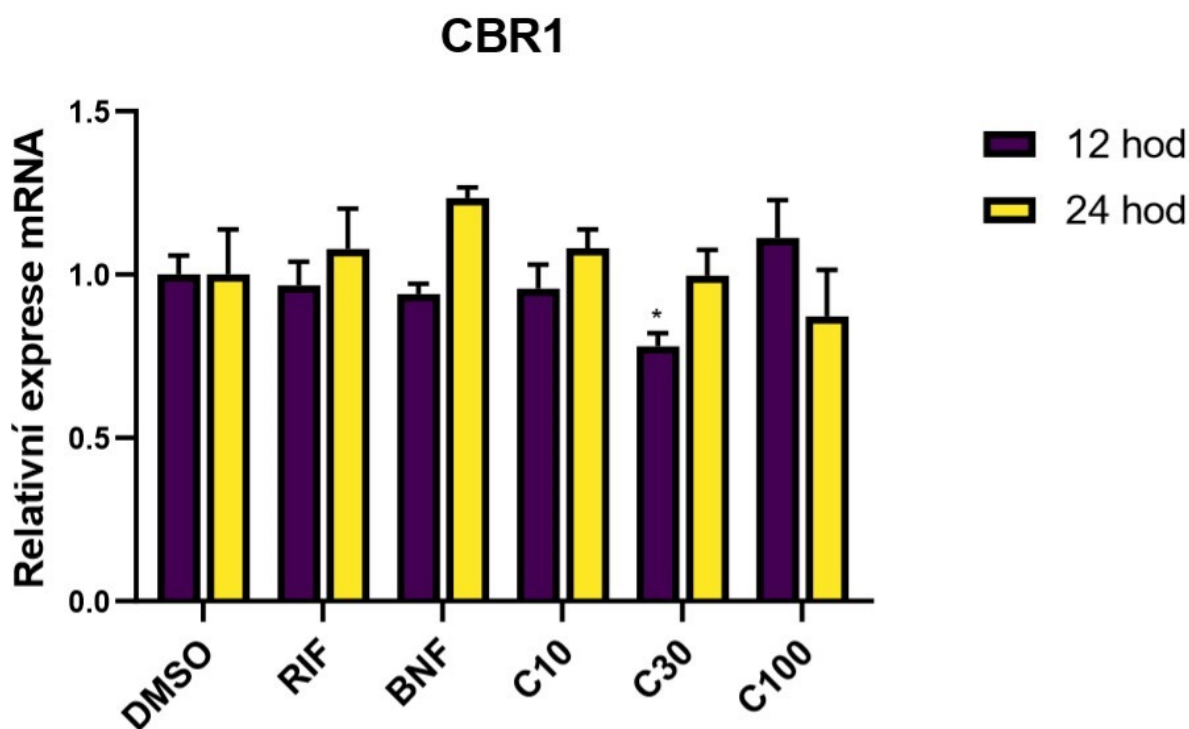
Rovněž jako v případě CYP2C byl i zde primer pro qPCR navržen způsobem, aby amplifikoval všechny čtyři lidské isoformy AKR1C1 – AKR1C4. Z Obr. 9 lze vyčíst, že RIF ani citral v žádné koncentraci neovlivnily expresi tohoto enzymu. Signifikantní změna byla zaznamenána pouze u BNF v případě 24hodinové inkubace, kde došlo k indukci enzymu 1,5 ×.



Obrázek 9 – Vliv citralu na genovou expresi AKR1C. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.6 Vliv citralu na genovou expresi CBR1

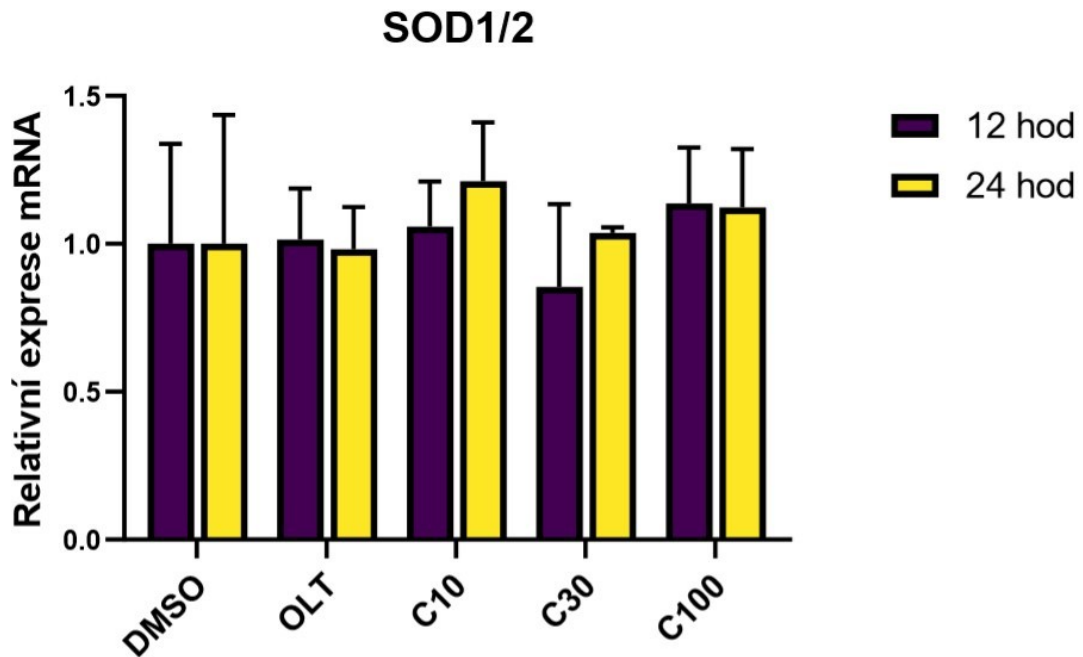
Pro stanovení genové exprese CBR1 byl použit speciálně navržený primer, který jiné isoformy karbonylreduktas neamplifikoval. Změny genové exprese CBR1 (Obr. 10) nebyly u většiny studovaných látek statisticky významné. U 30 μ M citralu při 12hodinové inkubaci došlo k poklesu exprese enzymu o 22 %. V porovnání s výsledky u dalších koncentrací citralu, kde k žádné inhibici nedošlo, je pravděpodobné, že se jedná o chybu měření.



Obrázek 10 – Vliv citralu na genovou expresi CBR1. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.7 Vliv citralu na genovou expresi SOD

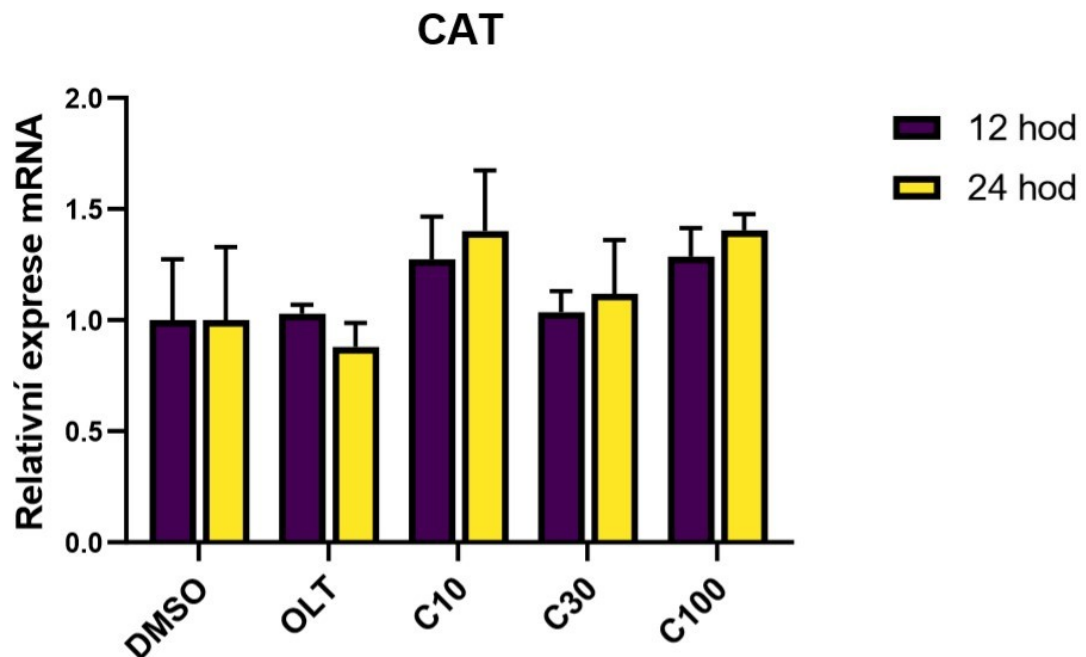
Primer použitý pro stanovení genové exprese superoxiddismutasy byl navržen tak, aby amplifikoval dvě intracelulární isoformy SOD, konkrétně SOD1 a SOD2. Z Obr. 11 vyplývá, že 10 μ M oltipraz ani citral v různých koncentracích neměly v případě 12hodinové ani 24hodinové inkubace žádný vliv na expresi tohoto enzymu.



Obrázek 11 – Vliv citralu na genovou expresi SOD1/2. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.8 Vliv citralu na genovou expresi CAT

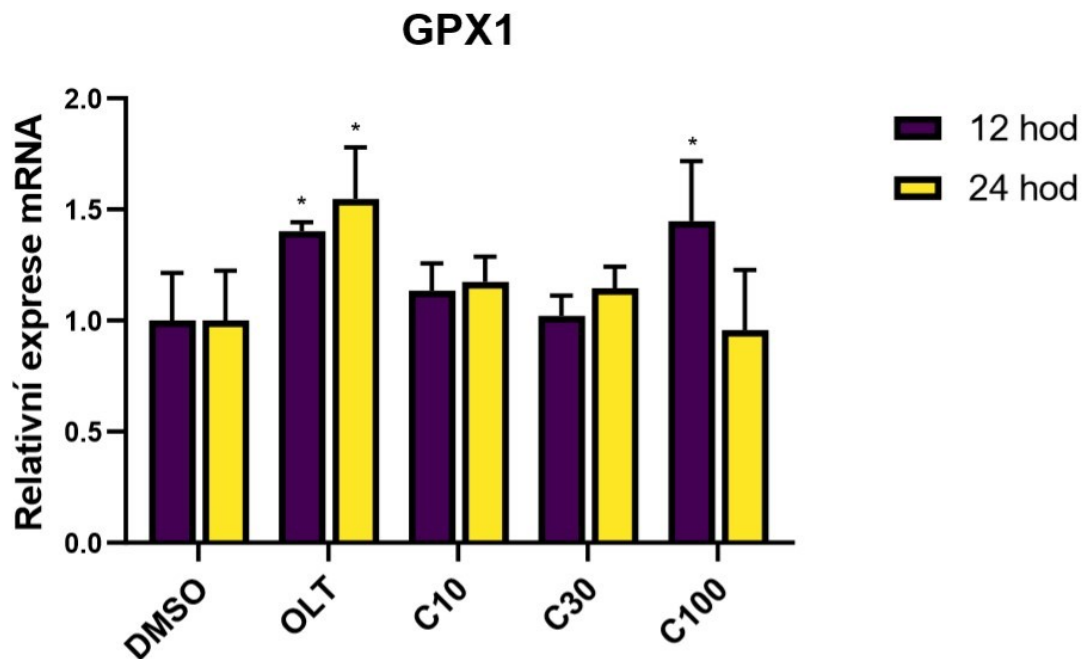
Ani v případě stanovení genové exprese katalasy (Obr. 12) nebyly u studovaných látek při 12 či 24hodinové inkubaci nalezeny statisticky významné změny, nedošlo k žádné výrazné indukci nebo inhibici enzymu.



Obrázek 12 – Vliv citralu na genovou expresi CAT. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.9 Vliv citralu na genovou expresi GPX1

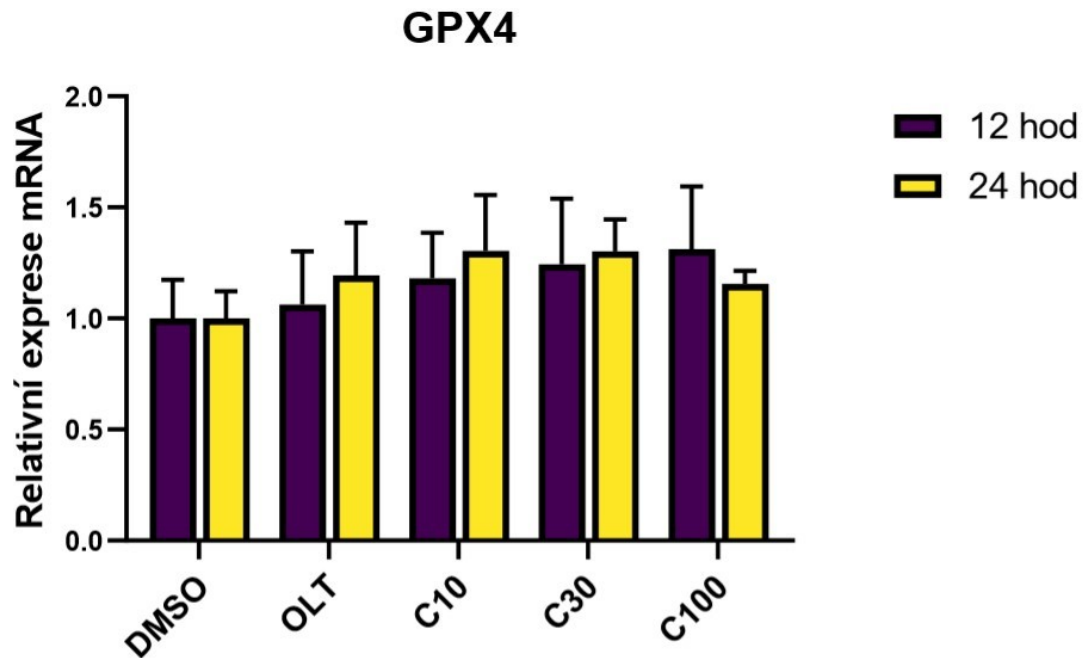
Pro stanovení genové exprese GPX1 byl použit speciálně navržený primer, který jiné isoformy z rozmanité rodiny glutathionperoxidas nevázal. Statisticky významné změny lze pozorovat u 10 μ M oltiprazu, který při 12hodinové inkubaci indukoval GPX1 1,4 \times a při 24hodinové inkubaci 1,5 \times . Signifikantní změny byly také zaznamenány u 100 μ M citralu, který v případě 12hodinové inkubace indukoval daný enzym 1,4 \times (Obr. 13).



Obrázek 13 – Vliv citralu na genovou expresi GPX1. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.10 Vliv citralu na genovou expresi GPX4

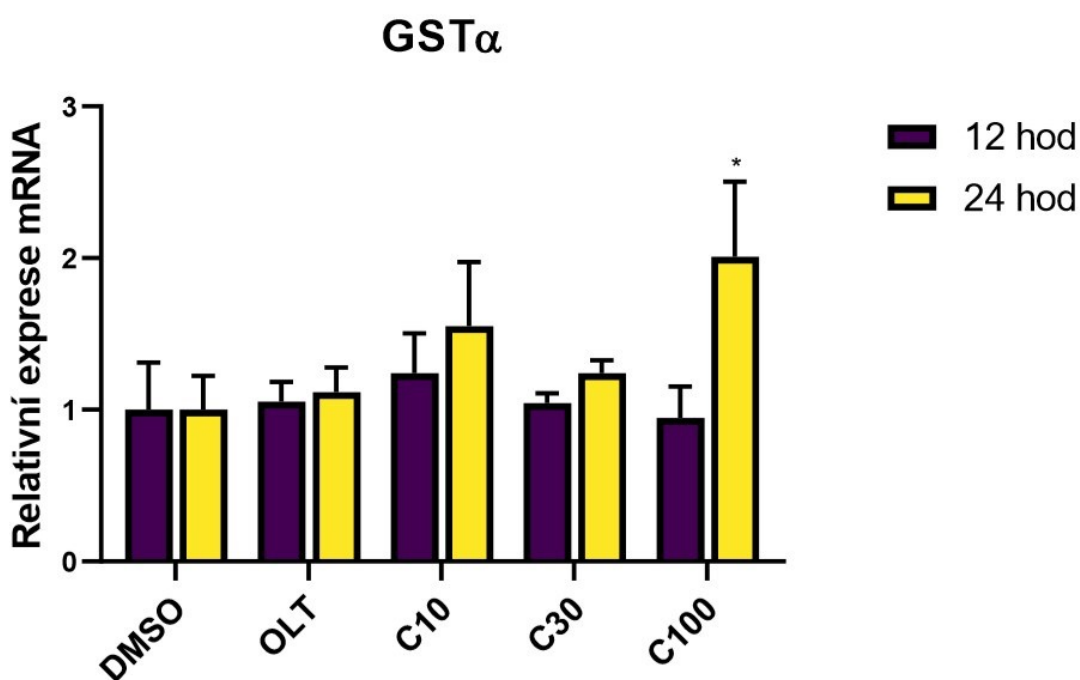
Pro stanovení genové exprese byl použit speciálně navržený primer, který vázal pouze jedinou isoformu glutathionperoxidasy: GPX4. U studovaných látek došlo k mírnému indukčnímu účinku při 12 i 24hodinových inkubací, avšak tyto změny nejsou u oltiprazu ani citralu v žádné koncentraci statisticky významné (Obr. 14).



Obrázek 14 – Vliv citralu na genovou expresi GPX4. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.11 Vliv citralu na genovou expresi GSTA

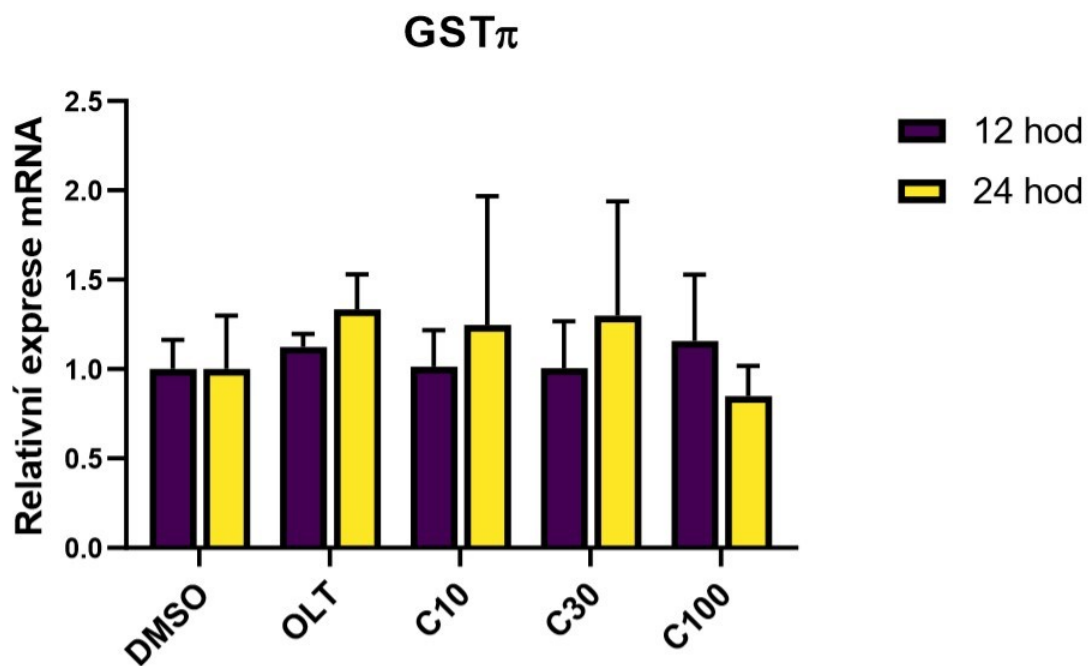
V případě stanovení genové exprese GSTA (Obr. 15), kde byl opět použit primer vázající pouze jedinou isoformu glutathion-S-transferasy, nedošlo u většiny studovaných látek k signifikantním změnám. Jediné statisticky významné rozdíly lze pozorovat u 100 μ M citralu, který v případě 24hodinové inkubace indukoval daný enzym dvojnásobně, ačkoli hodnota SD je zde 0,5 (24,6 %).



Obrázek 15 – Vliv citralu na genovou expresi GST α . HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.12 Vliv citralu na genovou expresi GSTP

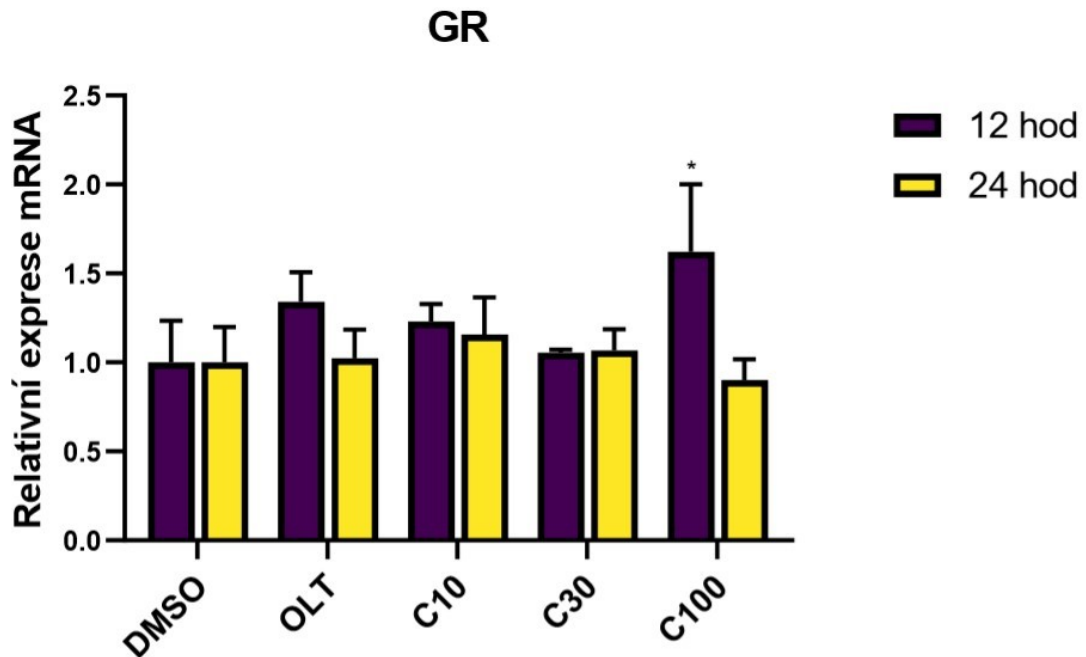
Pro stanovení vlivu citralu na genovou expresi další isoformy glutathion-S-transferasy (Obr. 16) byl použit speciálně navržený primer, který amplifikoval pouze isoformu GSTP. Z Obr. 16 je patrné, že oltipraz ani citral v žádných koncentracích a inkubačních časech signifikantně neovlivnil expresi daného enzymu. Mírné zvýšení exprese GSTP je vidět u 10 μ M (SD 57,8 %) a 30 μ M (SD 49,4 %) citralu při 24hodinové inkubaci, avšak tyto změny nemají statistický význam.



Obrázek 16 – Vliv citralu na genovou expresi GST π . HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.2.13 Vliv citralu na genovou expresi GR

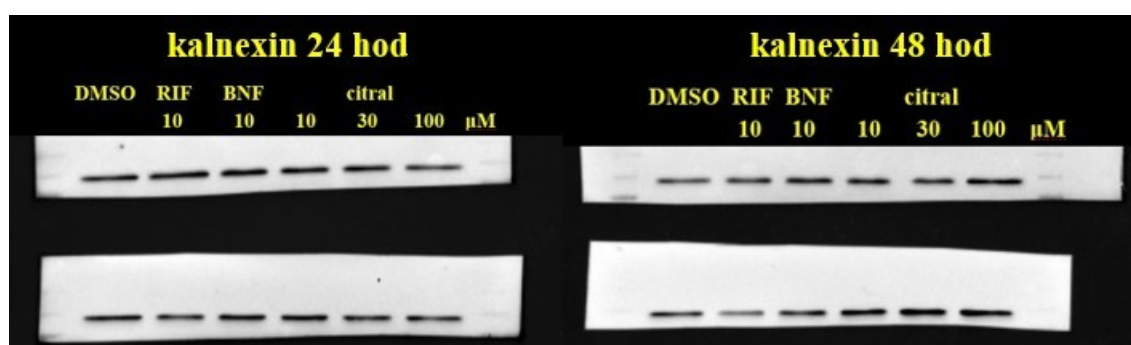
Výsledky genové exprese glutathionreduktasy (Obr. 17) nebyly u studovaných látek statisticky významné, ve většině případů nedošlo k žádné indukci nebo inhibici enzymu. Signifikantní rozdíly jsou vidět pouze u 100 μ M citralu při 12hodinové inkubaci, který indukoval expresi GR 1,6 \times .



Obrázek 17 – Vliv citralu na genovou expresi GR. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 12 a 24 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

5.3 Vliv citralu na proteinovou expresi

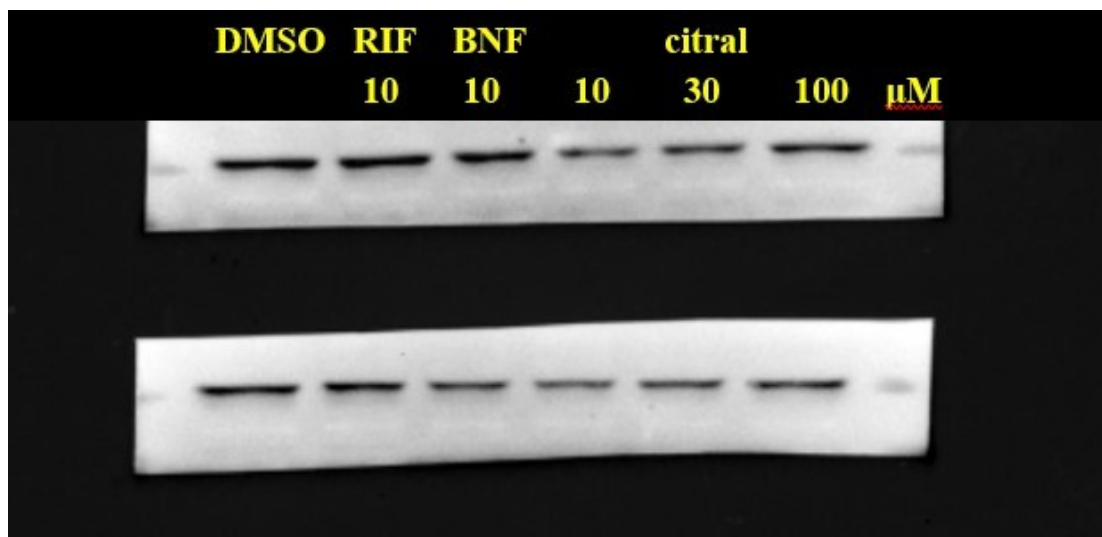
Po stanovení vlivu citralu na genovou expresi biotransformačních a antioxidačních enzymů v HepaRG buňkách následovalo stanovení jeho vlivu na jejich proteinovou expresi. Vliv induktorů (10 μ M rifampicin, 10 μ M β -naftoflavon) a citralu (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M) na proteinovou expresi vybraných biotransformačních enzymů v HepaRG buňkách je popsán v následujících kapitolách. Z časových důvodů a náročnosti optimalizace metody nebylo možné stanovit expresi antioxidačních enzymů a některých biotransformačních enzymů. Každý bod v grafech představuje průměr hodnot z dvou nezávislých experimentů, denzita jednotlivých proužků byla vztažena na denzitu proužku proteinu kalnexinu (Obr. 18) (viz kapitola 4.7.5 Detekce proteinů).



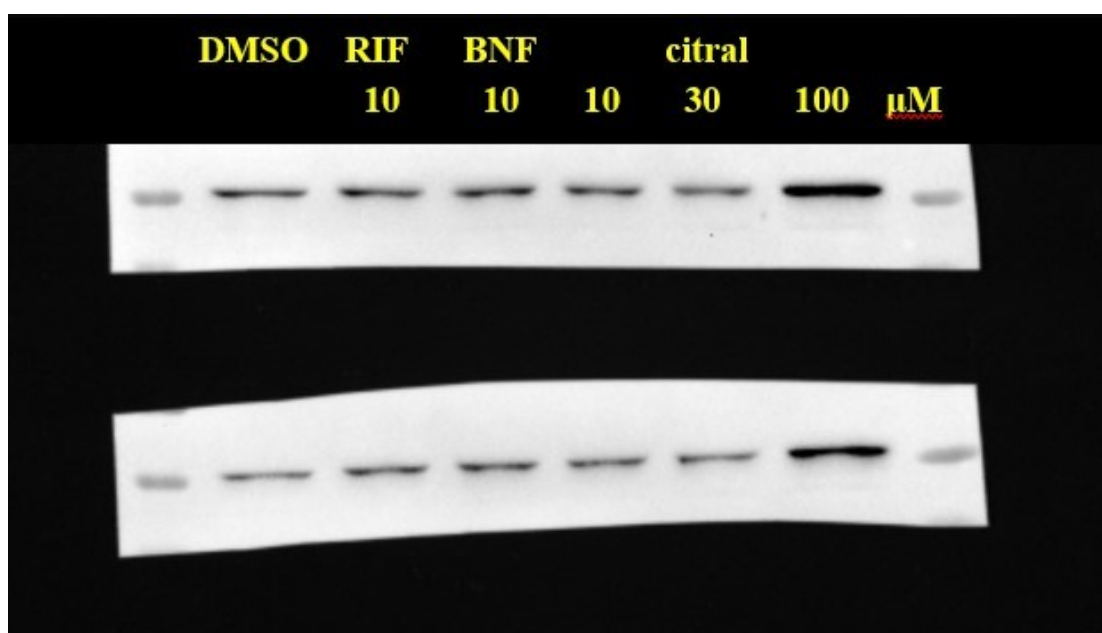
Obrázek 18 – Ukázka blotů proteinové exprese kalnexinu po 24 a 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: DMSO, RIF, BNF, 10 μ M citral, 30 μ M citral, 100 μ M citral.

5.3.1 Vliv citralu na proteinovou expresi CYP2C9

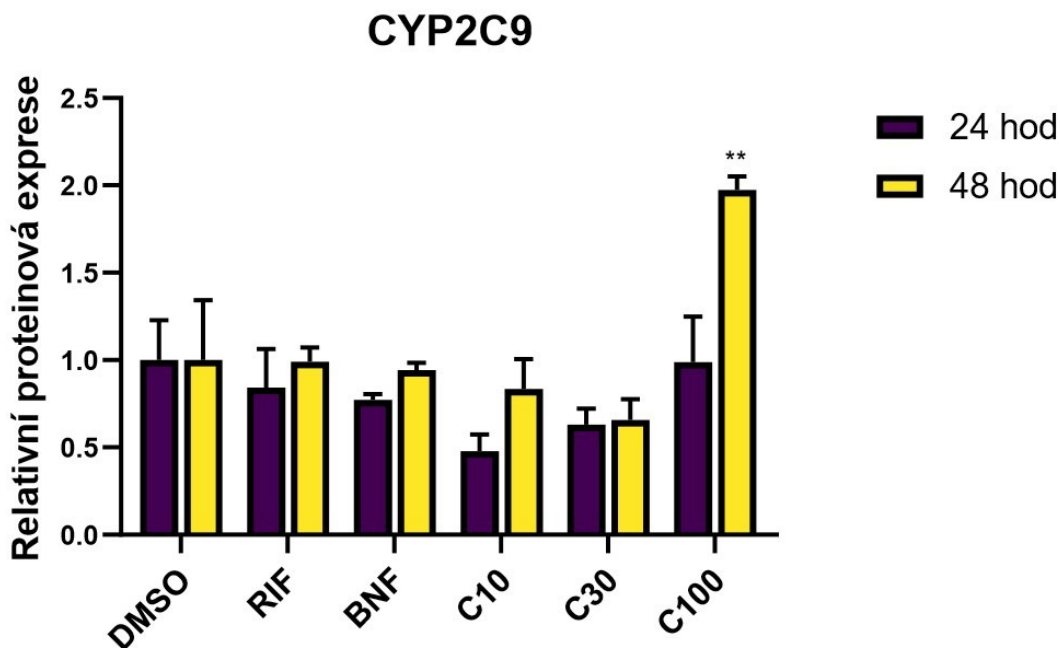
Na Obr. 19 a 20 jsou zobrazeny ukázky získaných blotů proteinové exprese CYP2C9 při 24 a 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami. Proteinové exprese CYP2C9 nebyla, s výjimkou 100 μ M citralu při 48hodinové inkubaci, kde došlo ke dvojnásobné indukci oproti kontrole, žádnou testovanou látkou výrazně ovlivněna. K signifikantním změnám nedošlo ani napříč jednotlivými expozičními časy u většiny testovaných látek s výjimkou 100 μ M citralu, kde při 24hodinové inkubaci byla exprese enzymu změněna (Obr. 21).



Obrázek 19 – Ukázka blotů proteinové exprese CYP2C9 po 24hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: DMSO, RIF, BNF, 10 μM cítal, 30 μM cítal, 100 μM cítal. Denzita jednotlivých proužků byla vztažena na denzitu proužku proteinu kalnexinu.



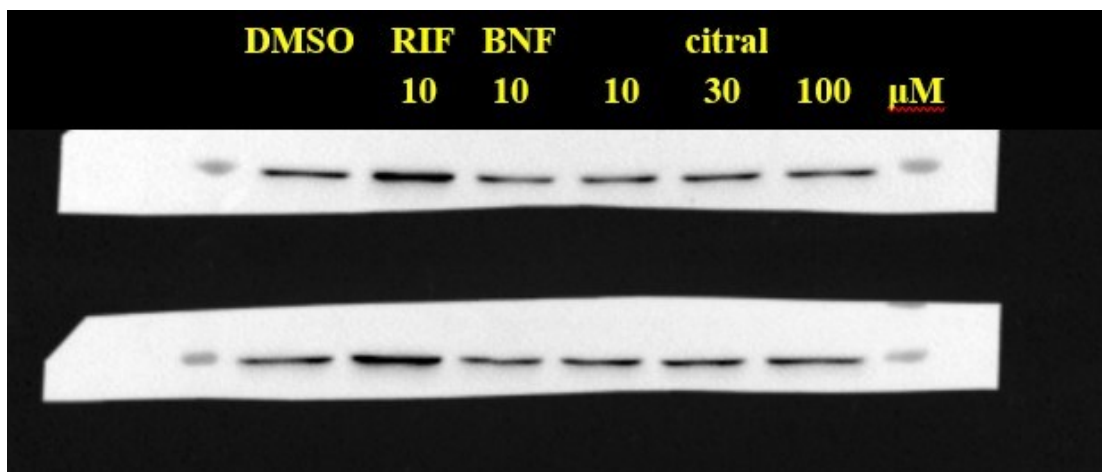
Obrázek 20 – Ukázka blotů proteinové exprese CYP2C9 po 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: DMSO, RIF, BNF, 10 μM cítal, 30 μM cítal, 100 μM cítal. Denzita jednotlivých proužků byla vztažena na denzitu proužku proteinu kalnexinu.



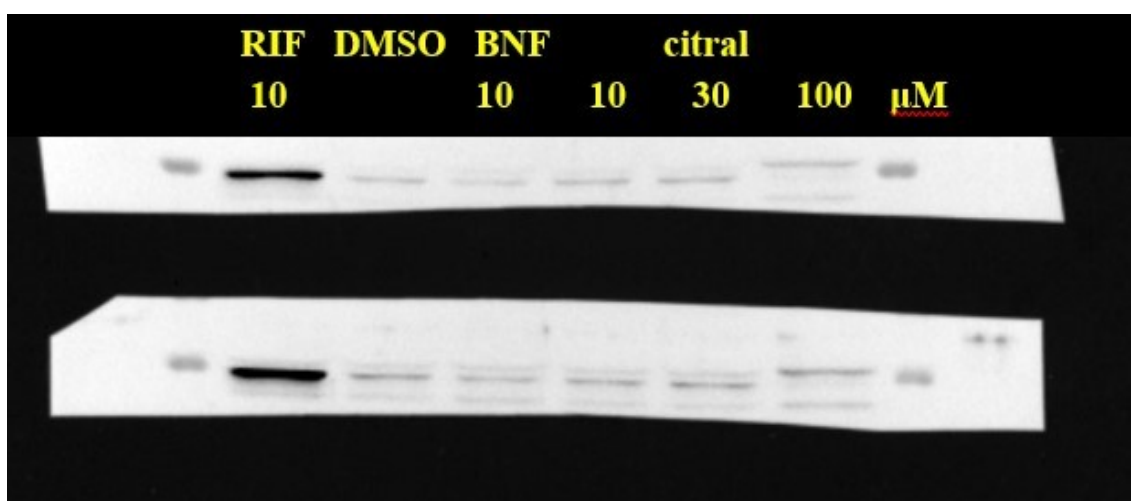
Obrázek 21 – Vliv citralu na proteinovou expresi CYP2C9. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)

5.3.2 Vliv citralu na proteinovou expresi CYP3A4

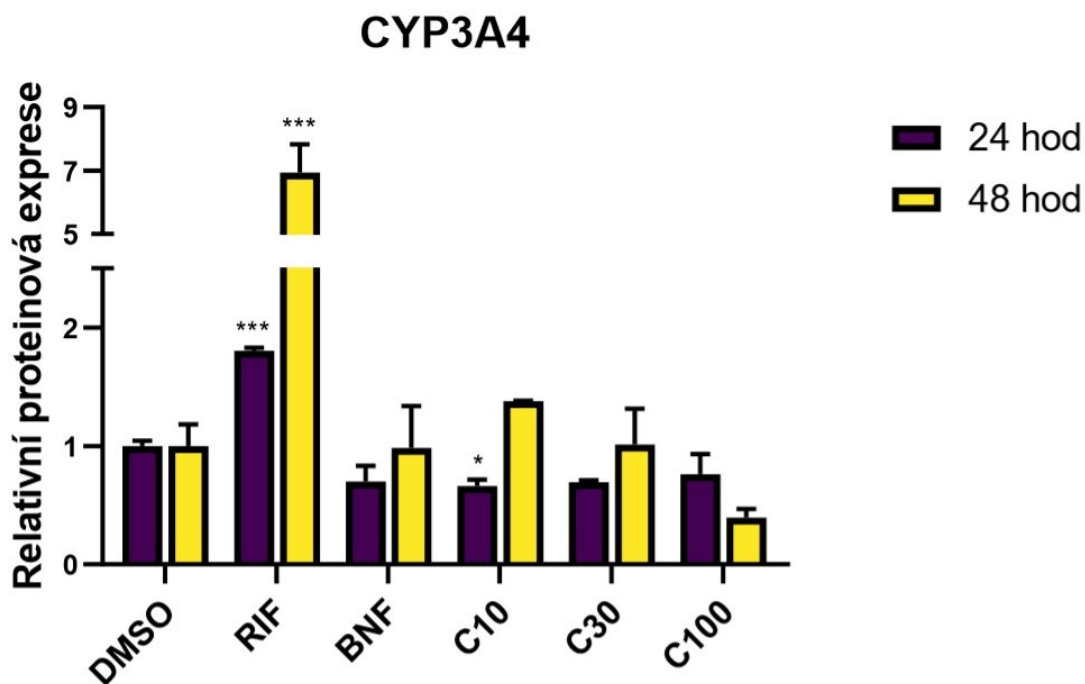
Na Obr. 22 a 23 jsou zobrazeny ukázky získaných blotů proteinové exprese CYP3A4 při 24 a 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami. RIF indukoval proteinovou expresi CYP3A4 $1,8 \times$ při 24hodinové inkubaci a až $6,9 \times$ v případě 48hodinové inkubace. Signifikantní inhibice exprese enzymu (34 %) byla zaznamenána u 10 μM citralu při 24hodinové inkubaci, avšak nikoli při 48hodinové inkubaci. Mírné snížení exprese enzymu bylo zaznamenáno i u 100 μM citralu při 48hodinové inkubaci, které ale nebylo statisticky významné (Obr. 24).



Obrázek 22 – Ukázka blotů proteinové exprese CYP3A4 po 24hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: DMSO, RIF, BNF, 10 μ M citral, 30 μ M citral, 100 μ M citral. Densita jednotlivých proužků byla vztahována na densitu proužku proteinu kalnexinu.



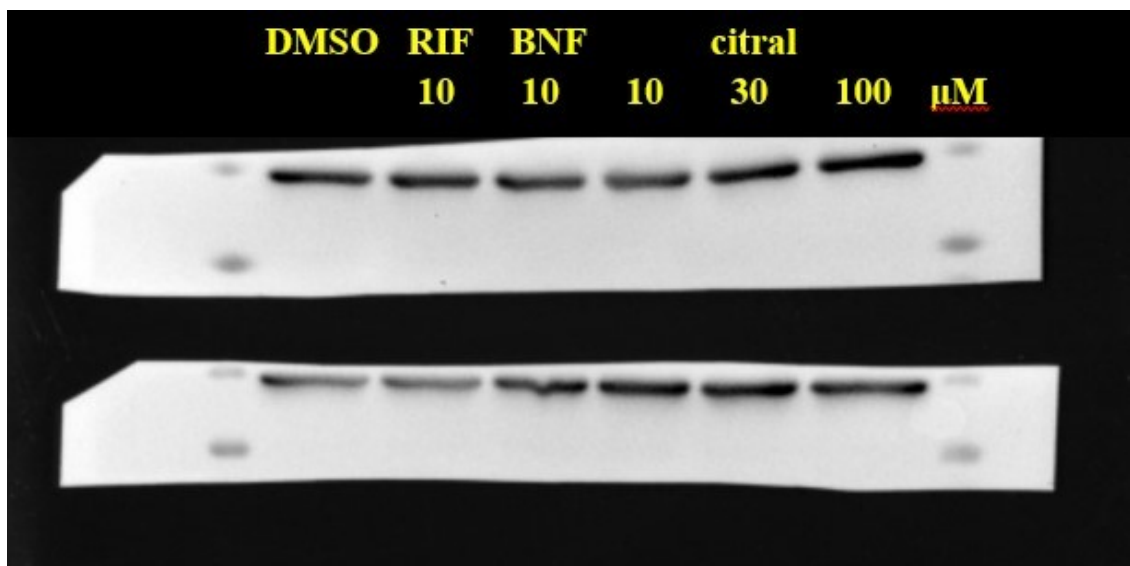
Obrázek 23 – Ukázka blotů proteinové exprese CYP3A4 po 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: RIF, DMSO, BNF, 10 μ M citral, 30 μ M citral, 100 μ M citral. Densita jednotlivých proužků byla vztahována na densitu proužku proteinu kalnexinu.



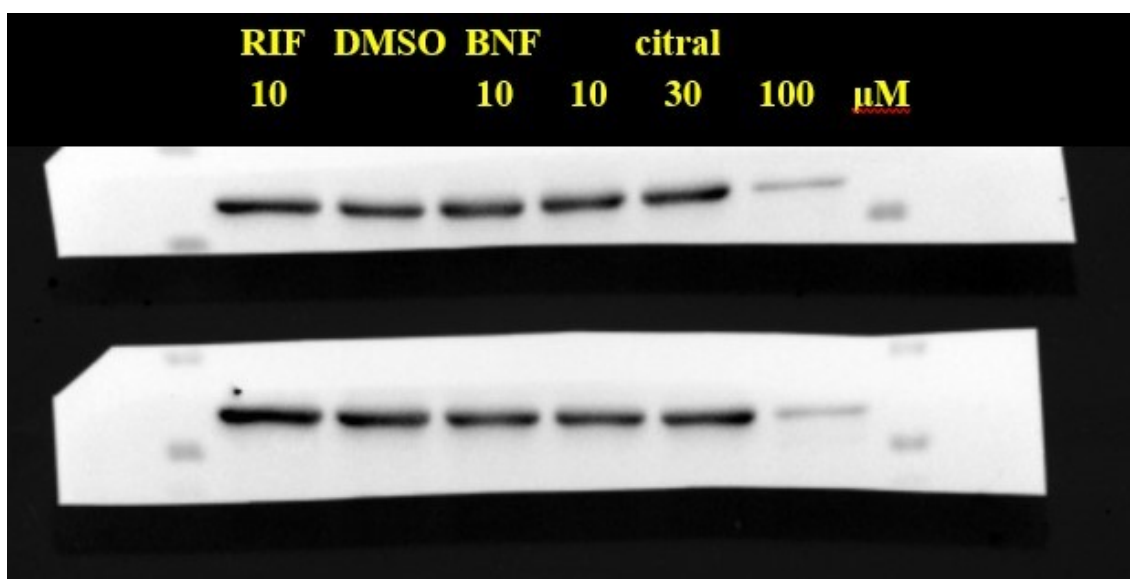
Obrázek 24 – Vliv citralu na proteinovou expresi CYP3A4. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)

5.3.3 Vliv citralu na proteinovou expresi AKR1C3

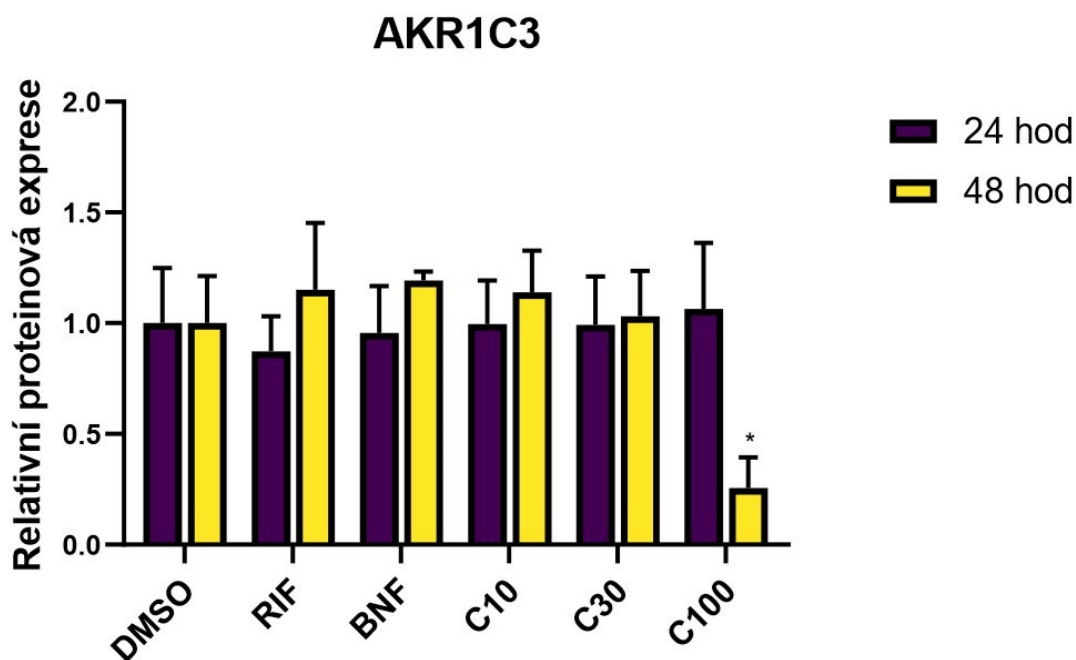
Na Obr. 25 a 26 jsou zobrazeny ukázky získaných blotů proteinové exprese AKR1C3 při 24 a 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami. Výsledky proteinové exprese AKR1C3 (Obr. 27) ukazují, že většina studovaných látek expresi daného enzymu neovlivnila. Signifikantní rozdíl byl zaznamenán pouze u 100 μ M citralu v případě 48hodinové inkubace, který inhiboval expresi enzymu o 74 % (SD 53,7 %).



Obrázek 25 – Ukázka blotů proteinové exprese AKR1C3 po 24hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: DMSO, RIF, BNF, 10 μM citral, 30 μM citral, 100 μM citral. Denzita jednotlivých proužků byla vztažena na denzitu proužku proteinu kalnexinu.



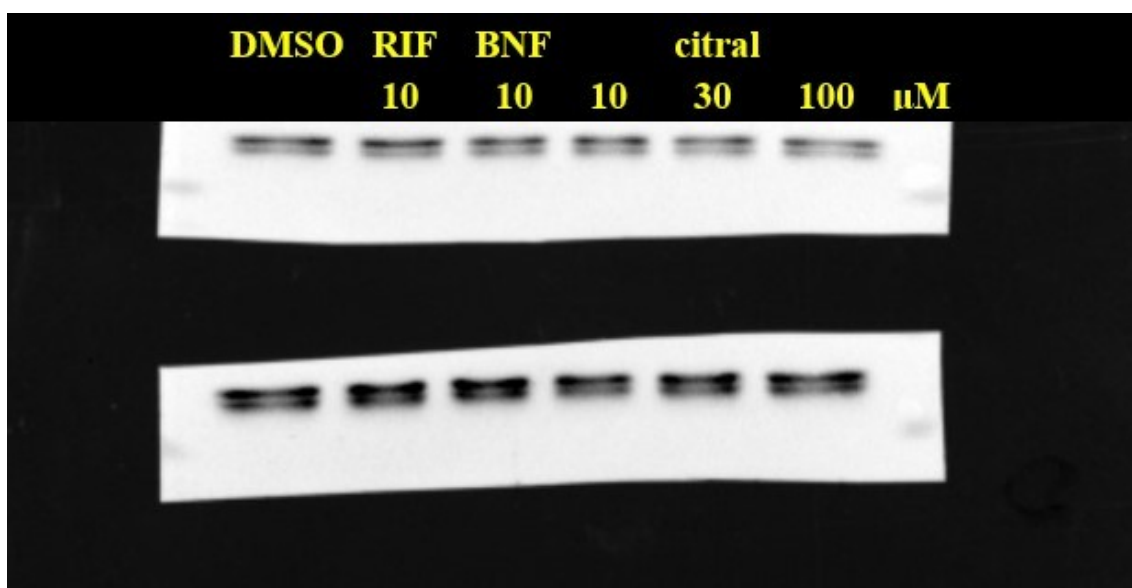
Obrázek 26 – Ukázka blotů proteinové exprese AKR1C3 po 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: RIF, DMSO, BNF, 10 μM citral, 30 μM citral, 100 μM citral. Denzita jednotlivých proužků byla vztažena na denzitu proužku proteinu kalnexinu.



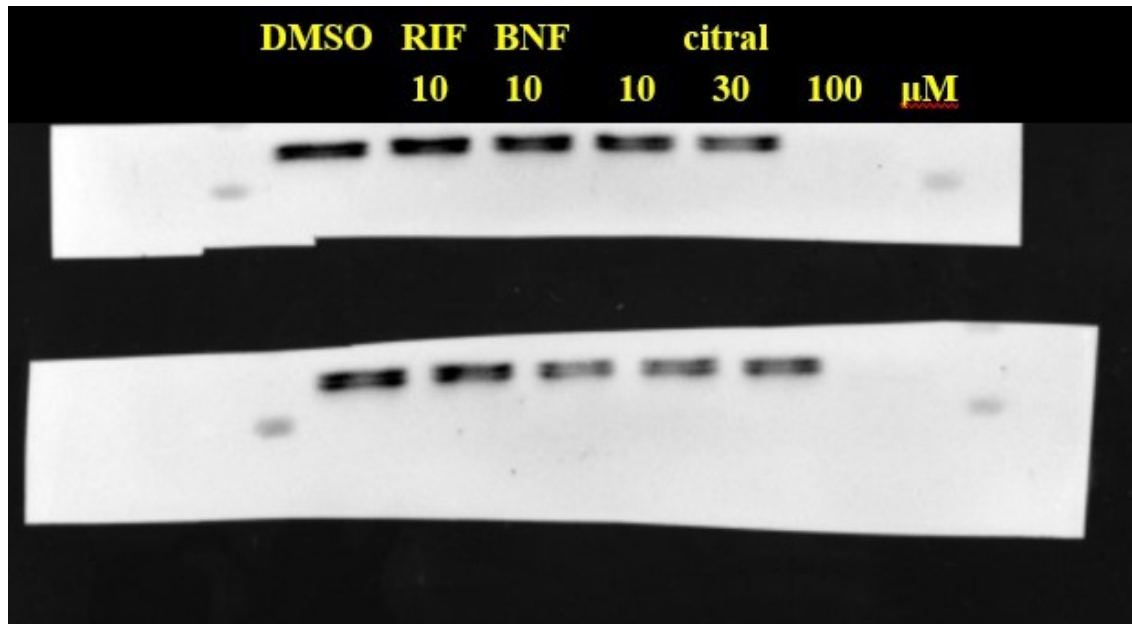
Obrázek 27 – Vliv citralu na proteinovou expresi AKR1C3. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)

5.3.4 Vliv citralu na proteinovou expresi CBR1

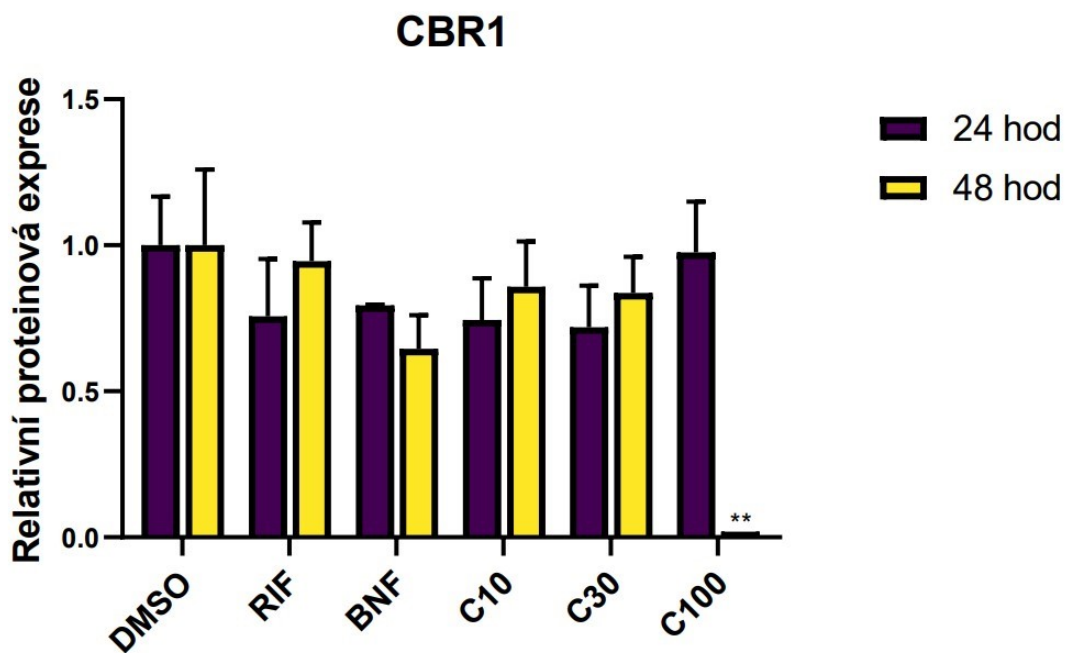
Na Obr. 28 a 29 jsou zobrazeny ukázky získaných blotů proteinové exprese CBR1 při 24 a 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami. Ani v případě stanovení proteinové exprese CBR1 nedošlo u většiny stanovovaných látek k signifikantním změnám. Z Obr. 30 je patrné, že 100 μ M citral při inkubaci po dobu 48 hodin inhiboval expresi daného enzymu velmi výrazně, konkrétně o 98 %. Na obr. 29 lze pozorovat naprosté vymizení bandu.



Obrázek 28 – Ukázka blotů proteinové exprese CBR1 po 24hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: DMSO, RIF, BNF, 10 μM citral, 30 μM citral, 100 μM citral. Denzita jednotlivých proužků byla vztažena na denzitu proužku proteinu kalnexinu.



Obrázek 29 – Ukázka blotů proteinové exprese CBR1 po 48hodinové inkubaci HepaRG buněk se studovanými látkami v pořadí: DMSO, RIF, BNF, 10 μM citral, 30 μM citral, 100 μM citral. Denzita jednotlivých proužků byla vztažena na denzitu proužku proteinu kalnexinu.



Obrázek 30 – Vliv citralu na proteinovou expresi CBR1. HepaRG buňky byly inkubovány se studovanými látkami v různých koncentracích při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ – signifikantně se liší od kontroly (One-way ANOVA následována Dunettovým post-hoc testem)**

6. DISKUSE

Bylinné léky, jejichž celosvětová spotřeba se v posledních desetiletích výrazně zvýšila, jsou mnohými považovány za bezpečnější než chemická léčiva, jelikož jsou považovány za „přírodní“. Často nejsou známy nežádoucí účinky rostlinných přípravků a je obtížné určit mechanismy jejich toxicity. Ve většině případů dochází k nepříznivým účinkům přírodních terapií v důsledku jejich nevhodného použití, např. pokud jsou nesprávně připraveny, používají se k nevhodným indikacím, v nadměrných dávkách nebo po delší dobu (Zárybnický et al., 2018a). Podle odhadů Světové zdravotnické organizace se více než 80 % obyvatel Země spoléhá na tradiční medicínu, pokud jde o jejich primární potřeby v oblasti zdravotní péče. Většina z této terapie zahrnuje použití rostlinných extraktů nebo jejich aktivních složek, zejména sekundárních metabolitů. Mezi rostlinnými sekundárními metabolity představují terpeny nejrozmanitější třídu (Bártíková et al., 2014).

Monoterpeny prostupují celé naše prostředí, ovlivňují kvalitu ovzduší, zejména množství ozónu v troposféře, a mají nesporný význam jak pro rostliny, které je produkují, tak pro další organismy včetně člověka. Rostliny se jejich pomocí brání škůdcům a zároveň jimi lákají opylovače. Pro nás jsou nepostradatelné jako chuťové a vonné látky, jež navíc pozitivně ovlivňují naše zdraví (Dvořáková et al., 2011). Monoterpen citral se vyznačuje citronovou vůní, využívá se jako aromatická složka v parfémtech, ochucovadlo a konzervační činidlo, je vysoce ceněn pro své protizánětlivé, protiplísňové, protinádorové, antibakteriální a antipyretické účinky (Onawunmi, 1989; Robacker et al., 1977; Emílio-Silva et al., 2017; Tang et al., 2018a).

Některé monoterpeny (např. pulegon, menthofuran, kafr, limonen) a seskviterpeny (např. zederon, germakron) tvoří reaktivní metabolity, zvyšují koncentraci reaktivních forem kyslíku a narušují antioxidační obranu organismu, což se projevuje hepatotoxicitou. Každý rok je hlášeno mnoho případů poškození jater vyvolané bylinnými doplňky, proto je třeba věnovat jim více pozornosti, aby se snížilo riziko poškození jater způsobené výrobky obsahujícími terpeny (Zárybnický et al., 2018b).

Jedním z cílů této diplomové práce bylo stanovit cytotoxicitu citralu na HepaRG buňky. Pomocí NRU testu byla stanovena hodnota IC_{50} , která byla u 48hodinové inkubace 0.892 mM a u 72hodinové inkubace 0.708 mM. Při 48hodinové inkubaci

2 mM citral způsobil 0% viabilitu buněk, v případě 72hodinové inkubace postačil již 0,9 mM citral k usmrcení všech buněk.

Ve studii Dudai et al. (2005) 44,5 μ M citral, jenž odpovídá koncentraci citralu v šálku čaje připraveného z 1 g voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*), vyvolal apoptosu v několika hematopoetické buněčných liniích. Apoptosa byla doprovázena fragmentací DNA a indukcí katalytické aktivity kaspasy-3. Různé leukemické buněčné linie byly ošetřeny silicí z *C. citratus*, po 4 hodinách inkubace došlo k usmrcení 50 – 81 % buněk, zatímco normální thymocyty byly rezistentní. Dále byl hodnocen účinek čistého citralu, který vedl k usmrcení 58 – 90 % leukemických buněk ($IC_{50} = 47 \text{ ug / ml}$), zatímco u zdravých thymocytů byla úmrtnost 29 % a u normálních buněk sleziny nebyl zaznamenán žádný cytotoxický účinek. Apoptotický účinek citralu závisel na α, β -nenasycené aldehydové skupině, která slouží jako účinný aktivátor kaspasy-3. Citral by mohl tvořit novou rodinu proapoptotických léčiv v boji proti rakovině (Dudai et al., 2005).

Antibakteriálními účinky citralu se zase zabývala studie Adukwu et al. (2016), kde všechny z pěti testovaných kmenů *Acinetobacter baumannii* (z nichž dva kmeny byly potvrzeny jako rezistentní vůči více léčivům (MDR)) byly citlivé jak na silici *Cymbopogon flexuosus*, tak na citral, přičemž inhibiční zóny se pohybovaly mezi 17 a 80 mm. Dále byla testována životaschopnost buněk za použití lidských dermálních fibroblastů (HDF; 106-05a), pomocí XTT testu byla stanovena hodnota IC_{50} pro citral 0,095% (v/v) i pro silici *C. flexuosus* 0,126 % (v/v). Schopnost silice *C. flexuosus* a citralu inhibovat a zabíjet MDR kmeny *A. baumannii* zdůrazňuje jejich potenciál pro použití při léčbě infekcí rezistentními patogeny, avšak cytotoxicita *in vitro* naznačuje, že je zapotřebí dalších testů před expozicí člověka *in vivo* nebo *ex vivo* (Adukwu et al., 2016).

Ve studii Kpoviessi et al. (2014) autoři uvedli, že silice *Cymbopogon citratus* prokázala mírně toxickou aktivitu proti buněčné linii lidských fibroblastů W138 ($IC_{50} = 39,77 \text{ } \mu\text{g/ml}$). Zároveň zjistili, že silice rostlin rodu *Cymbopogon* mohou být dobrým zdrojem antitrypanosomálních látek (Kpoviessi et al, 2014). Rovněž silice myrtovníku citronového (*Backhousia citriodora*) i samotný citral vykazovaly velmi toxický účinek na lidské buněčné linie HepG2, fibroblastové buněčné linie F1-73 a primární buněčné kultury fibroblastů lidské kůže. Hodnota IC_{50} se pohybovala od 0.008 do 0.014 % (w/v) při 4hodinové inkubaci a od 0.003 do 0.012 % (w/v) při 24hodinové

inkubaci (Hayes a Markovic, 2002). Jiné studie prokázaly, že samotný citral bývá toxicitější než silice rostlin obsahující citral (Adukwu et al., 2016).

Dalším cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv citralu na genovou a proteinovou expresi biotransformačních a antioxidačních enzymů v HepaRG buňkách. Jelikož by mohl být citral využíván jako léčivo, byl ve studii Tang et al. (2018a) studován jeho vliv na expresi a aktivitu jaterních enzymů CYP450 u myši, aby nedocházelo k interakcím s jinými léčivy. Citral byl rozpuštěn ve vodě a intragastricky podáván myším po dobu 3 dnů. Největší indukce exprese mRNA několika enzymů CYP450 citralem byla pozorována při dávce 200 mg/kg. Dávka 2000 mg/kg měla nižší indukční účinek na expresi mRNA CYP1A2, 2D22 a 2E1 než dávka 200 mg/kg. Kromě toho citral neměl vliv na expresi mRNA CYP3A11 v dávce 2000 mg/kg. Citral v dávce 2000 mg/kg indukoval mikrosomální aktivitu CYP1A2, 2D22 a 2E1, zatímco aktivita CYP3A11 byla potlačena. Tato studie rovněž ukázala, že léčba citralem indukuje významné poškození jater a oxidační stres při dávce 2000 mg/kg. Z těchto důvodů musí být dávka citralu pečlivě vybrána, nízké dávky citralu sníží účinnost současně podávaných léčiv, zatímco vysoká dávka citralu povede k akumulaci a otravě. Vzhledem k tomu, že enzymy CYP450 jsou u lidí nejdůležitějšími enzymy odpovědnými za biotransformaci mnoha léčiv, je zapotřebí dalších studií, aby bylo možné zkoumat možné interakce, pokud má být citral použit jako léčivo nebo potravinářské aditivum (Tang et al., 2018a). V našem experimentu byla rovněž zaznamenána mírná nesignifikantní indukce exprese mRNA CYP1A2 (2,7x) při 24hodinové inkubaci 100 μ M citralu s HepaRG buňkami.

Ve studii Li et al. (2018) dvoutýdenní podávání silice *Cymbopogon flexuosus* a citralu způsobilo malou nebo žádnou změnu enzymové aktivity CYP1A2, 2B, 2C, 2D, 2E1. Myši po dvoutýdenním podávání 400 mg/kg silice *C. flexuosus* a 240 mg/kg citralu měly signifikantně sníženou ($p < 0,05$) testosteronovou 6 β -hydroxylační aktivitu (CYP3A). Ethoxyresorufin O-deethylační aktivita (CYP1A1) byla mírně, ale významně snížena ($p < 0,05$) při podávání stejného množství silice i citralu (Li et al., 2018).

Ve studii Seo et al. (2008) citral a geraniol silně inhibovaly aktivitu CYP2B6 hydroxylasy v lidských jaterních mikrosomech. Oproti tomu v našem experimentu v HepaRG buňkách 100 μ M citral při 24hodinové inkubaci signifikantně indukoval CYP2B6 i CYP3A4 na úrovni mRNA, exprese enzymů CYP2C a AKR1C nebyla změněna, 30 μ M citral při 12hodinové inkubaci inhiboval expresi enzymu CBR1 o 22 %. Mírná inhibice proteinové exprese enzymu CYP3A4 byla zaznamenána u 10 μ M citralu

při 24hodinové inkubaci, 100 μ M citral při 48hodinové inkubaci velmi výrazně inhiboval CBR1 i AKR1C3.

Meredith Cochrane (2015) se ve své studii zabývala složením silicí rostlin a jejich vlivem na aktivitu CYP2C9. Provedla screening téměř šedesáti rostlin, z nichž 17 prokázalo potenciál silných inhibitorů CYP2C9. Kromě skořicového listu, mrkve, hřebíčku, vanilky, zázvoru, šalvěže, oregana a mnoha dalších sem patří také pelargonie vonná (*Pelargonium graveolens*) a citronela cejlonská (*Cymbopogon nardus*), obě obsahující citral (Jeon et al., 2008; Nakahara et al., 2013; Cochrane, 2015). V našem experimentu však 100 μ M citral při 48hodinové inkubaci dvojnásobně indukoval proteinovou expresi CYP2C9.

V našem experimentu 10 μ M rifampicin indukoval pouze CYP3A4 na úrovni genové i proteinové exprese, což se shoduje se studií Luo et al. (2002), ačkoli by měl také indukovat CYP2B6 (Faucette et al., 2004) a CYP2C9 (Samer et al., 2013). Druhým studovaným induktorem byl β -naftoflavon, který indukoval CYP1A2 při 12 i 24hodinové inkubaci a AKR1C při 24hodinové inkubaci na úrovni mRNA, ani jeden z enzymů však nebyl touto látkou ovlivněn na úrovni proteinu.

Antioxidační aktivita citralu byla ve studii Tang et al. (2018a) hodnocena měřením celkové antioxidační kapacity (T-AOC). Mimo jiné byla také měřena hodnota celkové aktivity superoxiddismutasy (T-SOD), citral zvýšil hladiny T-SOD, při vysokých dávkách citralu však T-AOC významně poklesla. Tang et al. (2018a) předpokládá, že citral je slabý antioxidant nebo má nízkou antioxidační kapacitu *in vivo*. V našem experimentu citral v různých koncentracích při 12hodinové i 24hodinové inkubaci neměl žádný vliv na expresi SOD1/2 v HepaRG buňkách na úrovni mRNA. Rovněž ani v případě dalších antioxidačních enzymů (CAT, GPX4, GSTP) nebyla zaznamenána změna v jejich expresi. Van Iersel et al. (1996) ve své studii uvedl, že GSTP nebyla v lidských melanomových buňkách inhibována citralem. Také ve studii Li et al. (2018) dvoutýdenní podávání silice *Cymbopogon flexuosus* nebo citralu nemělo u myši významný účinek na aktivitu jaterní GST, bylo pozorováno zvýšení aktivity jaterní GR (více při podání čistého citralu než silice). Silice ani citral nezpůsobily významnou změnu aktivity GPX v játrech (Li et al., 2018). V našem experimentu byla pozorována indukce GSTA na úrovni mRNA u 100 μ M citralu při 24hodinové inkubaci, genovou expresi GPX1 a GR zvýšil 100 μ M citral při 12hodinové inkubaci. Použitý induktor 10 μ M

oltipraz zvýšil expresi pouze jediného antioxidantního enzymu GPX1 při 12 i 24hodinové inkubaci.

Rozsáhlé experimentální a klinické studie dokazují, že oslizák líbezný (*Aegle marmelos*) má antidiarrhoické, antimikrobiální, antivirové, antipyretické, radioprotektivní, chemopreventivní, protirakovinné a protizánětlivé vlastnosti, díky nimž je hojně používán v tradiční medicíně, zejména v domorodé indické medicíně, k prevenci a léčbě mnoha nemocí. *A. marmelos* je stejně jako spousta dalších léčivých rostlin bohatý na sekundární metabolity, obsahuje např. marmenol, marmin, psoralen, limonen nebo citral (Rahman a Parvin, 2014). Ve studii Singh et al. (2000) byl extrakt z listů *A. marmelos* (50 a 100 mg/kg) podáván myším po dobu 14 dnů a následně byla sledována enzymová aktivita antioxidantních enzymů v játrech myší. Došlo ke zvýšení aktivity superoxidodismutasy, katalasy, glutathionperoxidasy i glutathionreduktasy.

Citral, ale i další terpeny jsou nadějnými kandidáty pro vývoj nových léčiv, např. proti MRSA (Long et al., 2019), zrnitým patogenům *Aspergillus flavus* a *Aspergillus ochraceus* (Tang et al., 2018b) nebo při léčbě onemocnění diabetes mellitus (Mishra et al., 2019), proto by si zasloužily více pozornosti. Studium jejich metabolismu včetně možných interakcí s dalšími léčivy zvýší léčebný efekt a minimalizuje rizika spojená s užíváním tak, aby nedocházelo k nevhodnému použití těchto přírodních látek, která při nesprávném užívání mohou být toxická nejenom pro játra.

7. ZÁVĚR

Jako model pro studium cytotoxicity a vlivu citralu na expresi biotransformačních a antioxidačních enzymů byly zvoleny diferencované HepaRG buňky.

Nejprve byla pomocí NRU testu sledována cytotoxicita citralu a byla stanovena hodnota IC_{50} , která byla u 48hodinové inkubace 0.892 mM a u 72hodinové inkubace 0.708 mM. Při 48hodinové inkubaci 2 mM citral usmrtil všechny buňky, v případě 72hodinové inkubace postačil k usmrcení všech buněk již 0,9 mM citral. Můžeme tedy říci, že cytotoxicita citralu není vysoká. Další experimenty byly provedeny s netoxickými koncentracemi citralu (10, 30 a 100 μ M).

Diferencované HepaRG buňky byly inkubovány s 10 μ M rifampicinem, 10 μ M β -naftoflavonem, 30 μ M oltiprazem, 10 μ M citralem, 30 μ M citralem a 100 μ M citralem 12 a 24 hodin pro PCR a 24 a 48 hodin pro WB. Rifampicin, β -naftoflavon a oltipraz jsou známé induktory CYP3A4, CYP1A1/2 respektive antioxidačních enzymů.

Byl sledován vliv citralu na genovou a proteinovou expresi vybraných enzymů I. fáze biotransformace a antioxidačních enzymů. Rifampicin indukoval CYP3A4 na úrovni mRNA při 12 i 24hodinové inkubaci a při 24 i 48hodinové inkubaci na úrovni proteinu. Signifikantní indukce CYP3A4, CYP2B6 a GSTA na úrovni mRNA byla pozorována rovněž u 100 μ M citralu při 24hodinové inkubaci. Oproti tomu při stanovení proteinové exprese došlo k mírné inhibici CYP3A4 u 10 μ M citralu při 24hodinové inkubaci, který se však neprojevuje při delší inkubaci ani při použití vyšších koncentrací citralu. β -naftoflavon indukoval CYP1A2 na úrovni mRNA při 12 i 24hodinové inkubaci a AKR1C při 24hodinové inkubaci, ani jeden z enzymů však nebyl touto látkou ovlivněn na úrovni proteinu. Genovou expresi GPX1 zvýšil oltipraz při 12 i 24hodinové inkubaci a 100 μ M citral při 12hodinové inkubaci, který v tentýž čas indukoval také GR. Genová exprese CYP2C, SOD1/2, CAT, GPX4, GSTP nebyla ovlivněna žádnou studovanou látkou. Mírná inhibice CBR1 na úrovni mRNA byl pozorován pouze u 30 μ M citralu při 12hodinové inkubaci. Při stanovení proteinové exprese byla zaznamenána indukce CYP2C9 a výrazná inhibice CBR1 i AKR1C3 u 100 μ M citralu při 48hodinové inkubaci.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

AA	akrylamid
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky
AKR	aldo-keto reduktasa
APS	persíran amonný
BCA	bicinchoninová kyselina
bisAA	N,N'-metylen-bisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CAT	katalasa
CBR	karbonylreduktasa
cDNA	jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom P450
DEPC	diethylpyrokarbonát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidy
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
GPX	glutathionperoxidasa
HCl	kyselina chlorovodíková
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace

mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NaCl	chlorid sodný
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerasová řetězová reakce
Pen/Strep	syntetický penicilin-streptomycin
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
PXR	pregnanový X receptor
qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
RT	reversní transkriptasa
SDS	dodecylsírán sodný
SOD	superoxiddismutasa
TBS	tris-pufrovaný fyziologický roztok
TBST	tris-pufrovaný fyziologický roztok + Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWEEN	polyoxyethylen-sorbitan monolaurát

9. POUŽITÁ LITERATURA

- ADUKWU E. C., M. BOWLES, V. EDWARDS-JONES, H. BONE. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(22): 9619-9627. ISSN 0175-7598.
- ALLAN J. M., C. P. WILD, S. ROLLINSON, et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98 (20): 11592-11597.
- ARSOVA-SARAFINOVSKA Z., N. MATEVSKA, A. EKEN, et al. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *International Urology and Nephrology*, 2009, 41 (1): 63-70.
- AUSUBEL F. M., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J. A. SMITH a K. STRUHL. *Current Protocols in Molecular Biology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2001. ISBN 0471142727.
- BARTÍKOVÁ, H., V. HANUŠOVÁ, L. SKÁLOVÁ, M. AMBROŽ, I. BOUŠOVÁ. Antioxidant, Pro-Oxidant and Other Biological Activities of Sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, 14(22): 2478-2494. ISSN 15680266.
- BEUTLER E. Disorders Due to Enzyme Defects in the Red Blood Cell. *Advances in Metabolic Disorders*, Elsevier, 1972, s. 131-160. ISBN 9780120273065.
- BREWER Ch., T. CHEN. Hepatotoxicity of Herbal Supplements Mediated by Modulation of Cytochrome P450. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(11).
- BOUŠOVÁ I., SKÁLOVÁ L. (2012) Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metab. Rev.*, 44(4): 267-286.
- BURDOCK G. A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients, 6th ed, Boca Raton: CRC Press, c2010. ISBN 9781420090772.
- BUSTIN S. A., R. MUELLER. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis, *Clinical Science*, 2005, 109(4): 365-379. ISSN 0143-5221.

- BUSTIN S. A. Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. *Methods*, 2010, 50(4): 217-226.
- CELIS J. E. *Cell biology: a laboratory handbook*. 3rd ed. Boston: Elsevier Academic, c2006. ISBN 978-012-1647-308.
- COCHRANE M. L. Inhibition of cytochrome P450 2C9 by essential oils. The University of North Carolina at Greensboro, ProQuest Dissertations Publishing, 2015, UMI Number: 1591478.
- CORNELIS M. C., A. EL-SOHEMY, E. K. KABAGAMBE, H. CAMPOS. Coffee, CYP1A2 Genotype and Risk of Myocardial Infarction, *JAMA* 2006, 295(10). ISSN 0098-7484.
- COUTO N., J. WOOD, J. BARBER. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 95: 27-42. ISSN 08915849.
- ČEDÍKOVÁ M., K. KRAKOROVÁ, M. MIKLÍKOVÁ, M. HRONOVÁ, A. BALANDOVÁ, P. PITULE, M. KRÁLÍČKOVÁ. On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenačních postupů. Plzeň: Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, 2012. Dostupné z: http://web.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/On-line_atlas_kmenovych_bunek.pdf
- ČOLAK E., L. ŽORIĆ. Antioxidants and Age-Related Macular Degeneration. *Handbook of Nutrition, Diet, and the Eye*, Elsevier, 2019, s. 85-106. ISBN 9780128152454.
- DE FREITAS SOUZA C., M. D. BALDISSERA, A. E. BIANCHINI, et al. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(1): 21-34. ISSN 0920-1742.
- DUDAI N., Y. WEINSTEIN, M. KRUP, T. RABINSKI, R. OFIR. Citral is a New Inducer of Caspase-3 in Tumor Cell Lines. *Planta Medica*, 2005, 71(5): 484-488. ISSN 0032-0943.

- DVOŘÁKOVÁ M., I. VALTEROVÁ, T. VANĚK. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy*, 2011 (105): 839-845.
- EATON D. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*, 1999, 49(2): 156-164. ISSN 10960929.
- EMÍLIO-SILVA M. T., C. M. D. MOTA, C. A. HIRUMA-LIMA, J. ANTUNES-RODRIGUES, E. C. CÁRNIO, L. G. S. BRANCO. Antipyretic Effects of Citral and Possible Mechanisms of Action. *Inflammation*, 2017, 40(5): 1735-1741.
- ELLGAARD L., E.-M. FRICKEL. Calnexin, Calreticulin, and ERp57: Teammates in Glycoprotein Folding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2003, 39(3): 223-248. ISSN 1085-9195.
- EWING J. F., D. R. JANERO. Microplate Superoxide Dismutase Assay Employing a Nonenzymatic Superoxide Generator. *Analytical Biochemistry*, 1995, 232(2): 243-248. ISSN 00032697.
- FAUCETTE S. R., H. WANG, G. A. HAMILTON, et al. Regulation of cyp2b6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers. *Drug Metabolism and Disposition*, 2004, 32(3): 348-358 [cit. 2020-03-03]. ISSN 0090-9556.
- FORREST G. L., B. GONZALEZ. Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, 129(1-2): 21-40. ISSN 00092797.
- GONZALEZ-COVARRUBIAS V., J. ZHANG, J. L. KALABUS, M. V. RELLING, J. G. BLANCO. Pharmacogenetics of Human Carbonyl Reductase 1 (CBR1) in Livers from Black and White Donors. *Drug Metabolism and Disposition*, 2009, 37(2): 400-407. ISSN 0090-9556.
- GORDON W., P. ANTHONY, J. FORTE, R. J. MCMURTRY, J. GAL, S. D. NELSON. Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1982, 65(3): 413-424. ISSN 0041008X.
- GÓTH L., P. RASS, A. PÁY. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*, 2004, 8(3): 141-149. ISSN 1084-8592.
- HAMANISHI T., H. FURUTA, H. KATO, et al. Functional Variants in the Glutathione Peroxidase-1 (GPx-1) Gene Are Associated With Increased Intima-

Media Thickness of Carotid Arteries and Risk of Macrovascular Diseases in Japanese Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*, 2004, 53(9): 2455-2460. ISSN 0012-1797.

- HAYES A. J., B. MARKOVIC. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40(4): 535-543. ISSN 02786915.
- HIGASHI M. K. Association Between CYP2C9 Genetic Variants and Anticoagulation-Related Outcomes During Warfarin Therapy, *JAMA*, 2002, 287(13). ISSN 0098-7484.
- HUANG T. Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 2010, 4(1): 271-278. ISSN 18741207.
- CHELIKANI P., I. FITA, P. C. LOEWEN. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 2004, 61(2), 192-208. ISSN 1420-682X.
- CHOMCZYNSKI P., N. SACCHI. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156-159. ISSN 00032697.
- IGHODARO O. M., O. A. AKINLOYE. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 2018, 54(4): 287-293. ISSN 2090-5068.
- JAESCHKE H., G. J. GORES, A. I. CEDERBAUM, J. A. HINSON, D. PESSAYRE, J. J. LEMASTERS. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 2002, 65(2): 166–176. ISSN 10960929.
- JEON J., H.-W. KIM, M-G. KIM, H.-S. LEE. Mite-Control Activities of Active Constituents Isolated from *Pelargonium graveolens* Against House Dust Mites. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 18(10): 1666–1671.
- KLOUDA P. *Základy biochemie*, 3. vyd. Ostrava: Pavko, 2013. ISBN 978-80-86369-16-7.

- KOLARS J. C., P. SCHMIEDLIN-REN, J. D. SCHUETZ, C. FANG, P. B. WATKINS. Identification of rifampin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 1992, 90(5): 1871-1878 ISSN 0021-9738.
- KPOVIESSI S., J. BERO, P. AGBANI, et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 151(1): 652-659. ISSN 03788741.
- LAWLESS J. *The illustrated encyclopedia of essential oils: the complete guide to the use of oils in aromatherapy and herbalism*. Rockport MA, Element, 1995. ISBN 1-85230-661-0.
- LI Ch.-Ch., H. YU, C.-H. CHANG, Y. LIU, H.-T. YAO. Effects of lemongrass oil and citral on hepatic drug-metabolizing enzymes, oxidative stress, and acetaminophen toxicity in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2018, 26(1): 432-438. ISSN 10219498.
- LONG N., H. TANG, F. SUN, L. LIN, M. DAI. Effect and mechanism of citral against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(9): 4423-4429. ISSN 0022-5142.
- LUO G., M. CUNNINGHAM, S. KIM, et al. CYP3A4 Induction by Drugs: Correlation between a Pregnane X Receptor Reporter Gene Assay and CYP3A4 Expression in Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, 30(7): 795-804. ISSN 0090-9556.
- MAHMOUD S. S., R. B. CROTEAU. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(8): 366-373. ISSN 13601385.
- MCLNTYRE N., S. ROSALKI. *Tests of the Functions of the Liver*. *Scientific Foundations of Biochemistry in Clinical Practice*, Elsevier, 1994, s. 383-398. ISBN 9780750601672.
- MIKSYS S. Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology*, 2003, 45(1): 122-132. ISSN 00283908.

- MISHRA C., M. A. KHALID, N. FATIMA, B. SINGH, D. TRIPATHI, M. WASEEM, A. A. MAHDI. Effects of citral on oxidative stress and hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin/high-fat-diet induced diabetic dyslipidemic rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2019, 22(1): 49–57.
- MULLER F. L., M. S. LUSTGARTEN, Y. JANG, A. RICHARDSON, H. V. REMMEN. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 43(4): 477-503. ISSN 08915849.
- MURAKAMI K., K. TAKAHITO, Y. OHTSUKA, Y. FUJIWARA, M. SHIMADA, Y. KAWAKAMI. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism*, 1989, 38(8): 753-758. ISSN 00260495.
- MUTALIK S., H. S. PAREKH, N. M. DAVIES, U. NAYANABHIRAMA. A combined approach of chemical enhancers and sonophoresis for the transdermal delivery of tizanidine hydrochloride. *Drug Delivery*, 2009, 16(2): 82-91. ISSN 1071-7544.
- NAKAHARA, K., N. S. ALZOREKY, T. YOSHIHASHI, H. T. T. NGUYEN a G. TRAKOONTIVAKORN. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 2013, 37(4): 249-252. ISSN 0021-3551.
- NOZIK-GRAYCK E., H. B. SULIMAN, C. A. PIANTADOSI. Extracellular superoxide dismutase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37(12): 2466-2471. ISSN 13572725.
- OAKLEY A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, 2011, 43(2): 138-151. ISSN 0360-2532.
- OETARI S., M. SUDIBYO, J. N.M. COMMANDEUR, R. SAMHOEDI, N. P.E. VERMEULEN. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 1996, 51(1): 39-45. ISSN 00062952.
- OLSON L. E., D. BEDJA, S. J. ALVEY, A. J. CARDOUNEL, K. L. GABRIELSON, R. H. REEVES. Protection from Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Mice with a Null Allele of Carbonyl Reductase 1. *Cancer Research*, 2003, 63(20): 6602-6606.

- ONAWUNMI G. O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 1989, 9(3): 105-108. ISSN 0266-8254.
- ORTIZ DE MONTELLANO P. R. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, c2005. ISBN 0306483246.
- OZKAYA A., SAHIN Z., GORGULU A. O., YUCE A., CELIK S. Geraniol attenuates hydrogen peroxide-induced liver fatty acid alterations in male rats. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 2016, 6(1): 29–35.
- RAHMAN S., R. PARVIN. Therapeutic potential of *Aegle marmelos* (L.)-An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2014, 4(1): 71–77.
- RAVN-HAREN G., A. OLSEN, A. TJØNNELAND, et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, 2006, 27(4): 820-825. ISSN 1460-2180.
- REPETTO G., A. DEL PESO, J. L. ZURITA. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 2008, 3(7): 1125-1131. ISSN 1754-2189.
- RIDDELL R. J., R.H. CLOTHIER a M. BALLS. An evaluation of three In vitro cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1986, 24(6-7): 469-471. ISSN 02786915.
- RIŽNER T. L. Enzymes of the AKR1B and AKR1C Subfamilies and Uterine Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 2012, 3. ISSN 1663-9812.
- ROBACKER D. C., L. B. HENDRY. Neral and geraniol: Components of the sex pheromone of the parasitic wasp, *Itoplectis conquisitor*. *Journal of Chemical Ecology*, 1977, 3(5): 563-577. ISSN 0098-0331.
- SAMER C.F., LORENZINI K. I., ROLLASON V. et al. Applications of CYP450 Testing in the Clinical Setting. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2013, 17: 165–184. ISSN 1177-1062.
- SANSEN S., J. K. YANO, R. L. REYNALD, G. A. SCHOCH, K. J. GRIFFIN, C. D. STOUT, E. F. JOHNSON. Adaptations for the Oxidation of Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons Exhibited by the Structure of Human P450 1A2. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(19): 14348-14355. ISSN 0021-9258.

- SEO K.-A., H. KIM, H.-Y. KU, H.-J. AHN, S.-J. PARK, S. K. BAE, J.-G. SHIN, K.-H. LIU. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 174(3): 141-146. ISSN 00092797.
- SINGER A. C., D. E. CROWLEY, I. P. THOMPSON. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(3): 123-130. ISSN 01677799.
- SINGH B. K., M. TRIPATHI, B. P. CHAUDHARI, P. K. PANDEY, P. KAKKAR. Natural terpenes prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress and release of apoptotic proteins during nimesulide-hepatotoxicity in rats. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34200.
- SINGH R. P., S. BANERJEE, A. R. RAO. Effect of *Aegle marmelos* on Biotransformation Enzyme Systems and Protection Against Free-radical-mediated Damage in Mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2000, 52(8): 991-1000. ISSN 00223573.
- SCHMIEDLIN-REN P., D. J. EDWARDS, M. FITZSIMMONS, K. S. LOWN, et al. Mechanisms of Enhanced Oral Availability of CYP3A4 Substrates by Grapefruit Constituents. *Drug Metabolism and Disposition*, 1997, 25(11): 1228-1233.
- SKÁLOVÁ Lenka, et al. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Druhé, upravené a rozšířené vydání.* Praha: Karolinum, 2017. ISBN 9788024637334.
- SMITH G. S., G. L. WALTER, R. M. WALKER. Clinical Pathology in Non-Clinical Toxicology Testing. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, Elsevier, 2013, s. 565-594. ISBN 9780124157590.
- SMITH P. K., R. I. KROHN, G. T. HERMANSON, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985, 150(1): 76-85. ISSN 00032697.
- STEINKELLNER H., Ch. HOELZL, M. UHL, et al. Coffee consumption induces GSTP in plasma and protects lymphocytes against (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induced DNA-damage: Results of controlled human

intervention trials. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005, 591(1-2): 264-275. ISSN 00275107.

- STEWARD D. J., R. L. HAINING, K. R. HENNE, G. DAVIS, T. H. RUSHMORE, W. F. TRAGER, A. E. RETTIE. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics*, 1997, 7(5): 361-367. ISSN 0960-314X.
- STRANGE R. C., M. A. SPITERI, S. RAMACHANDRAN, A. A. FRYER. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2001, 482(1-2): 21-26. ISSN 00275107.
- STUBBINS M. J., L. W. HARRIES, G. SMITH, M. H. TARBIT, C. R. WOLF. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics*, 1996, 6(5): 429-439. ISSN 0960-314X.
- TAK E., S. LEE, J. LEE, et al. Human carbonyl reductase 1 upregulated by hypoxia renders resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Hepatology*, 2011, 54(2): 328-339. ISSN 01688278.
- TANG H., N. LONG, M. DAI, L. LIN, J. LI, F. SUN, L. GUO. Effect of citral on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. *Pharmaceutical Biology*, 2018a, 56(1): 337-343. ISSN 1388-0209.
- TANG X., Y.-L. SHAO, Y.-J. TANG, W.-W. ZHOU. Antifungal Activity of Essential Oil Compounds (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Molecules*, 2018b, 23(9). ISSN 1420-3049.
- TESCHKE R. Hepatotoxicity: Molecular Mechanisms and Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(1). ISSN 1422-0067.
- TOWBIN H., T. STAEGELIN, J. GORDON. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76(9): 4350-4354. ISSN 0027-8424.
- VAN IERSEL M. L. P. S., J.-P. H.T.M. PLOEMEN, I. STRUIK, Ch. VAN AMERSFOORT, A. E. KEYZER, J. G. SCHEFFERLIE, P. J. VAN BLADEREN. Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by α,β -

unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal. *Chemico-Biological Interactions*, 1996, 102(2): 117-132. ISSN 00092797.

- VILLALOBOS M. C. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CITRAL CONTENT OF DIFFERENT TEA PREPARATIONS OF THE ABOVE-GROUND PARTS OF LEMONGRASS (*Cymbopogon citratus* Stapf.) Central Philippine University, 2015.
- WAGNER K.-H., I. ELMADFA. Biological Relevance of Terpenoids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2003, 47(3-4): 95-106. ISSN 0250-6807.
- WANG H., L. TOMPKINS. CYP2B6: New Insights into a Historically Overlooked Cytochrome P450 Isozyme. *Current Drug Metabolism*, 2008, 9(7): 598-610. ISSN 13892002.
- WANG L., N. JIANG, D. WANG, M. WANG. Effects of Essential Oil Citral on the Growth, Mycotoxin Biosynthesis and Transcriptomic Profile of *Alternaria alternata*. *Toxins*, 2019, 11(10). ISSN 2072-6651.
- WSÓL V., B. SZOTÁKOVÁ, et al. Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology*, 2007, 238(2-3): 111-118. ISSN 0300483X.
- XIAO Y., X. XUE, Y. WU, G. XIN, Y. QIAN, T. XIE, L. GONG, J. REN. β -Naphthoflavone protects mice from aristolochic acid-I-induced acute kidney injury in a CYP1A dependent mechanism. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009, 30(11): 1559-1565. ISSN 1671-4083.
- YANG P.-Ch., T. MAHMOOD. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 2012, 4(9). ISSN 1947-2714.
- YANG Z., YU Y., YAO L., LI G., WANG L., HU Y., WEI H., WANG L., HAMMAMI R., RAZAVI R., ZHONG Y., LIANG X. DetoxiProt: an integrated database for detoxification proteins. *BMC Genomics*, 2011, 12(3): S2.
- YASSAA N., I. PEEKEN, E. ZÖLLNER, K. BLUHM, S. ARNOLD, D. SPRACKLEN, J. WILLIAMS. Evidence for marine production of monoterpenes. *Environmental Chemistry*, 2008, 5(6). ISSN 1448-2517.

- ZANDERS E. D. The science and business of drug discovery: demystifying the jargon. New York: Springer, c2011. ISBN 14-419-9902-7.
- ZANGER U. M., K. KLEIN. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in Genetics*, 2013, 4. ISSN 1664-8021.
- ZÁRYBNICKÝ T., P. MATOUŠKOVÁ, B. LANCOŠOVÁ, Z. ŠUBRT, L. SKÁLOVÁ, I. BOUŠOVÁ. Inter-Individual Variability in Acute Toxicity of R-Pulegone and R-Menthofuran in Human Liver Slices and Their Influence on miRNA Expression Changes in Comparison to Acetaminophen. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018a, 19(6). ISSN 1422-0067.
- ZÁRYBNICKÝ T., I. BOUŠOVÁ, M. AMBROŽ, L. SKÁLOVÁ. Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Archives of Toxicology*, 2018b, 92(1): 1-13. ISSN 0340-5761.
- ZELKO I. N., T. J. MARIANI, R. J. FOLZ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33(3): 337-349. ISSN 08915849.
- ZHOU S.-F., J.-P. LIU, B. CHOWBAY. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews*, 2009, 41(2): 89-295. ISSN 0360-2532.
- ZULAK K. G., J. BOHLMANN. Terpenoid Biosynthesis and Specialized Vascular Cells of Conifer Defense. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(1): 86-97. ISSN 16729072.
- Web 1 - The HepaRG cell line. HepaRG [online]. Saint Grégoire France: BIOPREDIC International, 2020 [cit. 2020-02-03]. Dostupné z: <https://heparg.com/>
- Web 2 - Téma: Počítání buněk [online]. [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: http://www.rustreg.upol.cz/_materials/bubcv/BUBCV4.pdf

- Web 3 - Stanovení počtu erytrocytů v jednotce objemu krve [online]. [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <http://patofyziologie.lfp.cuni.cz/wp-content/uploads/2018/09/pocitani.pdf>
- Web 4 - Everyday Culture Practice. Eppendorf Handling Solution [online]. Eppendorf, 2019 [cit. 2019-11-24]. Dostupné z: <https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/reproducibility/scientific-background/everyday-culture-practice/>