

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



Diplomová práce

**Vliv vybraných monocyklických monoterpenů na aktivitu a
expresi antioxidantních enzymů v lidských játrech**

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

Hradec Králové 2021

Romana Fišerová

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

V Hradci Králové dne

.....

Romana Fišerová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své školitelce doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, trpělivost a čas, který mi při vypracování této práce věnovala. Zároveň bych chtěla poděkovat PharmDr. Tomášovi Zárybnickému, Ph.D. za pomoc a rady v experimentální části práce a celé katedře biochemických věd za příjemné pracovní prostředí. Ráda bych poděkovala také svému příteli a rodině za podporu a trpělivost po celou dobu mého studia. Za finanční podporu děkuji grantu GAČR 18-09946S.

OBSAH

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1 Terpenoidy.....	6
2.1.1 Monoterpeny.....	10
2.2 Oxidační stres a antioxidační systém organismu.....	17
2.2.1 Oxidační stres.....	18
2.2.2 Nízkomolekulární antioxidyanty.....	18
2.2.3 Vysokomolekulární antioxidyanty.....	20
2.2.4 Antioxidační enzymy.....	21
3. CÍL PRÁCE.....	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
4.1 Biologický materiál.....	25
4.2 Chemikálie.....	25
4.3 Přístroje.....	27
4.4 Příprava subcelulárních frakcí z lidských jater.....	29
4.4.1 Příprava roztoků.....	29
4.4.2 Pracovní postup.....	29
4.5 Příprava inkubačních směsí.....	30
4.6 Stanovení aktivity studovaných enzymů.....	31
4.6.1 Stanovení aktivity glutathionreduktasy.....	31
4.6.2 Stanovení aktivity glutathionperoxidasy.....	33
4.6.3 Stanovení aktivity katalasy.....	35
4.6.4 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy.....	37
4.6.5 BCA stanovení bílkoviny.....	39
4.7 Příprava lidských jaterních řezů.....	41
4.8 Stanovení exprese mRNA.....	42
4.8.1 Izolace RNA Trizolem.....	42

4.8.2	Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem	43
4.8.3	Ošetření DNAsou	44
4.8.4	Reverzní transkripce.....	45
4.8.5	Real-Time PCR.....	45
4.9	Stanovení aktivity GST v lidských jaterních řezech	48
4.10	Statistické zpracování výsledků	48
5.	VÝSLEDKY	49
5.1	Aktivita glutathionreduktasy v cytosolu	49
5.2	Aktivita glutathionperoxidasy v cytosolu	50
5.3	Aktivita katalasy v cytosolu	52
5.4	Aktivita glutathion-S-transferasy v cytosolu.....	53
5.5	Stanovení exprese mRNA v jaterních řezech.....	55
5.5.1	Vliv piperitonu na genovou expresi GSTA1.....	55
5.5.2	Vliv piperitonu na genovou expresi GSTP1	57
5.5.3	Vliv piperitonu na genovou expresi GPx1	58
5.5.4	Vliv piperitonu na genovou expresi GPx2	59
5.5.5	Vliv piperitonu na genovou expresi GPx4	60
5.5.6	Vliv piperitonu na genovou expresi GR.....	61
5.5.7	Vliv piperitonu na genovou expresi CAT	62
5.5.8	Vliv piperitonu na genovou expresi SOD	63
5.6	Stanovení aktivity GST	64
6.	DISKUSE.....	66
7.	ZÁVĚR.....	69
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	70
9.	POUŽITÁ LITERATURA.....	73

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Uchazečka: Romana Fišerová

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

Název diplomové práce: Vliv vybraných monocyklických monoterpenů na aktivitu a expresi antioxidantních enzymů v lidských játrech

Monocyklické monoterpeny patří mezi sekundární metabolity rostlin, které jsou charakteristické svou vůní a mají široké využití. Přitahují opylovače rostlin, uplatňují se v rostlinné komunikaci, v kosmetickém nebo potravinářském průmyslu. Jsou složkami koření, nápojů a potravin. U některých byla prokázána protinádorová aktivita, avšak neměli bychom zapomínat, že některé mají toxické účinky v různých orgánech lidského organismu, především v játrech. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký mají účinek (+)-karvon, (-)-karvon, (+)-isomenthon, (-)-isopulegol a piperiton na aktivitu a expresi mRNA antioxidantních enzymů v lidských játrech. Jaterní tkáň získaná od pacientů obou pohlaví ve věku 50 až 80 let byla použita jako biologický materiál. Nejprve byl hodnocen účinek vybraných monoterpenů (100 μM) na aktivitu enzymů glutathionreduktasy (GR), glutathionperoxidasy (GPx), katalasy (CAT) a glutathion-S-transferasy (GST) v subcelulárních frakcích získaných z lidské jaterní tkáně šesti dobrovolníků. V této části experimentu monoterpeny nejvíce ovlivňovaly katalytickou aktivitu cytosolické GST, nejvýraznější účinek vykazoval monoterpen piperiton, a proto byl vybrán do další části studie. Následně byl zkoumán účinek piperitonu (10 μM a 50 μM) na katalytickou aktivitu a expresi mRNA antioxidantních enzymů, k čemuž byly využity ultratenké lidské jaterní řezy (PCLS) získané od tří dobrovolníků. V PCLS byla zaznamenána nejvýznamnější indukce exprese mRNA GSTP1 a GPx1 vlivem piperitonu (10 μM) a GSTA1 (50 μM). Došlo také k významnému snížení hladin mRNA GPx2 vlivem piperitonu (50 μM). Aktivita GST v lidských PCLS byla zvýšena ve dvou jaterních vzorcích působením piperitonu (50 μM). Druhá zkoušená koncentrace (10 μM) vyvolala v jednom jaterním vzorku významný nárůst aktivity GST, ale u druhého pacienta významný pokles její aktivity.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Romana Fišerová

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

Title of diploma thesis: Effect of selected monocyclic monoterpenes on the activity and expression of antioxidant enzymes in human liver

Monocyclic monoterpenes belong to plant secondary metabolites, which are characterized by their aroma and possess a wide range of use. They attract pollinators and are involved in plant communication as well as in the cosmetic and food industries. They are ingredients of spices, beverages, and food. In some of them, anti-cancer activity has been proven, however, we should keep in mind that some of them exert toxic properties in various organs of the organism, mainly in the liver. The aim of this thesis was to find out what effect have (+)-carvone, (-)-carvone, (+)-isomenthone, (-)-isopulegol, and piperitone on the activity and mRNA expression of antioxidant enzymes in human liver. The liver tissues obtained from patients of both sexes and 50-80 years old were used as biological material. At first, the effect of the selected monoterpenes (100 μM) on the activity of the enzymes glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST) in subcellular fractions obtained from human liver tissue of six volunteers was evaluated. In this part of the experiment, monoterpenes influenced the catalytic activity of cytosolic GST the most; the most significant effect was shown by the monoterpene piperitone which was therefore selected for the next part of the study. Subsequently, the effect of piperitone (10 μM and 50 μM) on the catalytic activity and mRNA expression of antioxidant enzymes was examined using human precision-cut liver slices (PCLS) obtained from three volunteers. In PCLS, GSTP1 and GPx1 mRNA were most significantly induced by piperitone (10 μM) while piperitone (50 μM) induced GSTA1. Piperitone (50 μM) also considerably decreased the GPx2 mRNA levels. The activity of GST in human PCLS was increased in two liver samples by piperitone (50 μM). The other tested concentration (10 μM) caused a significant increase in the GST activity in one liver sample and a significant decrease in another one.

1. ÚVOD

Současně se zvyšujícím se užíváním léků na předpis roste zájem o přírodní léčivé přípravky a bylinné doplňky, které mají řadu prospěšných vlastností. Byliny a rostlinné produkty jsou obecně považovány za bezpečné a účinné alternativy chemických léčiv, proto se k nim obrací pozornost široké veřejnosti. Pozornost by však měla být věnovaná také potenciální toxicitě těchto produktů, protože přírodní produkty mohou vyvolávat různé toxické reakce (Ardalan a Rafieian-Kopaei 2013).

Rostlinné terpenoidy, především monoterpeny a seskviterpeny jsou kvůli jejich příjemné chuti a vůni složkou potravin, ale u některých byly prokázány hepatotoxické účinky. Příkladem může být hepatotoxicky působící monoterpen *R*-pulegon, který je hlavní složkou rostliny *Mentha pulegium* (Lamiaceae). Játra jsou díky své struktuře a funkci často cílovou tkání toxicity. Pro snížení rizika poškození jater je nezbytné věnovat terpenům více pozornosti (Šadibolová et al. 2019, Zárybnický et al. 2018a).

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na skupinu monoterpenů a jejich vliv na antioxidační enzymy, kterými byly glutathionreduktasa (GR), glutathionperoxidasa (GPx), katalasa (CAT), glutathion-*S*-transferasa (GST) a superoxiddismutasa (SOD). Z monoterpenů byl hodnocen účinek (+)-karvonu, (-)-karvonu, (+)-isomenthonu, (-)-isopulegolu a piperitonu na katalytickou aktivitu antioxidačních enzymů v subcelulárních frakcích získaných z lidské jaterní tkáně. Pomocí spektrofotometrických metod byla stanovena specifická aktivita enzymů, nejvýraznější účinek byl pozorován u piperitonu. Proto byl následně hodnocen jeho účinek na katalytickou aktivitu a expresi mRNA antioxidačních enzymů s použitím metody Real-Time PCR. Jako model byly použity ultratenké lidské jaterní řezy, které představují techniku *ex vivo* tkáňové kultury, která napodobuje mnohobuněčné vlastnosti orgánů *in vivo* (Olinga a Schuppan 2013).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Terpenoidy

Primární látková přeměna je obdobná nebo blízká pro buňky všech živých organismů, ale některé druhy rostlin a živočichů si vytvořily specifické postupy látkové přeměny (sekundární metabolismus). Jeho produkty jsou sekundární metabolity, které jsou typické zejména pro rostliny. Podle chemické struktury je dělíme na řadu skupin, mezi které patří například glykosidy, taniny, alkaloidy, flavonoidy nebo terpeny (Klouda 2013).

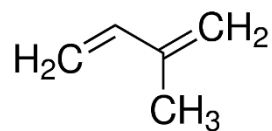
Terpenoidy patří do velké a strukturně různorodé skupiny přírodních produktů. Najdeme je především v rostlinné říši, kde se obvykle vyskytují v pryskyřičných a aromatických rostlinách. Pro každou část rostliny se procentuální podíl může lišit, vyskytují se v listech, kůře, větvích, kmeni, plodech nebo semenech. Tyto sloučeniny nalezneme také u zvířat, ale nejsou zde zastoupeny tak hojně. Mezi další přírodní zdroje můžeme zařadit mikroorganismy, jako jsou houby a bakterie (Dewick 2009, Roy 2019).

Bylo již identifikováno více než 30 000 terpenoidů a některé jsou nedílnou součástí primárního metabolismu. Příkladem mohou být hormony gibereliny, elektronové nosiče plastochinon a ubichinon nebo fotosyntetické pigmenty karotenoidy (Theis a Lerdau 2003).

Jak již bylo řečeno, rostlinné terpenoidy jsou rozděleny na primární terpenoidy, které jsou nezbytné pro udržení buněčných funkcí, a druhou skupinu tvoří sekundární metabolity. Ty nejsou pro růst rostlin životně důležité, ale podílejí se na stresové reakci rostlin a přitažlivosti pro opylovače rostlin. Právě tyto terpenoidy mají velký ekonomický význam, protože jsou široce používané v aromatickém, kosmetickém, farmaceutickém, zemědělském a chemickém průmyslu (Roy 2019).

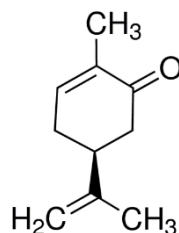
Terpenoidy neboli isoprenoidy jsou látky strukturně odvozené od isoprenu (2-methylbuta-1,3-dienu). Podle počtu isoprenových jednotek, a tedy i uhlíkových atomů, které tvoří molekulu terpenu, je rozdělujeme na:

- hemiterpeny, které se skládají z jedné isoprenové jednotky (C_5) – isopren (Obr. 1)



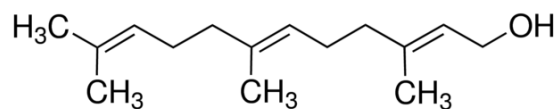
Obr. 1 Isopren

- monoterpeny, které se skládají ze dvou isoprenových jednotek (C₁₀) – např. karvon (Obr. 2), menthol



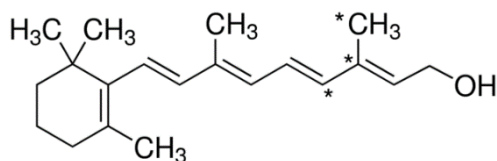
Obr. 2 (+)-Karvon

- seskviterpeny, které se skládají ze tří isoprenových jednotek (C₁₅) – např. farnesol (Obr. 3)



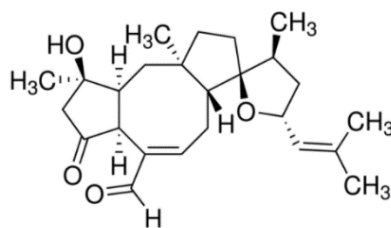
Obr. 3 Farnesol

- diterpeny, které se skládají ze čtyř isoprenových jednotek (C₂₀) – např. retinol (Obr. 4), fytol



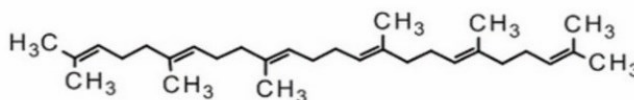
Obr. 4 Retinol

- sesterterpeny, které se skládají z pěti isoprenových jednotek (C₂₅) – např. genepolid, ofiobolin A (Obr. 5)



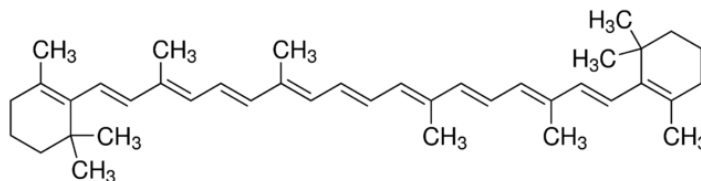
Obr. 5 Ofiobolin A

- triterpeny, které se skládají ze šesti isoprenových jednotek (C_{30}) – např. skvalen (Obr. 6)



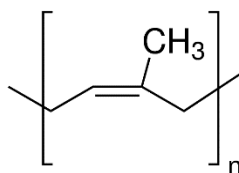
Obr. 6 Skvalen

- tetraterpeny, které se skládají z osmi isoprenových jednotek (C_{40}) – např. β -karoten (Obr. 7)



Obr. 7 β -karoten

- polyterpeny, které se skládají z více než osmi isoprenových jednotek ($C > 40$) – např. polyisopren (Obr. 8), dolichol



Obr. 8 Polyisopren

Zvláštní skupinu isoprenoidů tvoří steroidy, které vznikají modifikací triterpenů a obsahují tetracyklické steranové jádro.

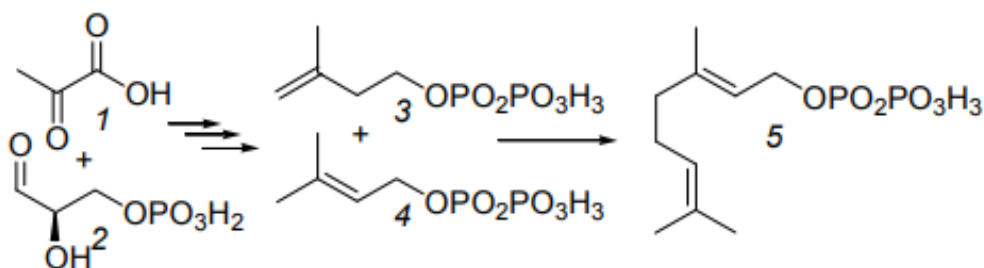
Isoprenové jednotky v terpenoidech se spojují způsobem hlava-hlava, hlava-pata, pata-pata. Hlavou je atom $C_{(1)}$, patou koncový atom $C_{(4)}$. Terpeny můžeme podle uspořádání řetězce rozdělit na alifatické nebo cyklické. Dále můžeme terpeny klasifikovat

na uhlovodíky nebo jejich deriváty. Nejčastěji se jedná o alkoholy, aldehydy a ketony (Dewick 2009, Klouda 2013).

Biosyntéza terpenů probíhá dvěma cestami, které se od sebe liší způsobem vzniku základních prekurzorů isopentenylidifosfátu (IPP) a dimethylallyldifosfátu (DMAPP). První cestou biosyntézy je mevalonátová cesta, ke které dochází v cytosolu buněk. Tak vznikají prekurzory seskviterpenů a triterpenů. IPP vzniká z acetyl-CoA přes kyselinu mevalonovou a DMAPP poté isomerizací IPP. Druhá cesta biosyntézy je pyruvátová cesta, kde jsou prekurzory (IPP a DMAPP) monoterpenů, diterpenů a tetraterpenů syntetizovány přes 1-deoxy-*D*-xyluloso-5-fosfát v plastidech buněk. Zde prekurzory vznikají odděleně (DMAPP nevzniká isomerizací IPP). V rostlinách však může docházet k propojení obou biochemických cest (Dewick 2009).

Biosyntéza monoterpenů se skládá ze 4 fází:

1. Nejprve se tvoří základní stavební jednotky terpenů (IPP a DMAPP) pyruvátovou cestou. Dochází ke kondenzaci dvou atomů uhlíku z pyruvátu (1) s glycerinaldehyd-3-fosfátem (2). Takto začíná šestistupňová syntéza IPP (3) a DMAPP (4) (Obr. 9).



Obr. 9 Kondenzace pyruvátu (1) a glycerinaldehyd-3-fosfátu (2) za vzniku prekurzorů isopentenylidifosfátu (3) a dimethylallyldifosfátu (4), z nichž se dále tvoří geranylidifosfát (5) (převzato ze Dvořáková et al. 2011).

2. Dochází ke kondenzaci IPP a DMAPP a vzniká geranylidifosfát (GPP) (5, Obr. 9). Reakce je katalyzovaná enzymem GPP-synthasou ze skupiny prenyltransferas.
3. Následně dochází transformací GPP monoterpenocyklasami ke vzniku základního skeletu podskupiny monoterpenů. Do podskupiny monoterpenů patří například acyklické monoterpeny, karany, thujany nebo pinany.

4. Poslední fází je vznik derivátů modifikací základního skeletu. Přičemž nepolární monoterpenické uhlovodíky jsou hydroxylovány monooxygenasami (např. cytochromy P450), oxidovány nespecifickými alkoholdehydrogenasami, případně acylovány acyltransferasami (Dvořáková et al. 2011).

Po požití se terpeny dobře vstřebávají s tukem, který působí jako nosič. Metabolismus terpenů začíná hydroxylací nebo epoxidací mikrosomálními monooxidasami. Následně jsou vytvořené primární metabolity transformovány na více polární sloučeniny, jako jsou dioly nebo karboxylové sloučeniny a jsou vylučovány močí jako ve vodě vysoce rozpustné adukty s kyselinou sírovou, glukuronovou nebo jako kyselina merkapturová (Engel 2001).

Terpeny vykazují širokou škálu biologických a farmaceutických aktivit a mohou se také chovat jako antioxidantní, ale i prooxidační sloučeniny. Chování konkrétního terpenu závisí ze všeho nejvíce na koncentraci. Při vysokých koncentracích může terpen působit prooxidačně, zatímco při nižších koncentracích jako antioxidantní sloučenina (González-Burgos a Gómez-Serranillos 2012).

Byl studován vztah antioxidantních vlastností a struktury terpenů. Konjugované dvojně vazby ve struktuře terpenů jsou pravděpodobně zodpovědné za jejich antioxidantní aktivitu. Studie porovnávala monoterpeny, které jsou aktivními antioxidanty a obsahují konjugované dvojně vazby (karvon, pulegon, α -phellandren) s terpeny, které nemají tyto vlastnosti a jsou bez tohoto strukturního prvku. Například citronellal nebo menthon. Výzkum také odhalil vyšší schopnost *S*-karvonu vychytávat volné radikály než α -tokoferol (Wojtunik-Kulesza et al. 2019).

2.1.1 Monoterpeny

Obecný molekulový vzorec $C_{10}H_{16}$ náleží monoterpenům, které se skládají ze dvou isoprenových jednotek. Nejčastěji se jedná o acyklické, monocyklické nebo bicyklické struktury. V přírodních produktech bylo identifikováno více než 1 000 různých monoterpenů, z nichž mnoho je těkavých. V přírodě se často vyskytují ve formě derivátů, které vznikají například oxidací nebo methylovací a hrají roli v rostlinné komunikaci, obraně rostlin a také přitahují opylovače. Využívají se v parfumerii, kosmetice a jako insekticidy (Evidente et al. 2015, Salminen et al. 2008). Terpeny mohou obsahovat jeden

nebo více asymetrických uhlíků. Optická aktivita terpenů je příčinou odlišné vůně, biologické aktivity a způsobu účinku optických isomerů (Souza et al. 2013).

Monoterpeny jsou v rostlinách syntetizovány v parenchymatických buňkách a poté jsou uloženy ve vakuolách, v buněčné stěně, případně ve speciálních exkretních pletivech. Lze je snadno identifikovat díky jejich těkavosti, a navíc se lehce získají destilací s vodní parou jako tzv. rostlinné silice. Silice jsou nejčastějším zdrojem monoterpenů, tvoří rostlinné aroma a jsou syntetizovány asi u 10 % všech rostlinných druhů. Rostlinné aroma se odvíjí zejména od absolutní konfigurace hlavních monoterpenů obsažených v rostlině. Například základem citrusového aroma jsou (*R*)-(+)-limonen a (*R*)-(+)- β -citronellol. Zatímco (*S*)-(-)-limonen je základem vůně borového jehličí a (*S*)-(-)- β -citronellol vůně růží. K nejznámějším silicím patří olej kajeputu střídavolistého (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae), známý spíše pod názvem tea tree oil. Jeho hlavními složkami jsou 4-terpineol, p-cymen a γ -terpinen. Tea tree oil má fungicidní a antibakteriální účinky (Dvořáková et al. 2011).

U některých monoterpenů byla pozorována protinádorová aktivita. Například *D*-limonen a *D*-karvon snižují tvorbu karcinomu předžaludku a plic (Wattenberg 1989). Jelikož se některé monoterpeny používají jako insekticidy, neměli bychom ale zapomínat, že v lidském organismu mohou vykazovat toxické účinky v různých orgánech (především v játrech). Jedná se například o *R*-pulegon, *R*-menthofuran, nebo kafr (Roy 2019, Zárbybnický et al. 2018a).

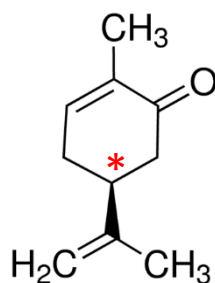
V navazujících částech diplomové práce se budu detailněji věnovat popisu jednotlivých monocyklických monoterpenů, které byly předmětem mé experimentální práce.

2.1.1.1 (+)-karvon

Strukturní název karvonu je 2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyklohex-2-en-1-on. Od latinského názvu kmínu *Carum carvi* je odvozen triviální název tohoto terpenu – karvon (de Carvalho a da Fonseca 2006, Dewick 2009, Sell 2003).

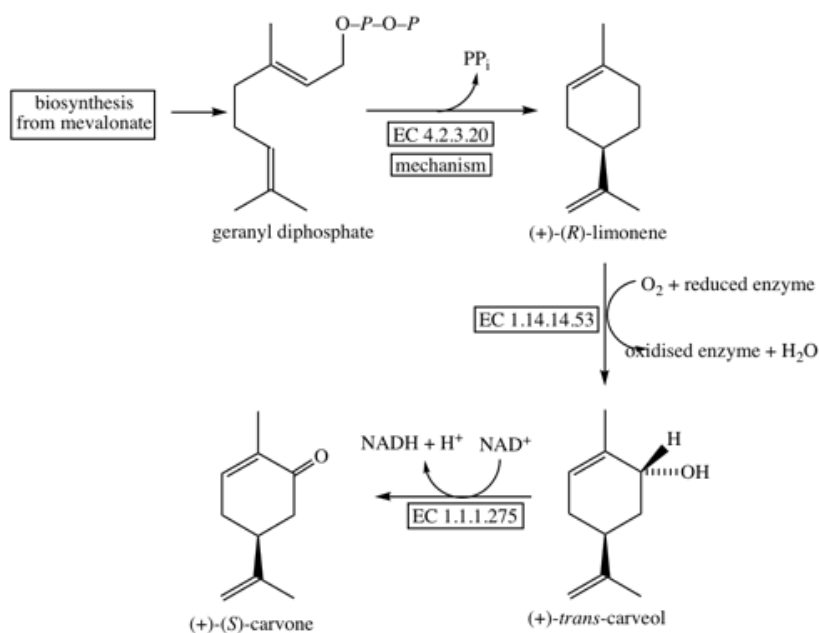
Karvon je monocyklický monoterpenový keton, který obsahuje jeden asymetrický uhlík, nesoucí isopropenyl. V přírodě se proto karvon vyskytuje v obou enantiomerních formách - (*R*)-(-)-karvon (*L*-karvon) a (*S*)-(+)-karvon (*D*-karvon; obr. 10), který má

typickou vůni kmínu nebo kopru. Nalezneme ho jako hlavní složku kmínu (*Carum carvi*, Apiaceae). Kmínový olej může obsahovat až 85 % *D*-isomeru karvonu. Stejný isomer najdeme také v koprovém oleji (*Anethum graveolens*, Apiaceae) v množství až 65 %.



Obr. 10 (+)-karvon

Výroba (+)-karvonu zahrnuje chemickou nebo biotechnologickou syntézu, extrakci a čištění silic kmínu nebo kopru. Biotechnologické techniky se jeví jako účinný způsob, jak uspokojit rostoucí poptávku, a to i s ohledem na životní prostředí. V dnešní době je aroma kmínu a kopru získáno především z přírodních zdrojů. V plodu kmínu je biosyntéza (+)-karvonu vícestupňová. Probíhá přes geranyldifosfát, kdy cyklizací vzniká (+)-limonen. Následně je tento meziprodukt přeměněn na (+)-*trans*-karveol a v posledním kroku dochází k oxidaci (+)-*trans*-karveolu na (+)-karvon za pomoci (+)-*trans*-karveoldehydrogenasy (Obr. 11) (de Carvalho a da Fonseca 2006, Sell 2003).



Obr. 11 Biosyntéza (+)-karvonu (dostupné z:

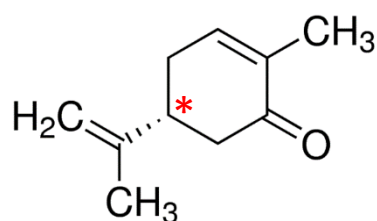
<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/reaction/terp/carvone.html>)

D-karvon se využívá jako vůně, aroma nebo jako inhibitor klíčení brambor. Byly prokázány jeho antibakteriální a antifungální účinky. Působí antikonvulzivně blokadou napěťově řízených sodíkových kanálů. Především v posledních letech byl (+)-karvon používán jako výchozí materiál při syntéze významných sloučenin, kterými jsou například 1,4-dialdehydy nebo 8,14-sekosteroidy (de Carvalho a da Fonseca 2006, Nogoceke et al. 2016). Některé monoterpeny, jako jsou citral, geraniol nebo karvon, vykazují účinnost proti infekci viru herpes simplex typu 1 (Roy 2019).

Karvon a řada sloučenin s ním souvisejících byly hodnoceny z hlediska schopnosti zvýšit aktivitu glutathion-*S*-transferasy *in vivo*. Výsledky ukazují, že (+)-karvon projevil nejvyšší aktivitu jako induktor ve všech testovaných tkání myši. Ukázalo se, že jeho protinádorová aktivita souvisí právě se schopností zvýšit aktivitu detoxikačních enzymů. Z čehož vyplývá, že sloučeniny karvonu by mohly být potenciálními chemoprotektivními látkami (Zheng et al. 1992).

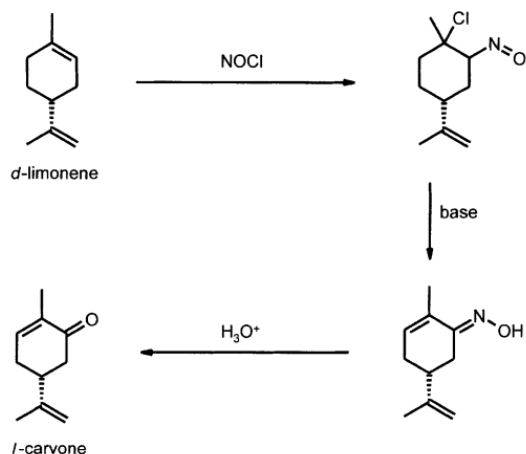
2.1.1.2 (-)-karvon

L-karvon (Obr. 12) má typickou sladkou mátovou vůni a je hlavní složkou máty (*Mentha spicata* var. *crispa*, Lamiaceae). Mátový olej obsahuje až 75 % (-)-karvonu. Používá se jako vonná a chuťová přísada, má spasmolytické, antinociceptivní a anxiolytické účinky, zvyšuje tepovou frekvenci a diastolický krevní tlak (Nogoceke et al. 2016, Sell 2003, Souza et al. 2013). Byl prokázán hypolipidemický účinek (-)-karvonu srovnatelný s fenofibrátem a schopnost zvyšovat proliferaci a sekreci insulinu v β -buňkách pankreatu (Abbas et al. 2020). (-)-Karvon byl použit jako výchozí materiál pro různé sloučeniny jako jsou fosforované 4,5-dihydroisoxazoly nebo chirální cyklohexanony (de Carvalho a da Fonseca 2006).



Obr. 12 (-)-karvon

Nejúčinnějším způsobem, jak získat *L*-karvon pro dnešní velké využití je stále syntéza vyvinutá již v 19. století, jelikož příroda poskytuje levnou chirální výchozí látku *D*-limonen (Obr. 13, Sell 2003).



Obr. 13 Syntéza (-)-karvonu (převzato ze Sell 2003)

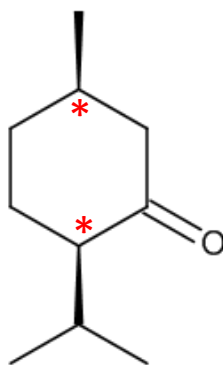
Hojné využití karvonu jako přísady do potravin vedlo k prozkoumání jeho metabolické dráhy. Po inkubaci obou enantiomerů s jaterními mikrosomy byla pozorována stereoselektivní biotransformace, kdy *R*-karvon byl přeměněn na *R*-karveol a z *S*-karvonu vznikl *S*-karveol (de Carvalho a da Fonseca 2006).

2.1.1.3 (+)-isomenthon

Kapalný monoterpen (+)-isomenthon ((2*R*,5*R*)-5-methyl-2-propan-2-ylcyklohexan-1-on) má ve své struktuře dva asymetrické uhlíky a ketoskupinu (Obr. 14). Nalezneme ho jako složku máty vedle majoritního mentholu a je pro něj charakteristická vůně máty. Jako hlavní složku nalezneme *D*-isomenthon v *Pelargonium tomentosum* (Geraniaceae), kde je zastoupen 61-62 %. Druhou nejvýše zastoupenou složkou je (+)-menthon (25-27 %), zbytek tvoří terpenické uhlovodíky. Tento druh pelargónie původem z Jižní Afriky má potenciál stát se novou plodinou pro výrobu přírodní silice s mátovou vůní v této oblasti. Silice *P. tomentosum* nachází využití především v parfémovém průmyslu (Demarne a van der Walt 1990).

Nynější poznatky naznačují souvislost mezi obsahem chlorofylu a produkcí silic. Je pravděpodobné, že rostoucí obsah chlorofylu v *P. tomentosum* by se mohl promítnout ve vyšších výnosech cenné silice, k čemuž jsou ale potřeba provést další šetření (Butcher et al. 2017).

D-isomer isomenthonu nalezneme i v dalších přírodních zdrojích, příkladem je vytrvalá bylina *Micromeria abyssinica* (Lamiaceae), ve které je obsah isomethonu 42 %. Hlavní složkou je monoterpen pulegon, který tvoří 47-48 % (Naves 1948).

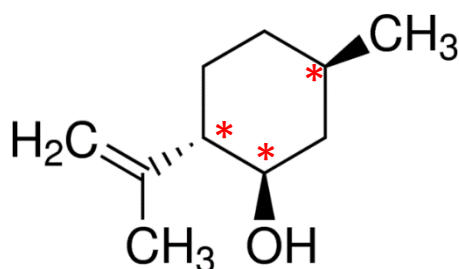


Obr. 14 (+)-isomenthon

2.1.1.4 (-)-isopulegol

Monoterpenový alkohol (-)-isopulegol ((1*R*,2*S*,5*R*)-5-methyl-2-prop-1-en-2-ylcyklohexan-1-ol) má ve své molekule tři chirální centra (Obr. 15). Je meziproduktem při přípravě (-)-mentholu a nalezneme ho v silicích různých rostlin. Regenerovanou silici, která obsahuje až 53 % isopulegolu, můžeme získat z rostliny *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae). Důležitějšími přírodními zdroji isopulegolu jsou silice z *Citrus limon* (Rutaceae) a *Mentha pulegium* (Lamiaceae), která je běžně známá jako pennyroyal. Listy mají silný mátový zápach a používají se čerstvé nebo sušené. Čaj nebo silice, které se z listů připravují, sloužily po mnoho let jako aromatický stimulant, karminativní prostředek nebo abortivum. Nicméně velké množství může způsobit těžkou hepatotoxicitu (Díaz-Maroto et al. 2007, Gordon a Khojasteh 2015, Rao et al. 2003, Silva et al. 2007). Vedle pulegonu jako hlavní složky nalezneme v *Mentha pulegium* také menthon, piperiton nebo isopulegol (Ekrami et al. 2019).

Studie u hlodavců prokázaly anxiolytické, antikonvulzivní, gastroprotektivní a antioxidační účinky isopulegolu. Byl také dokázán vliv na ochranu β -buněk pankreatu a stimulaci sekrece insulinu (Kalaivani a Sankaranarayanan 2019, Próspero et al. 2018).



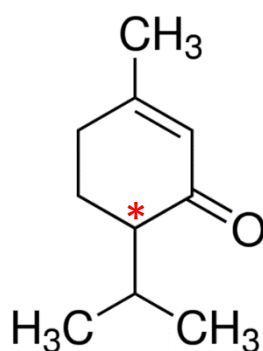
Obr. 15 (-)-isopulegol

2.1.1.5 Piperiton

Piperiton (3-methyl-6-propan-2-ylcyklohex-2-en-1-on) může existovat ve dvou stereoisomerních formách - (-)-piperiton a (+)-piperiton (Obr. 16). Předpokládá se, že fyziologicky se vyskytující piperiton je (+)-enantiomer a k úplné nebo částečné racemizaci obvykle dochází během izolace (Burbott et al. 1983).

Cymbopogon schoenanthus (Panicoideae) neboli velbloudí tráva je aromatická rostlina, která roste v severní oblasti Toga a používá se jako aroma, projímadlo nebo antikonvulzivum. Silice extrahovaná z listů *C. schoenanthus* obsahuje až 61 % piperitonu. Tuto složku nalezneme v dalších rostlinách rodů, jako jsou *Eucalyptus* (Myrtaceae) nebo *Mentha* (Lamiaceae). Jak již bylo zmíněno, piperiton se nachází v *Mentha pulegium*, ale také v *Mentha spicata* pěstované na území Turecka. Příslušný chemotyp obsahoval značné množství piperitonu, jelikož geografické a povětrnostní podmínky ovlivňují množství hlavních složek (Ketoh et al. 2006, Telci et al. 2010). Dalším příkladem je *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) pěstovaná na ostrově Little Andaman, kde obsah piperitonu činí 3,31 % (Raina et al. 2001).

Studie provedená s nově nakladenými vajíčky, larvami a dospělými jedinci *Callosobruchus maculatus* dokazuje insekticidní účinky piperitonu. Potvrdila se schopnost piperitonu zvýšit antimikrobiální aktivitu furazolidonu a nitrofurantoinu proti bakteriím, jako jsou například *Salmonella* nebo *Klebsiella* a také jeho antifungální účinky (Ketoh et al. 2006, Irají et al. 2020, Shahverdia et al. 2004).



Obr. 16 Piperiton

2.2 Oxidační stres a antioxidační systém organismu

Organismy po celý život produkují reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS), mezi které řadíme například hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$), superoxidový radikálový anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oxid dusnatý ($\text{NO}\cdot$), peroxyinitrit (ONOO^-), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), kyselinu chlornou (HOCl) nebo peroxid vodíku (H_2O_2). RONS zahrnují především volné radikály, ale i sloučeniny související s metabolismem kyslíku nebo dusíku, které nemají nepárový elektron, jako je peroxid vodíku (Boušová a Dršata 2017, Linton et al. 2001).

Volné radikály jsou látky (atomy, molekuly, ionty), které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron (event. více nepárových elektronů). Vznikají z normální částice ztrátou elektronu (oxidací) nebo přijetím elektronu (redukci). Možné je také homolytické štěpení na dvě částice, přičemž každá získá jeden elektron. Tento způsob vyžaduje značné množství energie, a proto v biologických systémech prakticky nepřichází v úvahu. Volné radikály jsou málo stabilní a vysoce reaktivní látky, aby dosáhly stabilní konfigurace, snaží se doplnit chybějící párový elektron. Získají ho buď setkáním s jiným radikálem, častěji však vytržením elektronu z normální molekuly. Z té se následně stává radikál, proces pokračuje a vzniká řetězová reakce, která vede k poškození řady molekul. K ukončení dochází reakcí dvou radikálů nebo pokud se radikál setká s látkou, jejíž radikál je stabilní a může existovat delší dobu (např. α -tokoferol) (Boušová a Dršata 2017, Racek 2003).

V organismu se především setkáme s volnými radikály kyslíku, volný elektron může ale patřit i jinému atomu, nejčastěji dusíku. Představitelem je oxid dusnatý, který se syntetizuje z aminokyseliny *L*-argininu za katalýzy enzymu NO-synthasy a má mimo jiné vasodilatační a neuromodulační účinky. Poskytuje řadu sloučenin ať už charakteru volných radikálů nebo sloučenin bez nepárového elektronu, souhrnně označovaných jako reaktivní formy dusíku (RNS). Mezi RNS řadíme například peroxyinitrit (ONOO^-), který je silným cytotoxickým oxidačním agens (Boušová a Dršata 2017, Pláteník 2009, Racek 2003).

Proti toxickému vlivu volných radikálů se postupně vyvinuly účinné ochranné mechanismy, které můžeme rozdělit do tří skupin. Primární antioxidanty brání tvorbě volných radikálů (např. chelátory iontů, inhibitory xanthinoxidasy a NADPH-oxidasy, transportní bílkoviny), sekundární antioxidanty vychytávají již vytvořené volné radikály (např. antioxidační enzymy a redukující látky) a terciární antioxidanty zajišťují opravu a

eliminaci biomolekul poškozených volnými radikály (např. methioninsulfoxidreduktasa, DNA-fotolyasa, fosfolipasy, proteasy, endonukleasy). Volné radikály působí odebráním elektronu molekulám oxidačně a látky, které brání jejich působení, označujeme jako antioxidanty (Boušová a Dršata 2017, Racek 2003).

2.2.1 Oxidační stres

Mezi produkcí volných radikálů a antioxidanty existuje za normálních okolností rovnováha, pokud nenastává, dochází k poruchám, které mohou organismus vážně ohrozit. Nejčastěji dochází k převaze volných radikálů ať už jejich zvýšenou tvorbou, sníženou koncentrací antioxidantů nebo kombinací. Tento stav je označován jako oxidační stres, který může vést k rozvoji chorob (např. ateroskleróza, diabetes mellitus). Účelem antioxidační ochrany ale není zcela eliminovat RONS z organismu, neboť tyto sloučeniny plní i řadu fyziologických funkcí, převaha antioxidantů má také nepříznivé následky (Boušová a Dršata 2017, Pláteník 2009, Racek 2003).

Lidský organismus je vybaven řadou antioxidantů vyvažujících účinky oxidantů, rozdělit je můžeme například na enzymatické (např. superoxid-dismutasa, katalasa) a neenzymatické (např. glutathion, vitamin C, transferin) (Birden et al. 2012).

2.2.2 Nízkomolekulární antioxidanty

Podle původu rozdělujeme nízkomolekulární antioxidanty na endogenní (tvořeny v organismu) a exogenní (přicházející zvenčí).

A) Exogenní antioxidanty

2.2.2.1 Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E má lipofilní charakter, nejběžnější a biologicky aktivní formou je α -tokoferol. Jedná se o typický membránový antioxidant, který se uplatňuje v antioxidační ochraně lipidů biologických membrán a lipoproteinových částic plazmy (Engin 2009, Racek 2003). Z různých isomerů je biologicky nejúčinnější *RRR*- α -tokoferol, který je v játrech vychytáván a inkorporován do VLDL lipoproteinů pomocí specifického proteinu α -TTP (α -tocopherol transfer protein) (Pláteník 2009). Při reakci vitaminu E a volného radikálu vzniká tokoferoxylový radikál a dochází k inaktivaci a ztrátě antioxidační aktivity vitaminu E (Racek 2003).

2.2.2.2 Vitamin C (kyselina askorbová)

Vitamin C je ve vodě rozpustný vitamin, odvozený od *L*-gulono- γ -laktonu, který nalezneme v mnoha druzích ovoce a zeleniny. Pro člověka je jeho příjem z potravy nezbytný, jelikož není schopen si ho vyrobit kvůli mutaci *L*-gulonolaktonoxidasy. S rostoucím věkem plazmatické hladiny vitaminu C klesají. Vitamin C stimuluje obranyschopnost organismu a mimo jiné zvyšuje aktivitu fagocytů a chrání jejich membrány před oxidačním poškozením. Specifická je vlastnost askorbátu se recyklovat, při reakci s oxidantem dochází k oxidaci na semidehydroaskorbát a dále na dehydroaskorbát. Některé dehydroaskorbáty mohou být katabolizovány na konečné produkty a zbylé redukovány zpět na askorbát, pomocí enzymů nebo glutathionu (Birden et al. 2012, Cooke et al. 2002, Johnson et al. 2008, Racek 2003).

Kyselina askorbová je potřebná při biosyntéze kolagenu, při tvorbě glykosaminoglykanů, karnitinu, noradrenalinu, působí jako kofaktor řady enzymů, účastní se metabolismu cholesterolu a sehrává významnou úlohu v oxidoredukčních dějích a jako antioxidant (Racek 2003).

2.2.2.3 Flavonoidy

Flavonoidy nacházíme v cévnatých rostlinách, skupinu tvoří více než 2 000 sloučenin, jejichž základní struktura je tvořena difenylpropanovým skeletem substituovaným různým počtem a uspořádáním hydroxylových skupin (Cooke et al. 2002). Kromě antioxidačních vlastností mají flavonoidy také antibakteriální, antivirové, protizánětlivé, vasodilatační, antiischemické a protirakovinné účinky. Jsou schopné inhibovat peroxidaci lipidů a agregaci trombocytů, chelatují železo, čímž pravděpodobně také tlumí antioxidační stres tkáně, nelze je ale považovat pouze za antioxidanty, protože za určitých okolností mohou působit i jako prooxidanty (Procházková et al. 2011, Štípek et al. 2000).

2.2.2.4 Karotenoidy

Karotenoidy rozlišujeme podle modifikací na jejich základní uhlíkové kostře (C_{40}) skládající se z konjugovaných dvojných vazeb. Právě polyenový řetězec je bohatý na elektrony a karotenoidy jsou díky němu náchylné k elektrofilnímu útoku, a tudíž lapají volné radikály. Jsou rozpustné v tucích, podílejí se na antioxidační ochraně lipidových membrán, mohou působit synergicky s tokoferoly (Cooke et al. 2002).

B) Endogenní antioxidanty

2.2.2.5 *Kyselina močová*

Kyselina močová je ve vodě rozpustný antioxidant a konečný produkt odbourávání purinů, byla dlouho považována za odpadní produkt. Ukazuje se však jako nejhojnější a nejdůležitější antioxidant krevní plazmy. Může darovat elektron za vzniku urátového radikálu, který není recyklován, ale degradován různými cestami. Reaguje s řadou látek, jako jsou peroxid vodíku, hydroxylový radikál, peroxyinitrit nebo oxid dusnatý. Reakce mohou být prospěšné, ale i škodlivé jako například reakce s peroxyinitritem, kdy dochází ke vzniku radikálů a alkylovaných sloučenin (Johnson et al. 2008, Štípek et al. 2000).

2.2.2.6 *Glutathion (GSH)*

Nejvýznamnější intracelulární neenzymový antioxidant je glutathion, který se v buňkách vyskytuje ve vysokých koncentracích. Chemicky se jedná o tripeptid γ -glutamyl-cysteinylglycin. Převažuje jeho redukovaná forma (GSH), která se snadno oxiduje a vzniká glutathiondisulfid (oxidovaný glutathion – GSSG). Úkolem glutathionu je odstraňovat ROS, udržovat v redukované formě thiolové skupiny proteinů, cysteinu, koenzymu A a regenerovat tokoferol a askorbát. GSH je nezbytným substrátem glutathionperoxidasy, uplatňuje se v detoxikačních reakcích (např. likvidace produktů lipoperoxidace) katalyzovaných glutathion-S-transferasou. Převážná většina buněčného GSSG je redukována glutathionreduktasou na GSH, pokles redukovaného GSH se projeví jako jeden z příznaků oxidačního stresu (Racek 2003, Štípek et al. 2000).

2.2.3 **Vysokomolekulární antioxidanty**

Přechodné prvky se chovají jako volné radikály a účastní se radikálových reakcí, z biogenních prvků mezi ně řadíme především železo a měď. Mezi nejdůležitější reakce, při nichž vznikají ROS, patří reakce přechodných kovů (např. železa) s peroxidem vodíku. Železo reaguje ve dvojmocné formě, dochází k oxidaci na trojmocné železo za vzniku hydroxylového radikálu, který může započít například proces lipoperoxidace. Kovy se účastní Fentonovy reakce pouze pokud jsou volné a v redukované formě. Organismus se tomuto snaží zabránit vazbou kovů v pevném chelátu (např. na transportním nebo skladovacím proteinu) nebo oxidací kovu na vyšší valenci. Řada proteinů má schopnost vázat přechodné prvky a měnit jejich oxidoredukční vlastnosti,

jedná se například o transferin, laktoferin, feritin, haptoglobin, hemopexin, ceruloplazmin, albumin nebo metalothioneiny.

Železo je ve své trojmocné formě vázáno na transferin při transportu v plazmě a v molekule feritinu je vázáno v buňkách střevní sliznice a kostní dřeni. V leukocytech se železo váže na bílkovinu laktoferin. Feritin působí antioxidantně svou feroxidasovou aktivitou, díky které je skladované železo udržováno v oxidovaném stavu, dokud ho neuvolní silně redukující látka (askorbát). V krvi zajišťuje oxidaci železa (před transportem na transferinu) ceruloplasmin. Hemoglobin uvolněný z erytrocytů a hem z hemoproteinů jsou nebezpečnou formou železa pro organismus. Antioxidantně proto působí haptoglobin, který vylučuje extracelulární hemoglobin a hemopexin, který váže uvolněný hem. Reaktivitu volných radikálů významně ovlivňují také thiolové skupiny některých proteinů, jako jsou albumin nebo metalothioneiny. Pomocí síry chelatují ionty kovů a jejich syntéza se zvyšuje při oxidačním stresu (Racek 2003, Štípek et al. 2000).

2.2.4 Antioxidační enzymy

2.2.4.1 *Superoxiddismutasa (SOD)*

Je základní antioxidační enzym, který se vyskytuje ve všech aerobních organismech. Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku, sám o sobě není příliš reaktivní, ale mohou z něj vznikat mnohem reaktivnější, nebezpečnější formy jako například peroxid vodíku, hydroxylový radikál nebo peroxynitrit. Nejškodlivější z nich je hydroxylový radikál, který má velmi rychlý poločas rozpadu a neexistuje tedy mechanismus k jeho odstranění. Proto je důležité odstranit přebytečný superoxid a zabránit tak vzniku hydroxylového radikálu. Superoxid se dismutací přeměňuje na H_2O_2 a O_2 , reakce je katalyzovaná SOD. Na odstranění vzniklého peroxidu vodíku se podílejí enzymy katalasa a peroxidasy. Rozlišujeme tři formy SOD (Mn^{2+} -SOD, Fe^{3+} -SOD, Cu^{2+}/Zn^{2+} -SOD) lišící se kofaktorem, kterým je atom kovu. Pokles aktivity SOD u některých onemocnění může následkem nedostatečného odstraňování superoxidu poškozovat organismus působením ROS, k poklesu aktivity enzymu dochází také ve stáří, jelikož se celkově oslabuje antioxidační ochrana organismu (Racek 2003).

2.2.4.2 Katalasa (CAT)

Katalasa je enzym, který působí na peroxid vodíku ve vysokých koncentracích (na nízké koncentrace H_2O_2 působí peroxidasy) a štěpí ho na vodu a kyslík. Jedná se o hemoprotein se čtyřmi podjednotkami, který navazuje na činnost SOD, ochraňuje buňky před toxickým vlivem peroxidu vodíku. Aktivita katalasy je v lidském organismu nejvyšší v mitochondriích a peroxisomech hepatocytů a v cytoplasmě erytrocytů. Dědičný deficit katalasy je vzácný a nedoprovází ho závažné klinické příznaky (Boušová a Dršata 2017, Racek 2003).

2.2.4.3 Peroxidasy

Jsou rozsáhlou skupinou hemoproteinů patřící mezi nejvýznamnější intracelulární enzymové antioxidanty. V lidském organismu je najdeme především v erytrocytech, leukocytech a trombocytech. Jejich hlavní funkcí je odstraňovat toxický peroxid vodíku a organické hydroperoxy nebo mohou oxidovat některé xenobiotické substráty. Peroxidasy redukují peroxid vodíku, současně se ale oxiduje jiný substrát. Mezi nejvýznamnější zástupce lidských peroxidas patří glutathionperoxidasy nebo myeloperoxidasa. V rostlinné říši se nejčastěji setkáme s askorbátperoxidasou, která využívá kyselinu askorbovou (Skálová et al. 2017, Racek 2003).

2.2.4.4 Glutathionperoxidasa (GPx)

Glutathionperoxidasa je tetramerní glykoprotein, který ve svém aktivním centru obsahuje selenocystein (Skálová et al. 2017). Tento enzym katalyzuje redukci peroxidu vodíku a současně oxidaci glutathionu (GSH). Aby tento proces plynule probíhal, musí být zajištěna regenerace glutathionu v redukované formě. K redukci oxidovaného glutathionu (GSSG) slouží glutathionreduktasa, která využívá pyridinový koenzym NADPH. U člověka se vyskytuje osm isoform GPx, které se liší strukturou, lokalizací, funkcí a závislostí na selenu. Mezi nejvýznamnější zástupce patří tři základní isoformy GPx, které se nacházejí v různých oddílech buňky. Cytoplasmatickou cGPx (GPx1), extracelulární eGPx (GPx2 a GPx3) a fosfolipidovou pGPx (GPx4). První dvě isoformy obsahují selenocystein a jejich aktivita klesá při výrazném nedostatku selenu. Fosfolipidová isoforma je vázána v buněčné membráně, kromě H_2O_2 redukuje také lipidové hydroperoxy a tím ochraňuje fosfolipidy buněčných membrán (Racek 2003).

2.2.4.5 *Glutathionreduktasa (GR)*

Glutathionreduktasa katalyzuje přenos elektronů mezi nízkomolekulárními nebo vysokomolekulárními disulfidovými substráty a redukovanými pyridinovými nukleotidy. Jak již bylo zmíněno, jedním z nejdůležitějších cílů reakce katalyzované GR je udržovat poměr redukovaného glutathionu a oxidovaného glutathionu. Enzym se také používá v klinické praxi pro diagnostiku onemocnění jater, hodnocení nedostatku riboflavinu nebo pro diagnostiku genetických poruch (Bakirezer et al. 2019).

2.2.4.6 *Glutathion-S-transferasa (GST)*

Glutathion-S-transferasy patří mezi jedny z nejdůležitějších detoxikačních enzymů, jejichž funkce spočívá v detoxikaci elektrofilů pomocí konjugace s glutathionem. Enzym je spjat i s dalšími aktivitami jako například biosyntézou steroidů a leukotrienů. Rozlišujeme tři základní nadrodiny GST: cytosolickou, mitochondriální a mikrosomální. Cytosolické GST se podle podobnosti aminokyselinové sekvence dále rozděluje na rodiny alfa, mí, pí, omega, théta a zéta, přičemž nejrozšířenější jsou isoformy prvních tří rodin. Všechny cytosolické GST jsou homodimery nebo heterodimery, liší se orgánovou distribucí. V játrech najdeme především rodinu A (alfa), proliferující (nádorové) buňky jsou ale charakteristické zvýšenou expresí GSTP (isoforma pí 1). Mitochondriální GST je označována jako třída kappa a mikrosomální GST jsou membránové proteiny, které se skládají ze čtyř podskupin (I – IV) (Oakley 2011, Skálová et al. 2017, Strange et al. 2001).

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, jak vybrané monocyklické monoterpeny ovlivňují v lidských játrech aktivitu a expresi antioxidantních enzymů. Pro dosažení vybraného cíle bylo potřebné:

- Připravit subcelulární frakce z lidských jater a inkubovat je s pěti studovanými monocyklickými monoterpeny
- Stanovit enzymovou aktivitu GST, GPx, GR a CAT v cytosolové frakci a porovnat vliv jednotlivých monoterpenů na tyto enzymy
- Připravit ultratenké řezy z lidských jater a inkubovat je s vybraným monoterpenem (piperiton)
- Stanovit expresi mRNA vybraných isoform antioxidantních enzymů (GSTA1, GSTP1, GPx1, GPx2, GPx4, GR, CAT, SOD) a aktivitu GST v lidských jaterních řezech

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Biologický materiál*

Jako biologický materiál jsou v této práci použita lidská játra, která byla získána ve spolupráci s Chirurgickou klinikou Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Játra pocházela od deseti dárců obou pohlaví ve věku 50 až 80 let. Pacienti podstoupili částečnou resekci jater v rámci léčby nádorových onemocnění. Odběr tkáně pro výzkumné účely byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (povolení č. 201703 S14P) a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Podrobné informace o pacientech jsou uvedeny níže (Tab. 1).

4.2 *Chemikálie*

- (-) -Isopulegol
- (-) -Karvon
- (+) -Isomenthon
- (+) -Karvon
- BCA – Bicinchoninová kyselina
- BSA – Hovězí sérový albumin
- CaCl_2 – Chlorid vápenatý
- $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – Síran měďnatý hexahydrát
- DEPC – Diethylpyrokarbonát
- DMSO – Dimethylsulfoxid
- DTT – Dithiotreitol
- EDTA – Ethylendiamintetraoctová kyselina
- EtOH – Ethanol
- Gentamycin
- Glukóza monohydrát
- Glutathion (GSH)

- Glutathion disulfid (GSSG)
- GR – Glutathionreduktasa
- HCl – Kyselina chlorovodíková
- HEPES – (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
- Hexamery
- H₂O₂ – Peroxid vodíku
- Chloroform
- Isopropanol
- KCl – Chlorid draselný
- KH₂PO₄ – Dihydrogenfosforečnan draselný
- K₂HPO₄ – Hydrogenfosforečnan draselný
- MgSO₄*7H₂O – Síran hořečnatý heptahydrát
- NaCl – Chlorid sodný
- Na₂CO₃ – Uhličitan sodný
- NADPH – Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
- NaHCO₃ – Hydrogenuhličitan sodný
- NaH₂PO₄ x 2 H₂O – Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát
- Na₂HPO₄ x 12 H₂O – Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát
- NaOH – Hydroxid sodný
- (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ x 4 H₂O – Molybdenan amonný tetrahydrát
- Piperiton
- Reverzní transkriptasa
- *t*-BHP – *t*-butylhydroperoxid
- Trizol
- Williamsovo medium E (s *L*-glutaminem)

4.3 *Přístroje*

- Analytické váhy CP225D – Sartorius
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos – Thermo Fisher Scientific
- Hlubokomrazící box – Arctiko
- Laboratorní váhy M-Prove – Sartorius
- Laminární box BioAir AURA 2000 M.A.C.
- Magnetická míchačka – Heidolph
- Nanodrop 2000 – Thermo Fisher Scientific
- PCR cyklér MJ Mini Thermal cycler – BioRad
- PCR QuantStudio 6 Flex – Applied Biosystems
- pH metr inoLab – WTW
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200
- Thermomixer Comfort – Eppendorf
- Tkáňový kráječ Krumdieck Tissue Slicer MD4000
- Tyčinkový homogenizátor
- Ultracentrifuga – Sorvall
- Ultrazvukový homogenizátor – Sonopuls HD 2070
- Vortex-V-1 plus – Biosan

Tab. 1 Doplnující informace o pacientech

pacient č.	pohlaví	věk (roky)	Diagnóza	komorbidity	medikace	chemoterapie
37	♂	50	metastáze neuroendokrinního tumoru	DM2	insulin	∅
38	♂	59	cholangiokarcinom	∅	∅	∅
39	♀	71	metastáze kolorektálního karcinomu	fibrilace síní, hypertenze, mitrální insuficience, trikuspidální insuficience	felodipin+ramipril, bisoprolol, apixaban, cholekalciferol, flavonoidy, levothyroxin	FOLFOX
42	♂	70	metastáze kolorektálního karcinomu	glomerulonefritida, Wegenerova granulomatoza, ICHS, kardiomyopatie, fibrilace síní, hyperthyreóza, tromboembolická nemoc, karcinom prostaty, monoklonální gamapatie, DM2	bisoprolol, gabapentin, methylprednisolon, cholekalciferol, azathioprin, omeprazol, amiodaron, furosemid, fraxiparin, perindopril, amilorid, spironolakton, repaglinid, insulin, ipratropium/fenoterol	∅
43	♂	57	cholangiokarcinom	kardiální selhání, mitrální insuficience, myeloproliferativní onemocnění, vrozený trombofilní stav, hyperlipoproteinemie	a _{na} grelid, losartan, amlodipin, betaxolol, rosuvastatin, hydrochlorothiazid, paroxetin, ASA	∅
44	♂	66	metastáze kolorektálního karcinomu	fibrilace síní, hypertenze, ICHS, mitrální insuficience, mikrocytární anemie, DM2	felodipin, rilmenidin, perindopril, alopurinol, omeprazol, glyklazid, levocetirizin, budesonid	bevacizumab/FOLFOX
46	♂	53	metastáze kolorektálního karcinomu	hypertenze	indapamid+perindopril	FUFA, pak FOLFIRI/panitumumab
48	♀	72	metastáze endokrinního tumoru	DM2, hypertenze	metformin, glimepirid, ramipril	∅
51	♀	69	metastáze kolorektálního karcinomu	hypertenze	amlodipin, bisoprolol, perindopril	FOLFOX /bevacizumab
52	♂	80	hepatocelulární karcinom	ICHS, chronické srdeční selhání, insuf. mitrální a trikuspidální chlopně, flutter síní, hypertenze, DM2, anémie, hyperlipidémie, chronická žilní insuficience, hyperplazie prostaty	metformin, furosemid, isosorbid-dinitrát, omeprazol, ASA, apixaban, simvastatin, trandolapril, flavonoidy, spironolakton, pyridoxin, bisoprolol	∅

DM2 – diabetes mellitus 2. typu; ICHS – ischemická choroba srdeční; FUFA – kombinace 5-fluorouracilu a leukovorinu; FOLFOX – kombinace 5-fluorouracilu, leukovorinu a oxaliplatinu; FOLFIRI – kombinace 5-fluorouracilu, leukovorinu a irinotekanu

4.4 Příprava subcelulárních frakcí z lidských jater

4.4.1 Příprava roztoků

A) Příprava 0,1 M Na-fosfátového pufru, pH 7,4

Navážila jsem si 35,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ a doplnila do 1000 ml redestilovanou vodou. Poté jsem odvážíla 3,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ doplnila do 250 ml redestilovanou vodou. Roztoky jsem slévala dohromady, za stálého míchaní a měření pH jsem upravila roztok na hodnotu 7,4 a uchovávala v zásobní lahvi v lednici.

B) Příprava 0,1 M Na-fosfátového pufru, pH 7,4 s 20 % glycerolu

Do kádinky jsem si připravila 20 ml glycerolu a smíchala s 80 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4).

4.4.2 Pracovní postup

Játra jsem si rozvážila po maximálně 5 g do mističek a rozstříhala na menší kousky. Z jedné mističky jsem je přendala do 30 ml homogenizátoru. Poté jsem přilila 15 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru, (pH 7,4) a zhomogenizovala pohybem nahoru a dolů. Obsah homogenizátoru jsem odlila do centrifugační kyvety. Opláchla jsem píst a homogenizátor 15 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru, (pH 7,4) a přilila do centrifugační kyvety. Následně jsem kyvety dala do centrifugy Haraeus a stočila při 5 000 g, 20 minut, 4 °C. Přelila jsem supernatant z prvního točení do čistých kyvet a stočila ve stejném rotoru při 20 000 g, 60 minut, 4 °C. Supernatant z druhého točení jsem slévala do 12,5 ml centrifugačních kyvet pro Sorvall. Dávala jsem si pozor, abych neslévala kaly a plnila kyvety jen ze tří čtvrtin. Kyvety jsem uzavřela víčkem a vložila do rotoru, aby byl vyvážen. Rotor jsem přišroubovala k centrifuze a zavřela víko. Kyvety jsem stočila při 105 000 g, 67 minut, 4 °C. Když skončilo třetí točení, vyndala jsem rotor z centrifugy. Otevřela jsem ho a vyndala kyvety, ze kterých jsem odebrala supernatant (cytosolová frakce). Za stálého míchaní jsem ho rozpipetovala po 1,1 ml do plastových mikrozkušavek.

Peletu ze třetího točení jsem resuspendovala v 5 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru, (pH 7,4) a zhomogenizovala malým pístem. Kyvety jsem stočila v ultracentrifuze Sorvall stejně jako v předchozím případě. Když proces došel, supernatant jsem odlila a přilila tolik ml pufru s 20 % glycerolu, kolik bylo naváženo gramů jater. Všechno jsem

zhomogenizovala malým pístem. Směs jsem slila do kádinky a zhomogenizovala v ultrazvukové lázni. Posledním krokem bylo za stálého míchání na magnetické míchače rozpipetování po 0,33 ml do plastových mikrozkušavek a zmražení.

4.5 Příprava inkubačních směsí

V experimentu jsem využívala 5 vybraných monocyklických monoterpenů.

- (+)-Karvon
- (-)-Karvon
- (+)-Isomenthon
- (-)-Isopulegol
- (-)-Piperiton

Nejprve jsem si vypočítala pomocí koncentrace, objemu a molární hmotnosti, jaké množství budu jednotlivých látek navažovat. Následně jsem podle přesné navážky dopočítala, kolik budu potřebovat ethanolu. Vzniklé zásobní roztoky monoterpenů (10 mM) jsem promíchala a uchovávala v -20 °C.

$$c = \frac{m}{M \times V}$$

c = koncentrace (M), V= objem (l), m= hmotnost (g), M= molární hmotnost (g/mol).

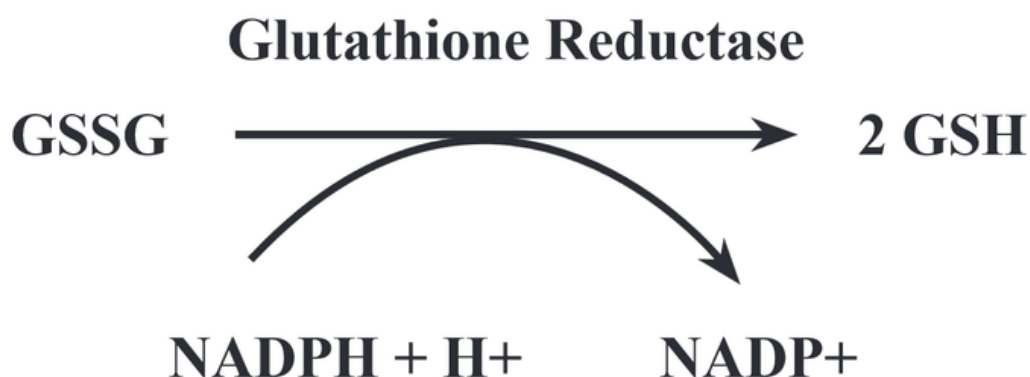
Z hlubokomrazícího boxu jsem si vyndala, rozmrazila a promíchala zásobní cytosol. Do 1,5 ml mikrozkušavek jsem si cytosol naředila 10x (160 µl cytosolu a 1440 µl 0,1 M Na⁺-fosfátového pufru, pH 7,4).

Do mikrozkušavek jsem si připravila čtyři typy inkubačních směsí: 1) neinhibovaný vzorek (247,5 µl cytosolu a 2,5 µl EtOH), 2) blank k neinhibované reakci (247,5 µl pufru a 2,5 µl EtOH), 3) inhibovaný vzorek (247,5 µl cytosolu a 2,5 µl příslušného inhibitoru 10 mM), 4) k němu příslušný blank (247,5 µl pufru a 2,5 µl inhibitoru 10 mM). Při měření je koncentrace monoterpenů v jamce 100 µM. Mikrozkušavky jsem promíchala na třepače a nechala inkubovat v Thermomixeru při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

4.6 Stanovení aktivity studovaných enzymů

4.6.1 Stanovení aktivity glutathionreduktasy

Metoda je založena na přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za současné oxidace NADPH (Obr. 17). Spotřeba NADPH je zaznamenávána pomocí sledování úbytku absorbance při 340 nm po dobu 6 min. (Bonilla et al. 2008, Carlberg a Mannervick 1985).



Obr. 17 Princip přeměny oxidovaného glutathionu na redukovaný glutathion za současné oxidace NADPH

4.6.1.1 Příprava zásobních roztoků

A) Příprava 0,1 M K-fosfátového pufru, pH 7,0

Nejprve jsem si navážila do první kádinky 8,710 g K_2HPO_4 , do druhé kádinky 6,805 g KH_2PO_4 , rozpustila v malém množství redestilované vody, převedla kvantitativně do odměrných baněk a doplnila redestilovanou vodou do 500 ml. Roztoky jsem promíchala a na magnetické míchačce za stálého míchání slévala dohromady (poměr cca 5:2). Současně jsem měřila pH pomocí pH metru až do požadované hodnoty 7,00. Výsledný roztok jsem převedla do zásobní lahve a uchovávala ho v lednici, kde byl připraven k použití.

B) Příprava 0,1 M Na-fosfátového pufru, pH 7,4

Navážila jsem si 35,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, rozpustila v kádince v cca 500 ml redestilované vody, přelila do odměrné baňky a doplnila do 1000 ml redestilovanou vodou. Poté jsem odvážíla 3,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, rozpustila v kádince v cca 200 ml redestilované vody, přelila do odměrné baňky a doplnila do 250 ml redestilovanou

vodou. Roztoky jsem slévala dohromady. Za stálého míchaní a měření pH jsem upravila roztok na hodnotu 7,4 a uchovávala v zásobní lahvi v lednici.

C) Příprava zásobního roztoku EDTA (5 mM)

Navážila jsem si 0,186 g EDTA a rozpustila ve 100 ml redestilované vody, aby mi roztok vystačil na všechna měření. Připravený roztok jsem rozmíchala a uchovávala v zásobní lahvi.

4.6.1.2 Měření aktivity

Mezitím, co se inkubovaly vzorky, jsem si připravila další potřebné roztoky. Navážila jsem si do mikrozkušavky 2,912 mg NADPH (2,5 mM) a rozpustila v 1,4 ml redestilované vody. Promíchala na třepačce.

Poté jsem si do kádinky odvážíla 17,30 mg GSSG (4 mM) a rozpustila v 7 ml redestilované vody. Roztok jsem promíchala pomocí magnetické míchačky, dokud nebyl čirý.

Dalším krokem bylo inkubované vzorky po 30 minutách vyjmout z Thermomixeru a rozpipetovat do 96ti jamkové destičky. Do všech jamek jsem pipetovala 50 μ l vzorku nebo blanku. Konkrétně v jamkách 1A-1D byl napipetován neinhibovaný vzorek (kontrola). V jamkách 1E-1H k němu příslušný slepý vzorek. V řádcích A-D a sloupcích 2-6 byly inhibované vzorky. K nim patříčné blanky v řádcích E-H a sloupcích 2-6. Takto jsem mohla proměřit jednoho pacienta. Ve zbylé části destičky jsem proměřila druhého pacienta. Použila jsem sloupce 7-12 a pipetovala jsem stejně jako u prvního pacienta.

Pro další krok jsem si nejprve smíchala roztok mastermixu podle níže uvedeného postupu.

Příprava mastermixu na 1 destičku:

- pufr (pH 7,0) 6 ml
- EDTA 4,8 ml
- GSSG 6 ml
- NADPH 1,2 ml

Takto připravený mastermix jsem promíchala na magnetické míchačce. Těsně před měřením jsem do všech jamek pomocí multikanálové pipety přidala 150 μ l mastermixu.

Destičku jsem vložila do přístroje Tecan, který byl vytemperován na 37 °C (Tecan Infinity M 200). Vybrala jsem metodu a sledovala jsem pokles absorbance po dobu 6 minut při 340 nm. Každého pacienta jsem proměřila 3x.

Aktivitu (nmol/min/ml) jsem spočítala podle následujícího vzorce:

$$A = \frac{(\Delta Avz. - \Delta Asl) * Vi}{\epsilon * l * Vs} * 1000$$

Avz je absorbance vzorku, Asl je absorbance slepého vzorku, ϵ_{NADPH} je $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l (výška měřené vrstvy) je 0,75 cm, Vi (objem reakční směsi) je 0,2 ml, Vs (objem biologické frakce) je 0,05 ml.

Aktivitu je nutno vydělit hodnotou koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích (mg/ml), čímž získáme hodnoty specifické aktivity GR.

4.6.2 Stanovení aktivity glutathionperoxidasy

V průběhu reakce katalyzované GPx je GSH přeměňován na GSSG. Vzniklý oxidovaný glutathion je průběžně redukován glutathionreduktasou, která zajišťuje konstantní hladinu GSH. Reakci doprovází oxidace NADPH, což je monitorováno fotometricky poklesem absorbance při 340 nm (Flohé a Günzler 1984, Handy et al. 2009).

4.6.2.1 Příprava zásobních roztoků

A) 0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7,0

Použila jsem stejný K-fosfátový pufr jako při stanovení aktivity GR.

B) 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,4

Použila jsem stejný Na-fosfátový pufr jako při stanovení aktivity GR.

C) Příprava zásobního roztoku EDTA (20 mM)

Navážku 0,186 g jsem rozpustila v 25 ml 0,1 M K-fosfátovém pufru, pH 7,0. Vzniklý roztok jsem promíchala a uchovávala v zásobní lahvi.

4.6.2.2 Měření aktivity

Cytosol jsem naředila 0,1 M Na-fosfátovým pufrům (pH 7,4) a nechala inkubovat stejně jako u měření GR.

Připravila jsem si roztok glutathionreduktasy. Do 1,467 ml 0,1 M K-fosfátového pufru (pH 7,0) v mikrozkuhavce jsem přidala 33 μ l GR. Rozmíchala jsem roztok na třepačce. Dále jsem si do kádinky odvážíla 8,6 mg glutathionu (GSH) a rozpustila v 2,8 ml 0,1 M K-fosfátového pufru, pH 7,0.

Po inkubaci vzorků jsem je rozpipetovala do 96ti jamkové destičky stejně jako u měření předchozího enzymu. Do kádinky jsem si smíchala mastermix podle následujícího postupu.

Příprava mastermixu na 1 destičku:

- pufr (pH 7,0) 10,8 ml
- EDTA 1,2 ml
- GR 1,2 ml
- GSH 2,4 ml

Takto připravený a rozmíchaný mastermix jsem přidala po 130 μ l do všech jamek. Destičku jsem inkubovala 10 minut při 37 °C v Thermomixeru. Mezitím jsem si navážila 3,792 mg NADPH, které jsem rozpustila v 1,2 ml redestilované vody a rozmíchala. Roztok *t*-butylhydroperoxidu jsem připravila přidáním 51,45 μ l *t*-butylhydroperoxidu do 15 ml 0,1 M K-fosfátového pufru, pH 7,0.

Po 10 minutách v Thermomixeru jsem do všech jamek na destičce napipetovala 10 μ l NADPH multikanálovou pipetou. Destičku jsem vložila do Tecanu, který jsem vytemperovala na 37 °C a zapnula metodu. Po dobu 5 minut jsem sledovala spotřebu NADPH nezávislou na *t*-butylhydroperoxidu. Po skončení měření jsem pokračovala přidáním 10 μ l *t*-butylhydroperoxidu do všech jamek. V obou případech jsem pipetovala po řádcích, abych dodržela časovou posloupnost. Znovu jsem vložila destičku do přístroje a zapnula stejnou metodu. Sledovala jsem pokles absorbance po dobu 5 minut při 340 nm. Všechny pacienty jsem stejně jako v předchozí metodě měřila 3x.

Výpočet aktivity (nmol/min/ml):

$$U/ml = \frac{(\Delta Avz. - \Delta Asl) * 2 * Vi}{\epsilon * l * Vs}$$

Avz je absorbance vzorku, Asl je absorbance slepého vzorku, ϵ_{NADPH} je 6,22 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$, l (výška měřené vrstvy) je 0,75 cm, Vi (objem reakční směsi) je 0,2 ml, Vs (objem

biologické frakce) je 0,05 ml. Násobek 2 vyplývá ze stechiometrie reakce (2 μmol GSH produkovaný 1 μmolem NADPH). Jednotky U/ml jsem přepočítala na U/mg proteinu.

4.6.3 Stanovení aktivity katalasy

Molybdenan amonný tvoří s H_2O_2 žlutý komplex, jehož absorbance se měří při 405 nm (Góth 1991).

4.6.3.1 Příprava zásobních roztoků

60 mM sodno-draselný fosfátový pufr, pH 7,4

Navážku 10,74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ jsem rozpustila v kádince v cca 400 ml redestilované vody, přelila do 500 ml odměrné baňky a doplnila redestilovanou vodou. Do další 500 ml odměrné baňky jsem převedla roztok KH_2PO_4 , který jsem získala rozpuštěním 4,08 g KH_2PO_4 ve 400 ml redestilované vody. Připravené roztoky jsem promíchala a slévala dohromady za stálého míchání a měření pH. Vzniklý pufr měl pH 7,4. Uchovávala jsem ho v zásobní lahvi v lednici.

4.6.3.2 Měření aktivity

Připravila jsem si roztok H_2O_2 (65 mM). Odměřila jsem si 20 ml sodno-draselného fosfátového pufru (60 mM, pH 7,4) a k němu přidala 152,4 μl H_2O_2 . Pokračovala jsem přípravou roztoku molybdenanu amonného (32,4 mM). Navážila jsem si 0,8 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ a rozpustila v 20 ml redestilované vody. Oba roztoky jsem promíchala.

Inkubační směsi jsem si připravila stejně jako u předchozích enzymů. Do mikrotitrační destičky jsem pipetovala podle následující tabulky.

Tab. 2 Schéma pro měření katalasy

	blank 1	vzorek	blank 2	blank 3
1.	100 μ l H ₂ O ₂	100 μ l H ₂ O ₂	100 μ l H ₂ O ₂	100 μ l pufru
2.	100 μ l molybd.	20 μ l frakce	20 μ l pufru	20 μ l pufru
3.	inkubace 1 min při 37 °C, třepání			
4.	-----	100 μ l molybd.	100 μ l molybd.	100 μ l molybd.
5.	1 min nechat stát			
6.	20 μ l frakce	-----	-----	-----
7.	změřit absorbanci při 405 nm			

Rozvržení mikrotitrační destičky pro měření katalasy (Tab. 3) bylo následující. V prvním sloupci v řádcích A-D byl neinhibovaný vzorek. Ve stejném sloupci v řádcích E-G k němu příslušný slepý vzorek. Ve sloupcích 2-6, řádcích A-D byly inhibované vzorky. K nim příslušné blanky byly napipetovány v řádcích E-G. Blank 2 byl ve sloupcích 1-6 v řádku H. V tomtéž řádku byl ve sloupcích 7-12 napipetován blank 3. Zbytek volného místa na destičce jsem využila pro měření dalšího pacienta.

Tab. 3 Rozvržení mikrotitrační destičky pro měření katalasy

	pacient číslo 37					pacient číslo 38						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	neinhibovaný vzorek	inhibované vzorky					neinhibovaný vzorek	inhibované vzorky				
B												
C												
D												
E	blank	blanky					blank	blanky				
F	k neinhibovanému vzorku	k inhibovaným vzorkům					k neinhibovanému vzorku	k inhibovaným vzorkům				
G												
H	blank 2					blank 3						

Vše kromě frakcí jsem pipetovala multikanálovou pipetou. V průběhu reakce katalyzované katalasou se tvořily bubliny unikajícího O₂, které by rušily měření. Snažila jsem se je před měřením propíchat drátkem.

Aktivitu katalasy ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$) jsem počítala podle následujícího vzorce:

$$U/\text{ml} = (\text{Abl1} - \text{Avz}) / (\text{Abl2} - \text{Abl3}) \times 390 \times \text{zř.}$$

Avz = absorbance vzorku

Abl1 = absorbance blanku 1

Abl2 = absorbance blanku 2

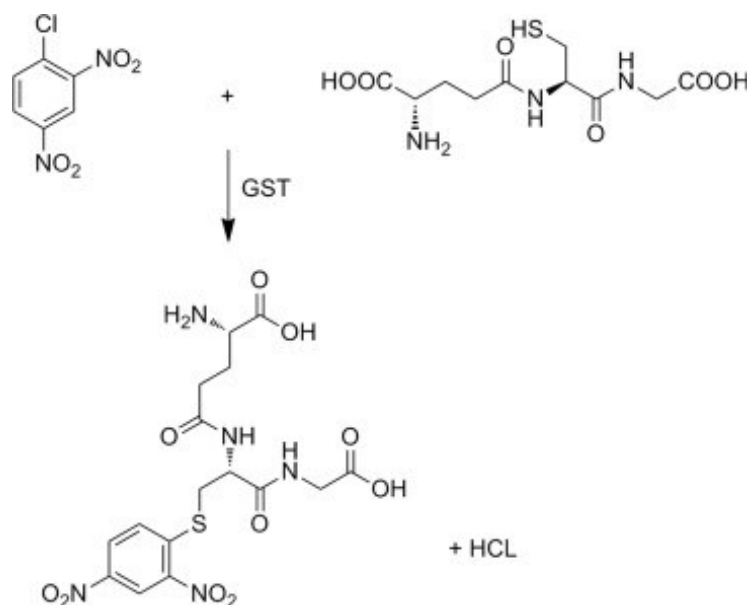
Abl3 = absorbance blanku 3

Zředění = 10

Dále bylo nutno aktivitu přepočítat na $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ na základě koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

4.6.4 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy

Měření aktivity GST je založeno na tvorbě GS-DNB konjugátu (Obr. 18), který má absorpční maximum při 340 nm (Ye a Zhang 2001).



Obr. 18 Princip tvorby GS-DNB konjugátu (Ojopagogo et al. 2015)

4.6.4.1 Příprava zásobních roztoků

0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 6,5

Navážku 1,79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ jsem rozpustila v malém množství redestilované vody v kádince, přenesla do 50 ml odměrné baňky a doplnila redestilovanou vodou. Navážila jsem 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, rozpustila v malém množství redestilované vody

v kádince, přenesla do 100 ml odměrné baňky a doplnila také redestilovanou vodou. Roztoky jsem promíchala. Slévala jsem je dohromady v přibližném poměru 1:3. A to za stálého míchání pomocí magnetické míchačky a měření pH pomocí pH metru. Když jsem dosáhla požadované hodnoty pH 6,5, roztok jsem přelila do zásobní lahve a byl připraven k použití.

4.6.4.2 Měření aktivity

Pro vlastní měření jsem si nejprve připravila roztok GSH (5,15 mM). Navážila jsem si přibližně 7,92 mg GSH. Poté jsem přepočítala, kolik přesně ml 0,1 M Na-fosfátového pufru, pH 6,5 budu potřebovat na rozpuštění této navážky (přibližně 5 ml pufru) a rozpustila ji.

Stejně tak jsem postupovala i u přípravy roztoku CDNB (51,5 mM) v ethanolu. Navážila jsem 5,22 mg CDNB a rozpustila v 0,5 ml ethanolu. Oba roztoky jsem promíchala. Takto připravené mi vystačily na měření jedné destičky.

Stejně jako u měření předchozích enzymů jsem si připravila inkubační směs. Přichystala jsem si destičku. Do prvních 6 jamek v sloupci 1 jsem pipetovala neinhibovaný vzorek a do 6 jamek ve sloupcích 2-6 inhibované vzorky. Jamky 7 a 8 byly pro slepé vzorky. V prvním sloupci pro blank k neinhibované reakci a ve sloupcích 2-6 blanky k inhibovaným vzorkům. Stejně jsem postupovala v druhé části destičky (sloupce 7-12), kde jsem změřila druhého pacienta. Pipetované množství cytosolu i pufru bylo 6 μ l.

Těsně před měřením jsem si smíchala roztok mastermixu podle níže uvedeného rozpisu.

Příprava mastermixu množství na 1 destičku:

- roztok GSH 4 ml
- roztok CDNB 0,4 ml
- 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 6,5 15,6 ml

Roztok jsem promíchala na magnetické míchačce a do všech jamek jsem po řádcích pipetovala 194 μ l mastermixu multikanálovou pipetou. Lehce jsem s destičkou poklepala, aby se roztoky promísily. K měření absorbance jsem opět použila přístroj Tecan. Vybrala

jsem vhodnou metodu a vložila destičku dovnitř. Přístroj měří absorbanci 6x v minutových intervalech při 340 nm.

Specifickou aktivitu (mmol/min/mg) jsem vypočítala podle následujícího vzorce:

$$A_{\text{specif.}} = \frac{(\Delta A_{\text{vz.}} - \Delta A_{\text{sl.}}) \times V_{\text{celk.}} \times z\check{r}.}{\epsilon \times l \times V_{\text{vz.}}} \div \text{mprot.}$$

Vcelk. (celkový objem v jamce) = 0,2 ml

Vvz. (objem cytosolu v jamce) = 0,006 ml

Zř. (zředění) = 10

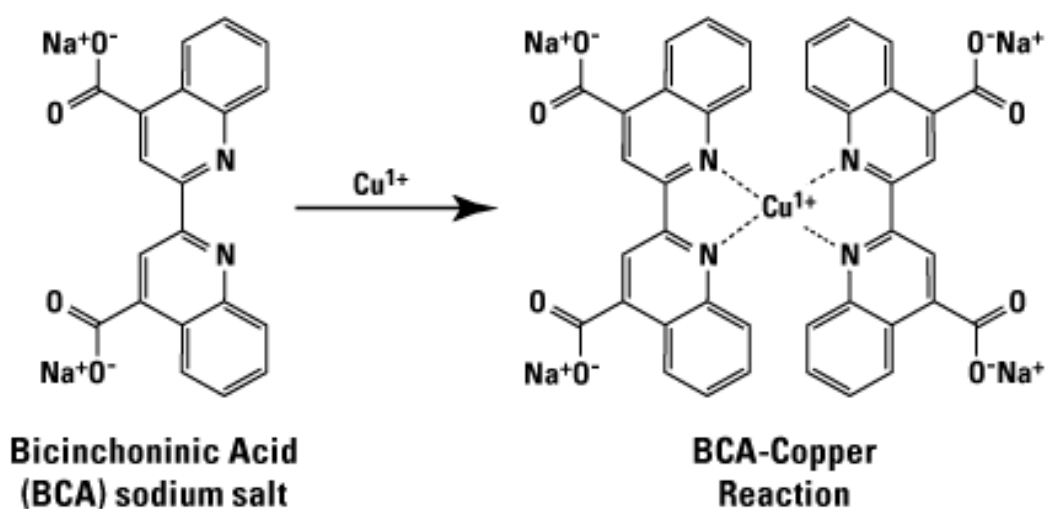
ϵ (molární extinkční koeficient) = $9,6 \text{ mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

l (výška měřené vrstvy) = 0,75 cm

mprot (koncentrace bílkoviny) = pro specifickou aktivitu nutno vydělit koncentrací příslušného proteinu (mg/ml)

4.6.5 BCA stanovení bílkoviny

Proteiny reagují s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^{1+} , která vytváří v prostředí kolem pH 10 stabilní modrofialový komplex s BCA (bicinchoninic acid, kyselina bicinchoninová) (Obr. 19). Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství bílkoviny, absorbance komplexu se měří při 562 nm (Smith et al. 1985).



Obr. 19 Princip stanovení bílkoviny s BCA

Roztoky:

- Roztok A: NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH (čirý)
- Roztok B: 4 % CuSO₄ * 6 H₂O (modrý)
- Roztok C: vznikne smícháním roztoku A a B v poměru 50:1 (zelený)

Kalibrační přímka:

Pro přípravu roztoků jsem si nejprve redestilovanou vodou naředila výchozí 0,2 % roztok BSA (hovězí sérový albumin) 2x (1 díl vody a 1 díl BSA). Vznikl 0,1 % roztok BSA. Vzorky cytosolu jsem naředila 10x (10 μl vzorku a 90 μl vody).

Připravila jsem si 6 mikrozkušavek a pipetovala podle následující tabulky 4:

Tab. 4 Roztoky pro přípravu kalibrační přímky

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

Poté jsem pipetovala do mikrotitrační destičky vždy 10 μl bílkoviny z mikrozkušavek 1-6 (celá levá část destičky, sloupce 1-6 a řádky A-H). Do zbylé pravé části destičky jsem pipetovala 10 μl naředěného cytosolu.

Do všech jamek jsem pipetovala 200 μl roztoku C multikanálovou pipetou. S destičkou jsem lehce poklepala o stůl, aby se roztoky promíchaly a nechala jsem ji inkubovat v Thermomixeru při 37 °C po dobu 30 minut (400 rpm).

Poté jsem měřila absorbanci při 562 nm v přístroji Tecan. Od hodnot vzorků jsem odečetla hodnoty slepého vzorku. Pomocí programu Microsoft Excel jsem sestrojila kalibrační přímku. Vypočítala jsem koncentraci proteinů a použila ji pro výpočet specifické aktivity enzymů.

4.7 Příprava lidských jaterních řezů

K přípravě lidských jaterních řezů a následné inkubaci jsem potřebovala Krebs-Henseleitův pufr a inkubační medium, které jsem si zhotovila den před krájením. Připravila jsem si také kráječ. Všechny části kráječe, které přijdou do kontaktu s pufrem, jsem omyla 70 % lihem. Kráječ jsem překryla alobalem a společně s pufrem a inkubačním médiem jsem je umístila do chladicí místnosti.

Nejprve jsem si zhotovila 0,5 l zásobního roztoku Krebs-Henseleitova pufru podle následujícího rozpisu:

- KCl 1,87 g
- NaCl 34,5 g
- MgSO₄*7H₂O 1,36 g
- KH₂PO₄ 0,82 g
- CaCl₂ 1,39 g

Chlorid vápenatý jsem přidávala jako poslední, až když se všechny předchozí složky rozpustily, jinak by mohlo dojít k vysrážení uhličitanů.

Finální roztok (1000 ml na jedna játra) jsem připravila podle následujícího předpisu:

- NaHCO₃ 2,1 g
- Glukóza monohydrát 4,95 g (4,5 g anhydridu)
- HEPES 2,38 g
- zásobní roztok 100 ml
- doplnit do 1000 ml

V den krájení jsem pufr nechala 1 hodinu probublávat pneumoxidem (95 % O₂/5 % CO₂) a nakonec jsem upravila hodnotu pH pufru na 7,4 pomocí roztoku HCl.

Dále jsem si připravila kultivační medium. Použila jsem Williamsovo medium E (s L-glutaminem) od firmy Thermofisher. Obohatila jsem ho o 25 mmol glukózy

[(11 mmol glukózy již obsahuje, celkem tedy bude 36 mmol glukózy) = zhruba 2,26 gramů anhydridu glukózy] a gentamycin [(finální koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$) = 0,5 ml zásobního roztoku].

Pomalu jsem kráječ naplnila okysličeným Krebs-Henseleitovým pufrem. Poté jsem se ujistila, že kráječ nikde nepodtéká. Přibližně 20 minut před použitím jsem ho chladila vodou o teplotě 4 °C.

Z jater jsem se pomocí vykrajovací trubičky o průměru 8 mm snažila získat pravidelné válečky. Vložila jsem je do nástavce v kráječi, který zhotovil řezy o tloušťce 150 μm . Vykrojené válečky i řezy jsem neustále držela na ledu a v pufru.

Inkubace jaterních řezů byla provedena ve 12-jamkové destičce, kdy pro preinkubaci byly jamky naplněny 1 ml média, pro inkubaci 1,3 ml média (s DMSO nebo testovanou látkou v koncentraci 10 a 50 μM). Každý řez byl umístěn do jedné jamky. Destičky s řezy byly v inkubátoru umístěny na třepačce (90 rpm). Kvůli častému větrání v inkubátoru během vkládání destiček je hladina plynů nastavena na 70 % O_2 /5 % CO_2 a po naplnění zvednuta na 85 % O_2 /5 % CO_2 . Preinkubace trvala 60 minut. Poté jsem řezy pomocí entomologické pinzety přemístila do nových destiček s novým médiem. Inkubace trvala 24 hodin pro každou destičku.

4.8 Stanovení exprese mRNA

4.8.1 Izolace RNA Trizolem

Trizol, specifická směs fenolu a guanidiniisothiokyanátu, umožňuje selektivní izolaci celkové RNA (tRNA, mRNA, rRNA, microRNA) z malého množství tkání či buněk. Při izolaci RNA zůstává zachována její integrita během homogenizace tkáně. Přídavek chloroformu a následné stočení rozdělí směs na vodnou a organickou fázi, přičemž RNA bude výhradně v horní vodné fázi. Následné selektivní vysrážení RNA pomocí isopropanolu umožní izolaci čisté RNA.

Izolaci jsem prováděla v laminárním boxu v rukavicích, protože Trizol je díky přítomnosti fenolu vysoce toxická látka.

Nejprve jsem řez po inkubaci vpravila do 0,5 ml Trizolu a uložila do hlubokomrazícího boxu na -80 °C. Po vyndání a rozmrazení jsem řezy zhomogenizovala

pomocí kuličkového homogenizátoru. Vzorky vyjmuté z homogenizátoru jsem nechala 5 minut stát při laboratorní teplotě. V laminárním boxu jsem přidala 100 μ l chloroformu a 15 sekund třepala v ruce. Následně jsem vzorky nechala stát 2-3 minuty při laboratorní teplotě.

Aby se směsi po přidání chloroformu rozdělily na horní vodnou a spodní organickou fázi, musela jsem je ještě stočit ve vychlazené centrifuze (15 minut, 12 000 g, 4 °C). Snažila jsem se přepipetovat horní vodnou fázi do nové 1,5 ml plastové mikrozkušavky. Tento krok byl velmi důležitý, jelikož jsem se nesměla špičkou pipety dotknout mezifáze nebo dolní organické fáze. Mohlo by totiž dojít ke kontaminaci genomovou DNA nebo proteiny. Pokud se tak stalo, musela jsem vzorky znovu stočit 15 minut v centrifuze.

K přepipetované vodné fázi jsem přidala 200 μ l isopropanolu a promíchala. Vzorky jsem nechala 15-20 minut stát při laboratorní teplotě. Mezitím jsem si naředila 75 % ethanol (7,5 ml absolutního ethanolu a 2,5 ml DEPC vody). Vzorky jsem stočila v centrifuze (10 minut, 12 000 g, 4 °C). Odstranila jsem supernatant a vzniklou peletu jsem omyla 500 μ l naředěného 75 % ethanolu (opatrně po stěně zkušavky). Zamíchala jsem v ruce a dala stočit do centrifugy (5 minut, 7 500 g, 4 °C).

Poté jsem se opatrně snažila odsát veškerý supernatant, abych peletu nepoškodila. Hlíkala jsem, kdy peleta začne průhlednět. V tu chvíli jsem přidala 40 μ l DEPC vody a důkladně promíchala, aby se peleta zcela rozpustila. Poté jsem vzorky uchovávala v lednici.

4.8.2 Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem

Pro měření koncentrace a čistoty RNA jsem použila spektrofotometr Nanodrop. Kontaminaci RNA proteiny jsem sledovala z poměru absorbancí při $A_{260}(\text{DNA})/A_{280}(\text{proteiny})$. Poměr absorbancí by měl být $> 1,8$. Dále jsem sledovala z poměru absorbancí kontaminaci fenolem. $A_{260}(\text{DNA})/A_{230}(\text{fenol})$. Hodnota by se měla blížit dvěma.

Přístroj jsem odklopila a nanasla na spodní kovový hrot 1,5 μ l vody na očištění. Opatrně jsem přiklopila, poté přístroj odklopila a oba hroty očistila buničinou. Znovu jsem nanasla 1,5 μ l vody jako blank na spodní kovový hrot, přiklopila a změřila. Vodu jsem otřela z obou protilehlých hrotů. Vzorek jsem promíchala a nanasla 1,5 μ l na spodní

hrot. Přiklopila jsem a zapsala hodnotu. Očistila jsem hroty a stejně změřila druhý vzorek. $C_{\text{Piperiton10}} = 238,2 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $C_{\text{Piperiton50}} = 261,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Poté jsem hroty očistila opět vodou, otřela a přístroj nechala zavřený.

4.8.3 Ošetření DNAsou

Příprava pro reverzní transkripci zahrnuje ošetření RNA DNAsou, která selektivně štěpí pouze DNA a odstraní případnou kontaminaci vzorků genomovou DNA.

4.8.3.1 Příprava zásobních roztoků

A) DEPC H₂O – Redestilovanou vodu jsem ošetřila diethylpyrokarbonátem (DEPC) 0,1 %, protřepala a nechala stát přes noc. Následně jsem ji 20 minut sterilizovala v autoklávu při 120 °C.

B) 0,5 M EDTA, pH 8,0 – Navázila jsem si 18,61 g EDTA a rozpustila přibližně v 80 ml DEPC vody. Přidala jsem 2 g pelet NaOH a za stálého míchání a měření pH jsem přidávala NaOH dokud se EDTA nerozpustila (pH 8,0). Poté jsem roztok doplnila DEPC vodou do 100 ml.

C) 0,1 M EDTA, pH 8,0 – Smíchala jsem zásobní roztok 0,5 M EDTA a DEPC H₂O v poměru 1:4.

Do 0,5 ml mikrozkušavek jsem přidala vypočítané množství vody. K tomu 4 μl RNA (přepočteno podle změřené koncentrace). Následně 4 μl reakční směsi, kterou jsem si vytvořila smícháním 12 μl pufru (10x DNase buffer) a 4 μl DNase (nejprve zhomogenizují pipetou).

Poté jsem nechala vzorky inkubovat v Thermomixeru 25 minut při 37 °C s třepáním 500 rpm. Přidala jsem 1,5 μl 0,1 M EDTA. Vzorky jsem stočila na centrifuze, zhomogenizovala na třepačce a znovu stočila na centrifuze. Následně jsem je nechala inkubovat 5 minut při 75 °C. V tomto kroku došlo k inaktivaci DNasy.

Nakonec jsem dodala 8,5 μl DEPC vody a promíchala. Vzorky jsem uchovávala pro další zpracování při -80 °C. Koncentrace ošetřené RNA je 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.8.4 Reverzní transkripce

RNA je reverzní transkriptasou převedena na jednořetězcovou cDNA (complementary DNA) s použitím náhodných hexamerů.

Připravila jsem si 3 mikrozkušavky a do nich napipetovala 8 μl vzorků (RNA ředěná na 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Přidala jsem 1 μl hexameru po stěně zkušavky a stočila na centrifuze. Poté jsem v PCR cykléru tuto směs zahřála na 65 °C, 5 minut. Po 5 minutách jsem metodu pozastavila.

Připravila jsem si mastermix podle následujícího postupu:

- 16 μl pufru
- 8 μl DTT
- 16 μl dNTPs
- 2 μl RT (kontrola bez RT)
- 14 μl H₂O (u kontroly 16 μl H₂O)

Vše jsem promíchala. Pipetovala jsem 11 μl mastermixu a do blanku 11 μl mastermixu bez RT. Všechno jsem stočila na centrifuze. Poté jsem mikrozkušavky vrátila zpět do PCR cykléru a spustila pokračování metody. Takto připravenou cDNA jsem uchovávala při -20 °C.

4.8.5 Real-Time PCR

Ke kvantifikaci DNA a RNA po reverzní transkripci se využívá metoda real-time PCR. Pomocí cykléru je sledován průběh každého cyklu a množství produktů (amplikonů) je kontinuálně zaznamenáváno. K detekci amplikonů se využívá monitorování fluorescence interkalačních barviv (např. SYBR green, ethidiumbromid) nebo fluorescenčních sond (např. TaqMan sondy), které během PCR hybridizují k řetězcům vznikajících amplikonů (Beránek 2016).

Připravila jsem si roztok mastermixu podle následujícího postupu:

- voda 33,6 μl
- 2 X SG mix 80 μl
- F Primer (5 μM) 3,2 μl
- R Primer (5 μM) 3,2 μl

Mastermix jsem promíchala a pipetovala 15 μ l do PCR stripů. Dále jsem přidávala 5 μ l cDNA. Pro NTC (no template control) jsem pipetovala 5 μ l vody. Stripy jsem zavíčkovala a popsala na krajích stripu, abych nezabránila projití paprsku. Tuto směs jsem dala do PCR cykléru (QuantStudio 6), spustila program a poté vypočítala podle vzorce.

$$\text{„comparative Ct“: } 2^{(-\Delta Cq)} \quad (\Delta Cq = Cq(TG) - Cq(RG)),$$

kde TG představuje cílový gen a RG referenční gen. Jako referenční gen jsem použila geometrický průměr ACTB a YWHAZ, které byly vyhodnoceny v programu RefFinder jako nejstabilnější.

Použité primery (Tab. 5), které navrhla doc. Petra Matoušková pomocí programu Primer3, byly dodány společností Generi Biotech (Hradec Králové). Následně byla ověřena funkčnost a účinnost těchto primerů (ověření provedl PharmDr. Tomáš Zárýbnický, Ph.D.).

Tab. 5 Struktura použitých primerů

Zkratka	Číslo v genové bance	Název genu	Fyziologická funkce	Sekvence primerů 5'-3'
Cílové geny				
GSTA1	NM_145740.5	Glutathion-S-transferasa α	Detoxikace elektrofilních látek, ochrana před ROS a produkty peroxidace	F: CGCTACTTCCCTGCCTTTGA R: GCCCGGCTCAGCTTGTTG
GSTP1	NM_000852.4	Glutathion-S-transferasa π	Metabolismus xenobiotik	F: AGCCTTTTGAGACCCTGCTG R: GTCAGCGAAGGAGATCTGGTC
GPx1	NM_201397.3	Glutathionperoxidasa 1	Ochrana před oxidačním stresem – odstranění H ₂ O ₂	F: TATCGAGAATGTGGCGTCCC R: TCTTGGCGTTCTCCTGATGC
GPx2	NM_002083.4	Glutathionperoxidasa 2	Ochrana před oxidačním stresem	F: GCACCTTCCCAACCATCAAC R: GCAACTTTAAGGAGGCGCTT
GPx4	NM_002085.5	Glutathionperoxidasa 4	Ochrana před oxidačním stresem – odstranění lipidových hydroperoxidů	F: GAGATCAAAGAGTTCGCCGC R: TGCTGAACATATCGAATTTGACG
SOD1	NM_000454.5	Superoxiddismutasa 1	Ochrana před oxidačním stresem – odstranění superoxidu	F: ATCCAGAAAACACGGTGGGC R: TCACATTGCCCAAGTCTCCA
CAT	NM_001752.4	Katalasa	Ochrana před oxidačním stresem – odstranění H ₂ O ₂	F: GAGAAGTGCGGAGATTCAACAC R: TCACATAGAATGCCCGCACC
GR	NM_000637.5	Glutathionreduktasa	Udržování glutathionu v redukovaném stavu	F: TGCGTGAATGTTGGATGTGT R: CCCTCACAACTTGGAAGCC
Referenční geny pro normalizaci mRNA				
ACTB	NM_001101.4	β -aktin	Strukturní protein cytoskeletu	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGAG R: CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
YWHAZ	NM_003406.3	Tyrosin-3-monooxygenasa/tryptofan-5-monooxygenasa aktivací protein ζ	Součást celé řady signálních drah	F: TGATCCCCAATGCTTCACAAG R: GCCAAGTAACGGTAGTAATCTCC

4.9 Stanovení aktivity GST v lidských jaterních řezech

U tohoto stanovení jsem postupovala stejně jako v kapitole 4.6.4. Rozdílem byla příprava homogenátu, ve kterém jsem následně aktivitu měřila.

Připravené jaterní řezy jsem inkubovala s piperitonem. Postupovala jsem stejně jako v kapitole 4.5. Příprava homogenátu zahrnovala rozmělnění řezů na ledu pomocí tyčinkového homogenizátoru a poté ultrazvukového hrotu (cca 10 sekund). Směs jsem stočila v centrifuze při 10 000 g, 20 minut, při 4 °C. Takto se odstranily zbytky vaziva a potrhaných buněčných membrán. Vrchní část (homogenát) jsem odebrala a rozpipetovala do plastových mikrozkušavek. Před stanovením byl homogenát z řezů naředěn 3x. Poté se měřila aktivita glutathion-*S*-transferasy stejně jako v kapitole 4.6.4. Pro stanovení bílkoviny byl homogenát naředěn 15x.

4.10 Statistické zpracování výsledků

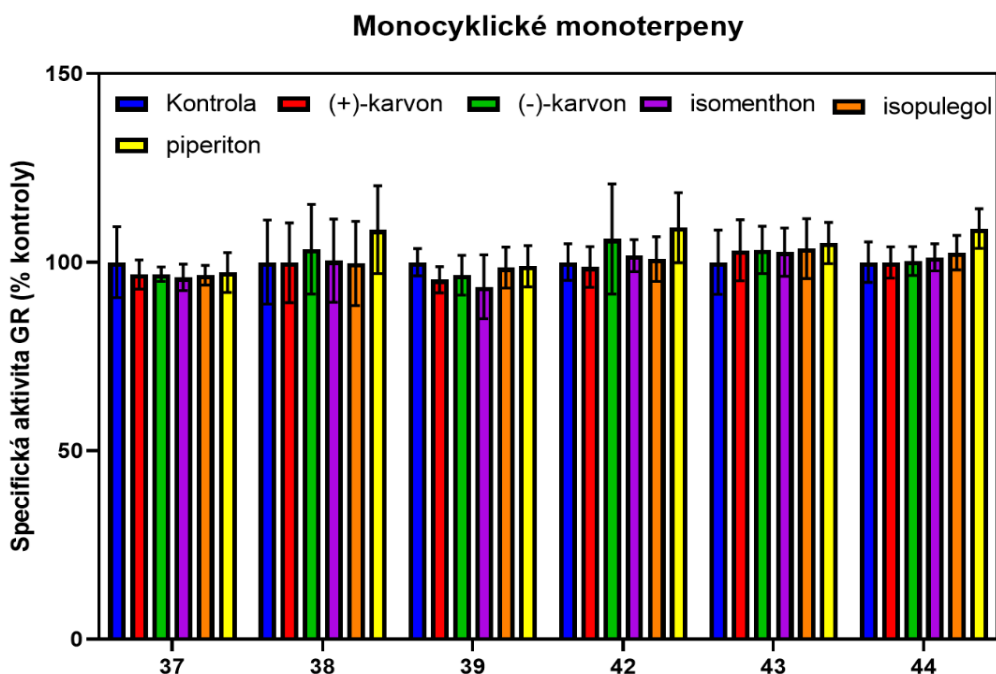
Vzorky byly měřeny vždy alespoň v triplikátech a každé stanovení bylo provedeno alespoň třikrát. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Porovnání mezi vícero skupinami bylo provedeno pomocí one-way ANOVA s Dunnettovým *post-hoc* testem za použití GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Rozdíly byly považovány za významné, když $p < 0,05$ a jsou v grafu označeny " * ".

5. VÝSLEDKY

5.1 Aktivita glutathionreduktasy v cytosolu

Ke spektrofotometrickému stanovení aktivity glutathionreduktasy byly zapotřebí dva substráty. GSSG, u kterého docházelo k redukci na glutathion (GSH) a NADPH, u kterého současně docházelo k oxidaci. Spotřebu NADPH jsem pozorovala jako úbytek absorbance, jehož rychlost byla přímo úměrná aktivitě studovaného enzymu. Z absorbance jsem vypočítala aktivitu glutathionreduktasy, kterou jsem následně pomocí koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích přepočítala na specifickou aktivitu. Tu jsem zpracovala do grafu a porovnávala jsem vliv jednotlivých monoterpenů na aktivitu enzymu glutathionreduktasy v cytosolu.

Z naměřených hodnot vyplývá, že u enzymu glutathionreduktasy se mi nepodařilo získat žádné statisticky významné výsledky (Obr. 20). Nejvyšší pokles aktivity (o 6,5 %) jsem zaznamenala u pacienta číslo 39 v důsledku působení monoterpenu isomenthonu. Naopak nejvyšší nárůst aktivity měl piperiton. Konkrétně u pacienta číslo 42 (o 9,1 %).



Obr. 20 Vliv monocyklických monoterpenů na aktivitu glutathionreduktasy v lidském jaterním cytosolu od šesti dárců. Výsledky představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.2 Aktivita glutathionperoxidasy v cytosolu

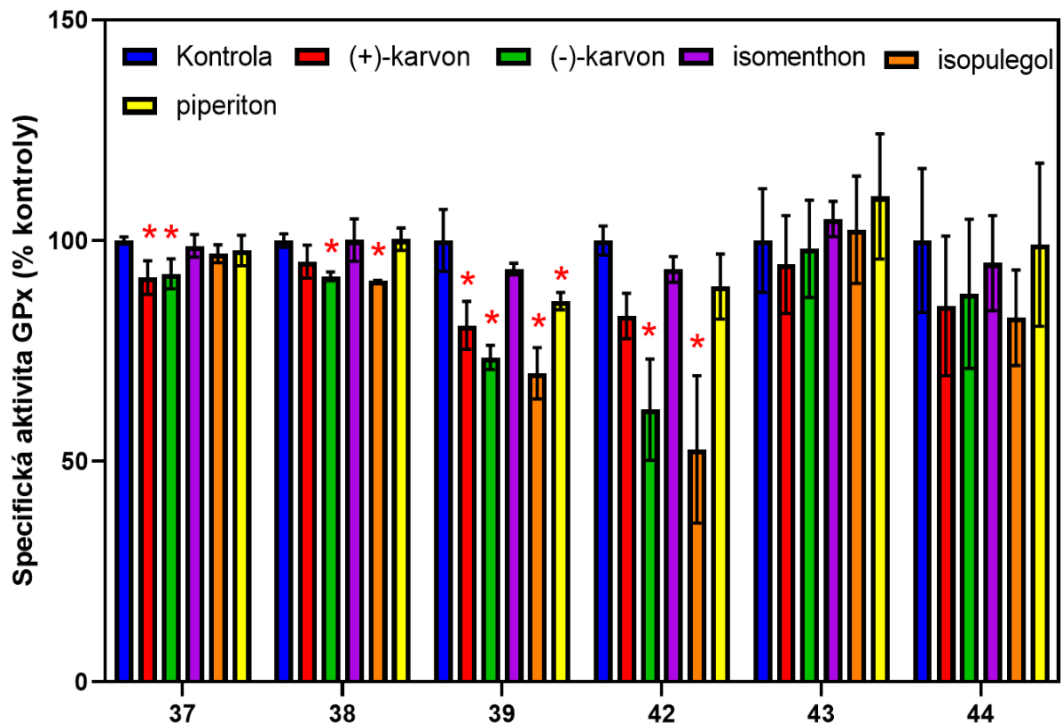
Aktivita glutathionperoxidasy byla stanovena spektrofotometricky při 340 nm. Principem reakce je přeměna GSH na oxidovaný glutathion (GSSG). Současnou oxidaci NADPH jsem sledovala jako pokles měřené absorbance. Vypočtenou aktivitu jsem pomocí koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích přepočítala na specifickou aktivitu. Tu jsem následně zpracovala do grafů.

Porovnávala jsem specifickou aktivitu GPx mezi šesti studovanými pacienty. Z výsledků je patrné, že u enzymu glutathionperoxidasy docházelo vlivem studovaných monoterpenů především k poklesu aktivity. Ze šesti studovaných pacientů zaznamenal nejvíce statisticky významných výsledků pacient číslo 39. Vlivem monoterpenu isopulegolu poklesla aktivita enzymu glutathionperoxidasy u pacienta číslo 39 o 30,1 %. V důsledku působení (-)-karvonu poklesla aktivita o 26,5 % v porovnání s kontrolním vzorkem. Dále působením monoterpenu (+)-karvonu poklesla aktivita o 19,2 % a vlivem monoterpenu piperitonu o 13,7 %. Všechny tyto hodnoty poklesu aktivity byly u pacienta číslo 39 statisticky významné (Obr. 21).

Výrazný pokles aktivity enzymu GPx byl pozorován i u dalších pacientů. Konkrétně vlivem monoterpenu isopulegolu (o 47,3 %) a (-)-karvonu (o 38,3 %) u pacienta číslo 42. Tyto výsledky byly považovány za statisticky významné. Další signifikantní změny aktivity byly zaznamenány také u pacienta číslo 38. Pokles aktivity o 9,1 % v důsledku monoterpenu isopulegolu a 8,1 % vlivem (-)-karvonu v porovnání s kontrolním vzorkem. K dalším výrazným změnám patřil pokles aktivity u pacienta číslo 37. Aktivita klesla o 8,3 % v důsledku působení (+)-karvonu a o 7,6 % vlivem (-)-karvonu.

Nejvíce ovlivňoval GPx monoterpen (-)-karvon, u kterého jsem zaznamenala čtyři statisticky významné výsledky (Obr. 21).

Monocyklické monoterpeny

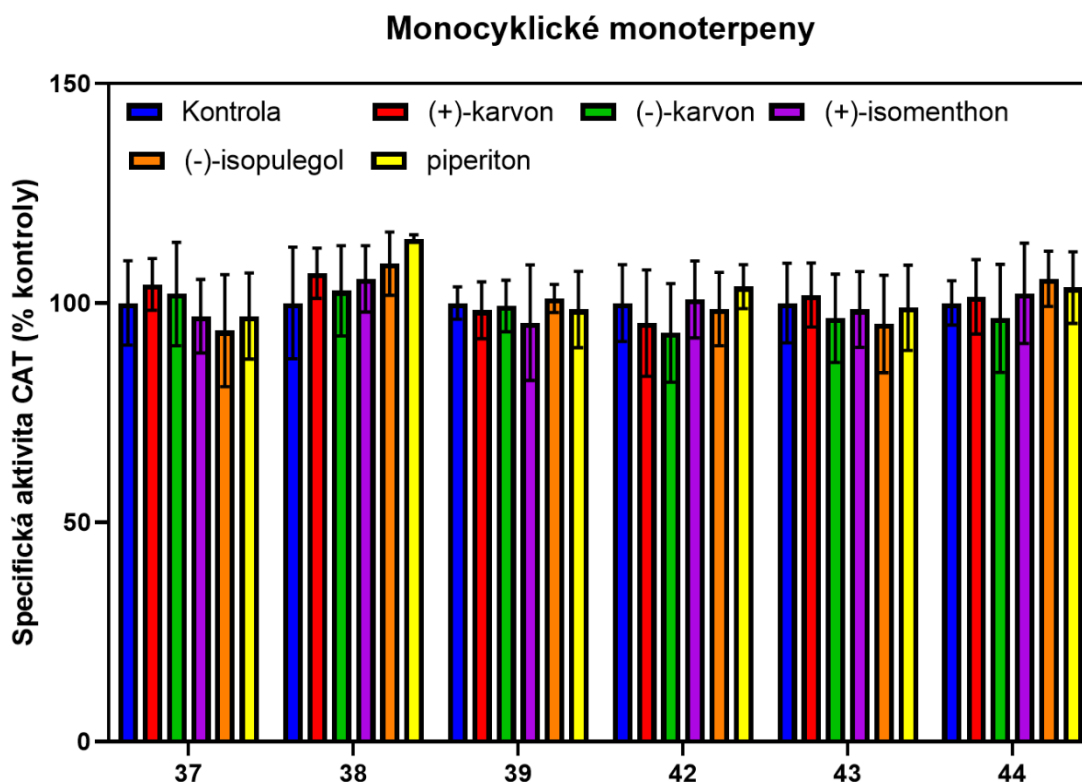


Obr. 21 Vliv monocyklických monoterpenů na aktivitu glutathionperoxidasy v lidském jaterním cytosolu od šesti dárců. Výsledky představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.3 Aktivita katalasy v cytosolu

Stanovení aktivity katalasy předcházela reakce molybdenanu amonného s H_2O_2 . Výsledkem je žlutý komplex, jehož absorbance byla měřena při 405 nm. Z naměřené absorbance jsem vypočítala aktivitu katalasy a následně přepočítala pomocí koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích na specifickou aktivitu. Výsledky jsem zpracovala do grafu. Porovnávala jsem vliv studovaných monoterpenů u jednotlivých pacientů.

Níže (Obr. 22) jsou zobrazeny výsledky aktivity katalasy v cytosolu, přičemž nejvyšší nárůst aktivity byl pozorován u pacienta číslo 38 vlivem monoterpenu piperitonu. Nárůst aktivity byl 14,7 %. Naopak nejvyšší pokles aktivity (6,8 %) jsem zaznamenala u pacienta číslo 42 vlivem monoterpenu (-)-karvonu. U enzymu katalasy jsem nezaznamenala žádné statisticky významné výsledky.



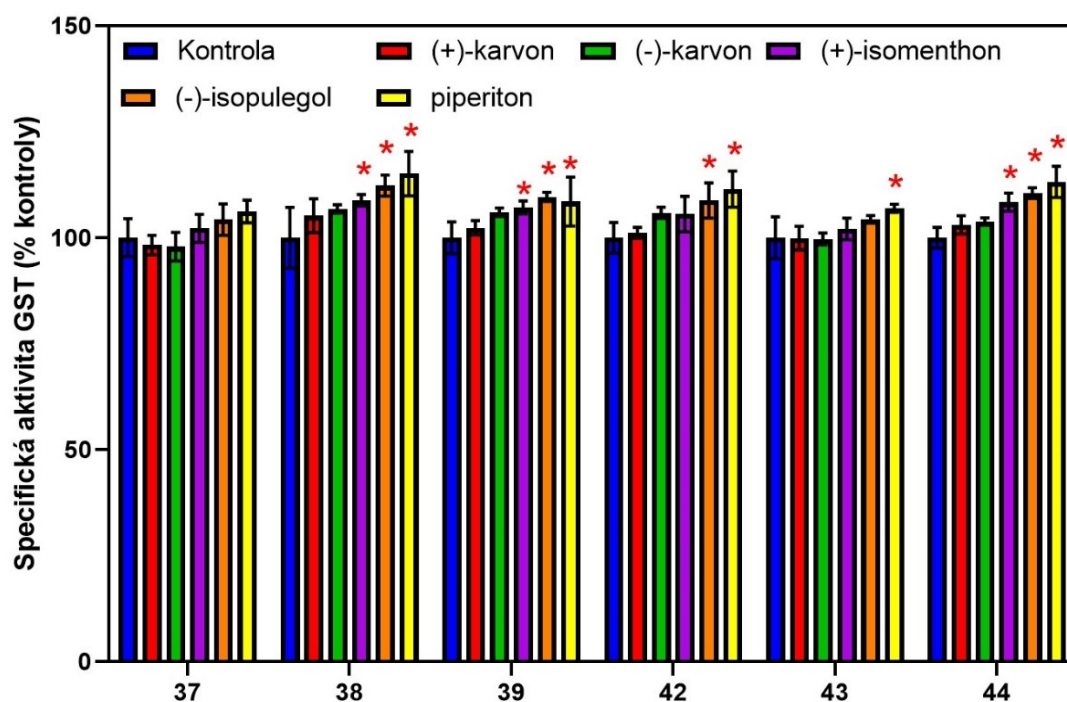
Obr. 22 Vliv monocyklických monoterpenů na aktivitu katalasy v lidském jaterním cytosolu od šesti dárců. Výsledky představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.4 Aktivita glutathion-*S*-transferasy v cytosolu

Aktivita byla stanovena spektrofotometricky při 340 nm za použití univerzálního substrátu 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu a glutathionu jako substrátů. Růst absorbance je přímo úměrný aktivitě GST ve vzorku. Hodnotila jsem účinek pěti vybraných monoterpenů na aktivitu enzymu glutathion-*S*-transferasy v subcelulárních frakcích, které jsem získala z lidské jaterní tkáně od šesti dobrovolníků.

Z výsledků vyplývá, že aktivitu enzymu GST v cytosolu nejvýrazněji ovlivňoval monoterpen piperiton (Obr. 23). Proto byl vybrán pro další experiment v ultratenkých lidských jaterních řezech (PCLS). U pacienta číslo 38 měl piperiton nejvyšší statisticky významný výsledek. Nárůst aktivity v porovnání s kontrolním vzorkem (100 %) byl až 15,2 %. Další statisticky významné zvýšení aktivity GST vyvolal piperiton i u dalších pacientů. Výrazně se zvýšila aktivita u pacienta číslo 44 (o 13,2 %), 42 (o 11,5 %), 39 (o 8,6 %), 43 (o 7,0 %). Ze studovaných monoterpenů měl druhý statisticky nejvýznamnější vliv monoterpen (-)-isopulegol, kde jsem u pacienta číslo 38 zaznamenala nárůst aktivity o 12,3 %. Dále pak u pacienta číslo 44 (10,6 %), u pacienta číslo 39 (9,6 %), u pacienta číslo 42 (8,8 %). U pacientů číslo 38, 39 a 44 vzrostla aktivita GST okolo 7,2-8,9 % vlivem monoterpenu (+)-isomenthonu. Tyto výsledky jsou rovněž statisticky významné. Ačkoliv monoterpeny (+)-karvon a (-)-karvon u některých pacientů mírně zvyšovaly aktivitu enzymu, nebyly tyto výsledky statisticky významné. U pacienta číslo 37 jsem nezaznamenala žádný statisticky významný výsledek ani u jednoho z monoterpenů.

Monocyklické monoterpeny



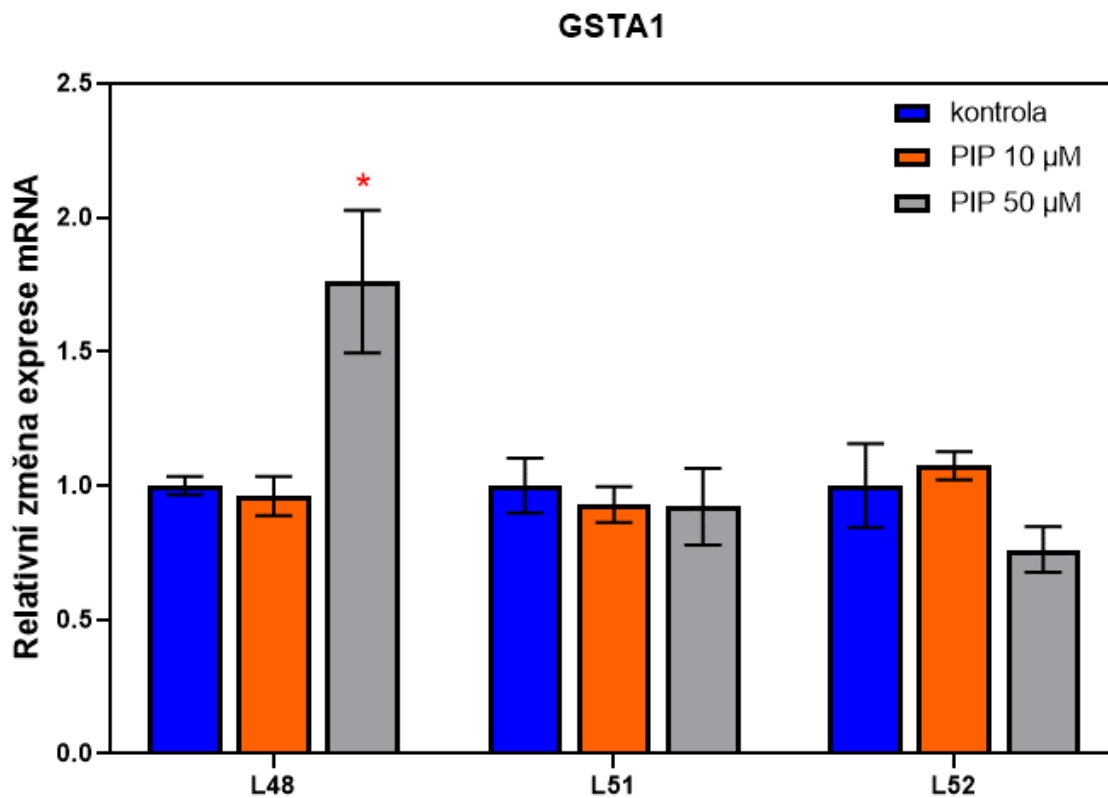
Obr. 23 Vliv monocyklických monoterpenů na aktivitu glutathion-S-transferasy v lidském jaterním cytosolu od šesti dárců. Výsledky představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.5 Stanovení exprese mRNA v jaterních řezech

Ke stanovení změn genové exprese jsem využila ultratenké lidské jaterní řezy a monoterpen piperiton, jelikož se z předchozích měření jevil jako neaktivnější ze studovaných látek. Jaterní řezy od tří dobrovolníků byly inkubovány se studovaným monoterpenem v koncentraci 10 μM a 50 μM . Změny exprese mRNA jsem studovala pomocí RT-qPCR. Prvním krokem byla izolace RNA ze tkání, následně převedení RNA pomocí reverzní transkriptasy na jednořetězcovou cDNA. V PCR cykléru byly fluorescenčně detekovány vznikající amplikony. K vyhodnocení jsem použila program QuantStudio 6. Výsledky jsem zpracovala v programu Microsoft Excel pomocí metody „Comparative Ct“. Jako referenční gen jsem použila geometrický průměr ACTB a YWHAZ, které byly v předchozích experimentech vyhodnoceny v programu RefFinder jako nejstabilnější. Výsledky jsem porovnávala s kontrolním vzorkem, u kterého je míra exprese mRNA vyjádřena hodnotou 1,0. Studovaná látka v některých případech zvyšovala expresi daného genu (indukce) v porovnání s kontrolním vzorkem. U některých vzorků jsem ale pozorovala také snížení exprese (inhibice).

5.5.1 Vliv piperitonu na genovou expresi GSTA1

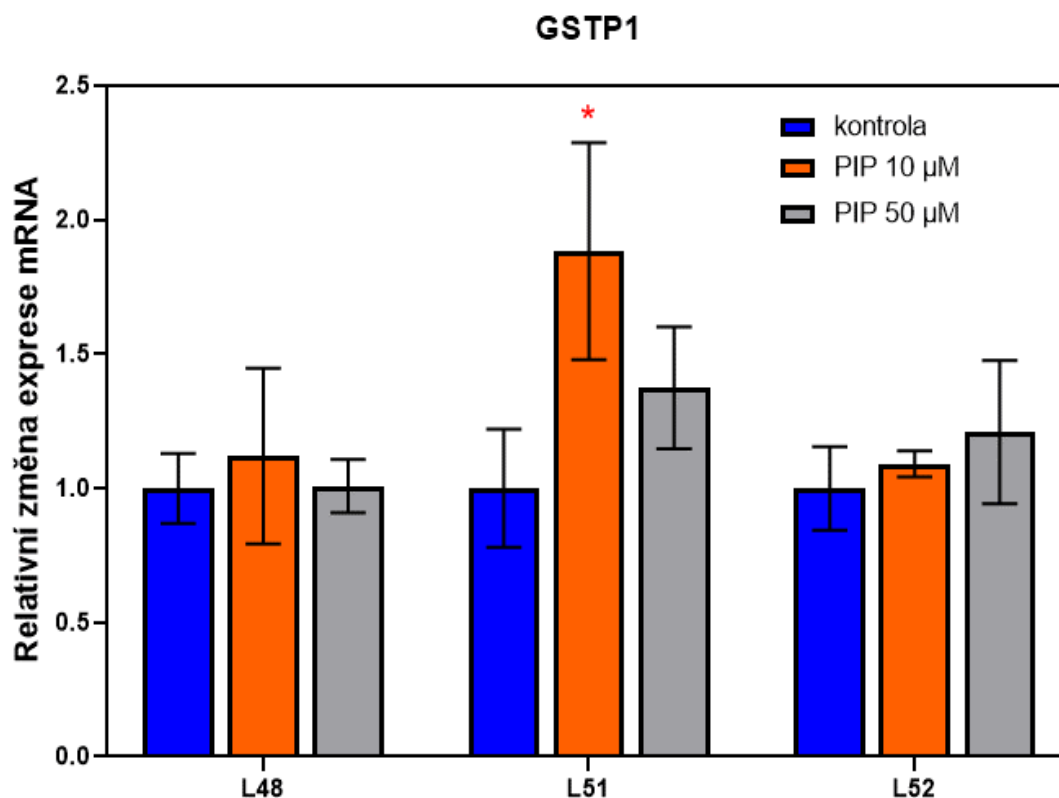
Na Obr. 24 je znázorněna změna exprese GSTA1 působením monoterpenu piperitonu ve dvou zkoušených koncentracích (10 μM a 50 μM). Použitý primer měl schopnost vázat se na jednu isoformu glutathion-*S*-transferasy, konkrétně se jednalo o GSTA1. Porovnávala jsem jaterní vzorky získané od tří dobrovolníků (L48, L51, L52). V experimentu jsem zaznamenala změnu exprese GSTA1 v důsledku působení piperitonu 50 μM u jaterního vzorku číslo L48. Monoterpen indukoval expresi GSTA1 1,8x, tato změna byla signifikantní. Pozorovala jsem také mírnou, avšak nesignifikantní inhibici exprese vlivem piperitonu v koncentraci 50 μM (L52). U pacienta číslo L51 prakticky nedošlo k indukci ani inhibici GSTA1 (Obr. 24).



Obr. 24 Vliv monoterpenu piperitonu na genovou expresi GSTA1. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μ M a 50 μ M po dobu 24 hodin při 37°C. Výsledky představují průměr \pm SD ze tří biologických replikátů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.5.2 Vliv piperitonu na genovou expresi GSTP1

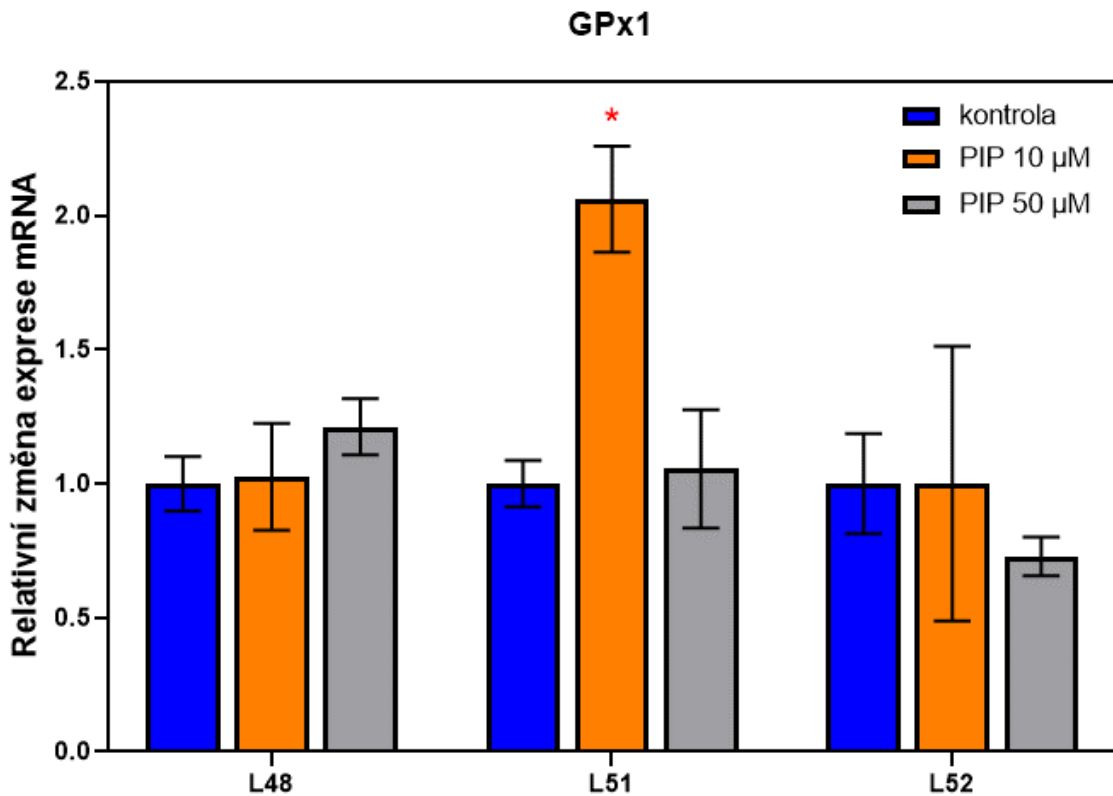
Pro stanovení exprese GSTP1 byl využit speciálně navržený primer, který vázal jednu isoformu glutathion-*S*-transferasy (GSTP1). Piperiton 10 μ M způsobil v případě pacienta číslo L51 signifikantní indukci exprese GSTP1 (1,9x; Obr. 25). Ačkoliv účinek piperitonu v koncentracích 10 μ M a 50 μ M většinou nezpůsobil žádné statisticky významné změny exprese GSTP1, můžeme téměř u všech jaterních vzorků sledovat určité zvýšení exprese.



Obr. 25 Vliv monoterpenu piperitonu na genovou expresi GSTP1. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μ M a 50 μ M. Výsledky představují průměr \pm SD ze tří biologických replikátů. Skupiny označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.5.3 Vliv piperitonu na genovou expresi GPx1

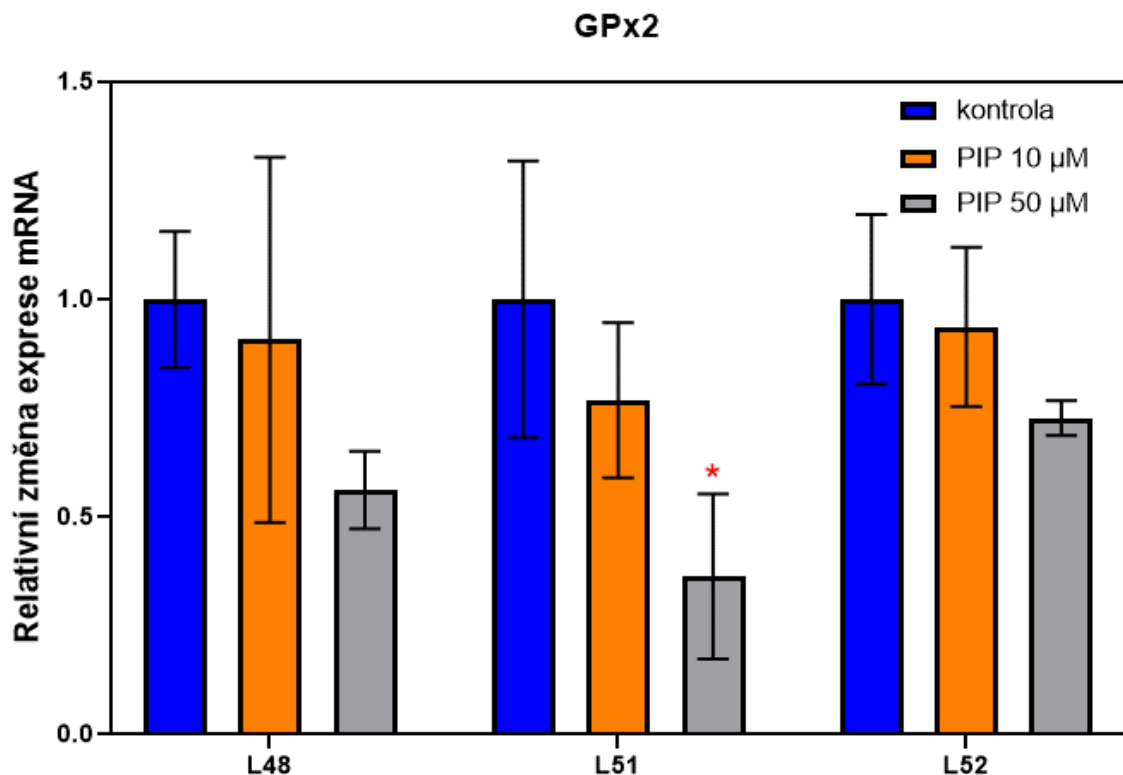
Na Obr. 26 je znázorněn vliv monoterpenu piperitonu v koncentraci 10 μM a 50 μM na expresi mRNA GPx1. Nejvýznamnější změna exprese je zřetelná u pacienta číslo L51. Indukce 2,1x byla zaznamenána v případě monoterpenu piperitonu v koncentraci 10 μM . Tento výsledek je statisticky významný. Mírný inhibiční potenciál jsem zaznamenala u pacienta číslo L52 vlivem piperitonu 50 μM . Tento pokles exprese GPx1 není statisticky významný.



Obr. 26 Vliv monoterpenu piperitonu na genovou expresi GPx1. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μM a 50 μM . Výsledky představují průměr \pm SD ze tří biologických replikátů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.5.4 Vliv piperitonu na genovou expresi GPx2

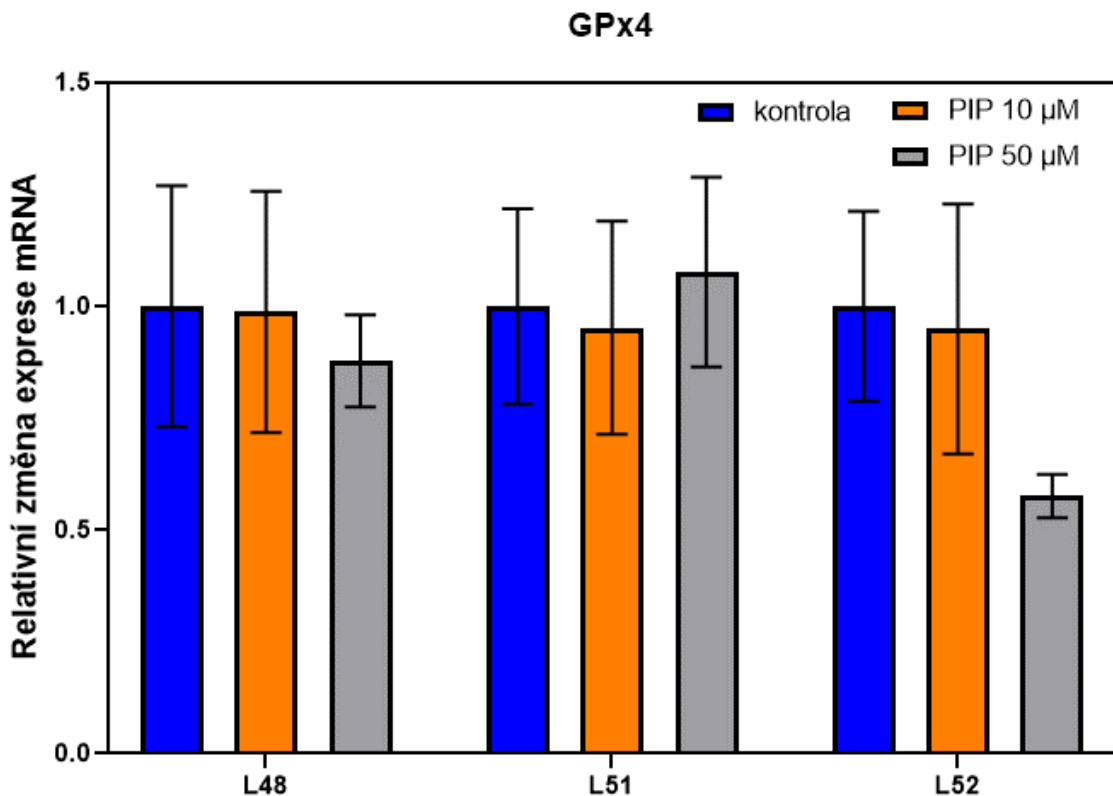
Z naměřených hodnot vyplývá (Obr. 27), že během tohoto experimentu docházelo především k poklesu exprese GPx2, a to u všech měřených vzorků. Monoterpen piperiton v koncentraci 50 μM signifikantně inhiboval expresi u pacienta číslo L51 (snížení o 63,7% proti kontrole). V této koncentraci monoterpenu jsem zaznamenala pokles exprese i u zbývajících dvou pacientů (L48, L52). Kromě zmíněného signifikantního výsledku u pacienta L51 se ve všech ostatních případech jednalo o statisticky nevýznamné výsledky.



Obr. 27 Vliv monoterpenu piperitonu na genovou expresi GPx2. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μM a 50 μM . Výsledky představují průměr \pm SD ze tří biologických replikátů. Skupiny označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.5.5 Vliv piperitonu na genovou expresi GPx4

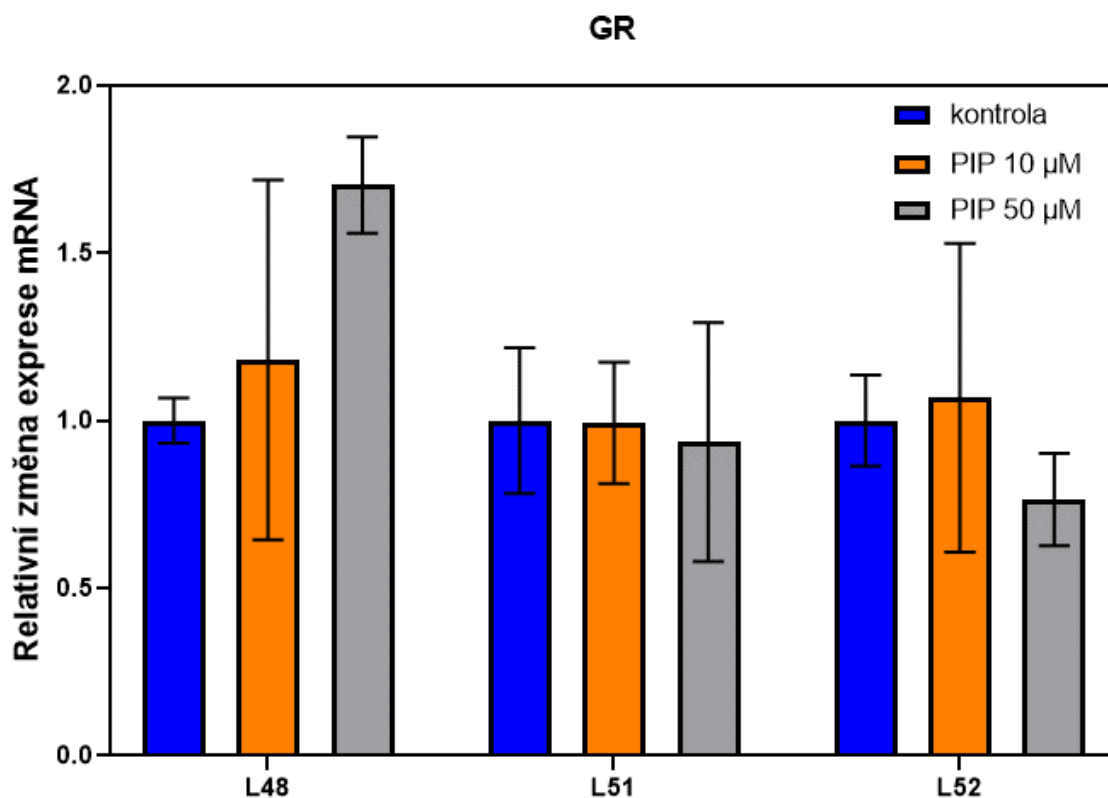
Zjištěné výsledky genové exprese GPx4 nebyly u monoterpenu piperitonu statisticky významné ani v jedné ze zkoušených koncentrací. K mírnému poklesu exprese došlo u pacienta číslo L52 vlivem monoterpenu piperitonu (koncentrace 50 μM). U většiny ostatních vzorků nedošlo k výraznější indukci ani inhibici enzymu (Obr. 28).



Obr. 28 Vliv monoterpenu piperitonu na genovou expresi GPx4. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μM a 50 μM . Výsledky představují průměr \pm SD ze tří biologických replikátů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.5.6 Vliv piperitonu na genovou expresi GR

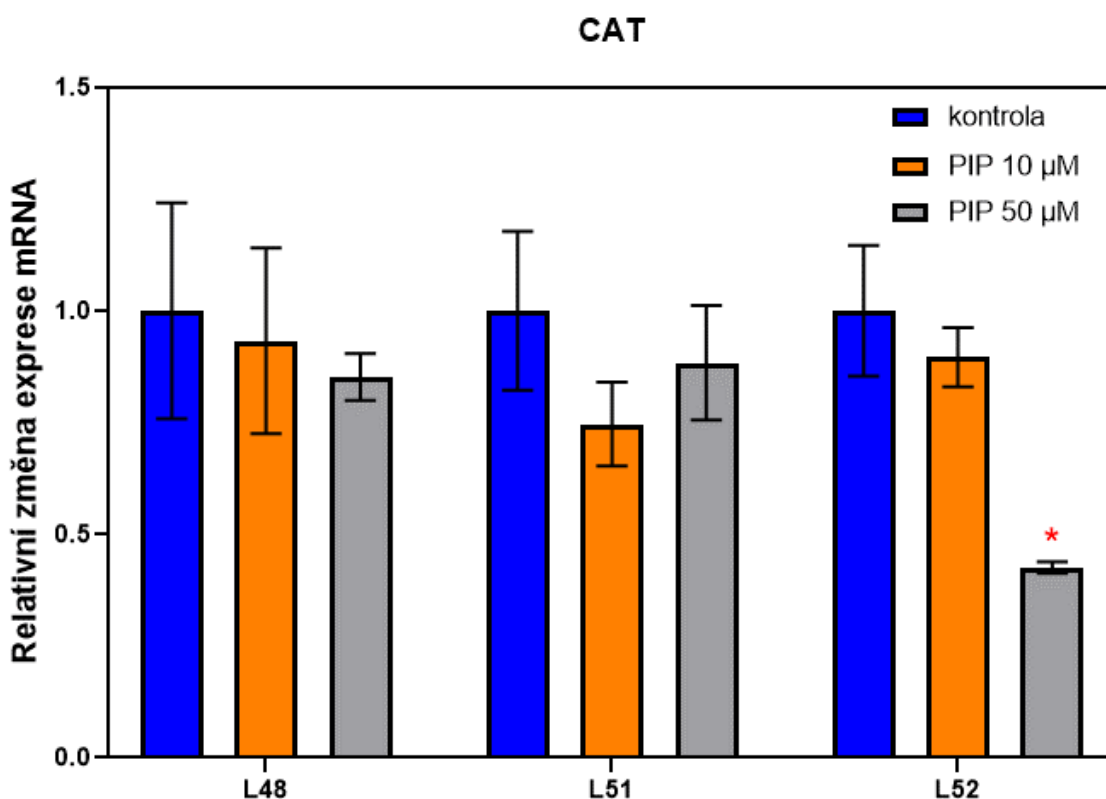
Na Obr. 29 je znázorněn vliv monoterpenu piperitonu v koncentraci 10 μM a 50 μM na expresi mRNA GR. Nejvýraznější změna exprese byla pozorována u pacienta číslo L48 vlivem piperitonu 50 μM . Monoterpen indukoval expresi 1,7x. Další změna exprese nastala u piperitonu 50 μM u pacienta číslo L48 (piperiton 10 μM), kdy byla pozorována indukce 1,2x. U pacienta L52 došlo k mírnému snížení exprese GR. Ve všech případech však výsledky nebyly signifikantní.



Obr. 29 Vliv monoterpenu piperitonu na genovou expresi GR. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μM a 50 μM . Výsledky představují průměr \pm SD ze tří biologických replikátů. Skupiny označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.5.7 Vliv piperitonu na genovou expresi CAT

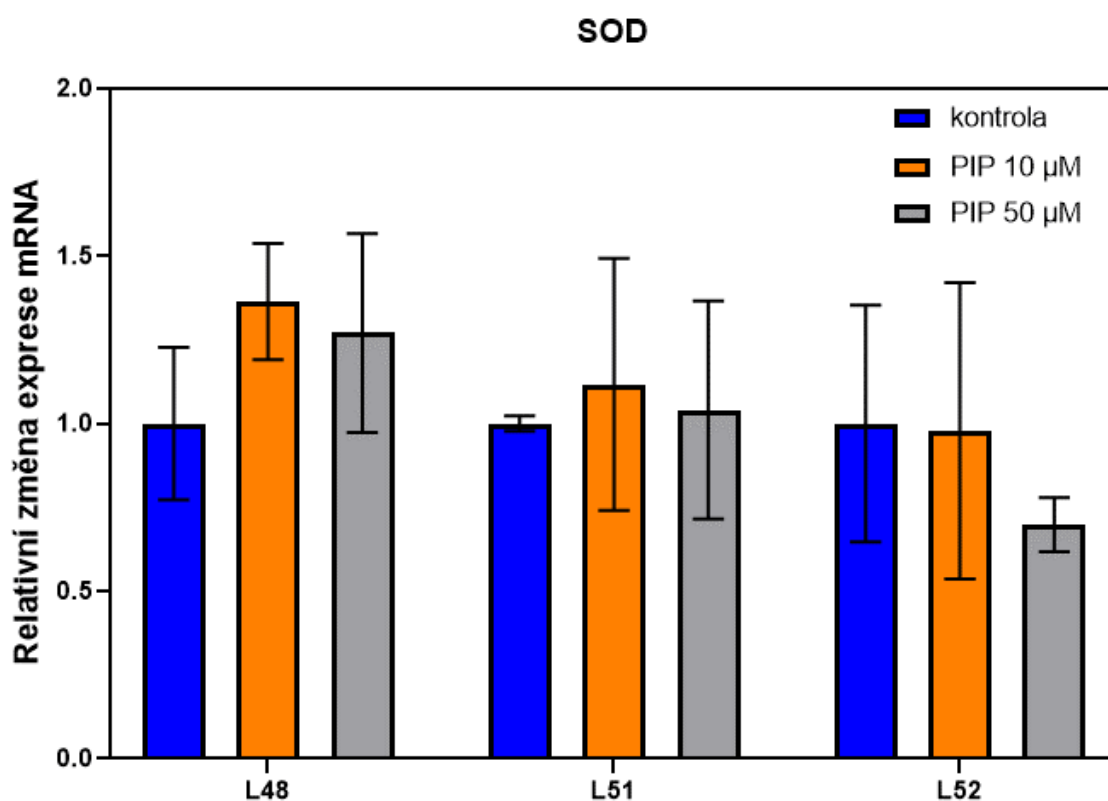
Zjištěné výsledky genové exprese CAT nebyly u monoterpenu piperitonu statisticky významné. Pouze v jednom případě, kdy k nejvýraznější změně došlo u pacienta číslo L52, kde monoterpen piperiton v koncentraci 50 μM inhiboval expresi o 56,4 %. Rovněž u pacienta L51 došlo inhibici exprese (snížení o 25,3 % proti kontrole) vlivem monoterpenu piperitonu v koncentraci 10 μM , ale tento výsledek není považován za statisticky významný. U většiny ostatních vzorků nedošlo k tak výrazné indukci ani inhibici enzymu (Obr. 30).



Obr. 30 Vliv monoterpenu piperitonu na genovou expresi CAT. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μM a 50 μM . Výsledky představují průměr \pm SD ze tří biologických replikátů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.5.8 Vliv piperitonu na genovou expresi SOD

Na Obr. 31 je znázorněn vliv monoterpenu piperitonu v koncentraci 10 μM a 50 μM na expresi mRNA SOD. Nejvýznamnější indukce exprese byla zaznamenána u pacienta číslo L48 vlivem monoterpenu piperitonu v koncentraci 10 μM (1,4x). Druhá nejvyšší změna exprese byla pozorována u stejného pacienta v koncentraci 50 μM (1,3x). Dále u pacienta číslo L52 vlivem monoterpenu piperitu v koncentraci 50 μM došlo k poklesu exprese o 30,2 %. Žádný z těchto výsledků nebyl statisticky významný.



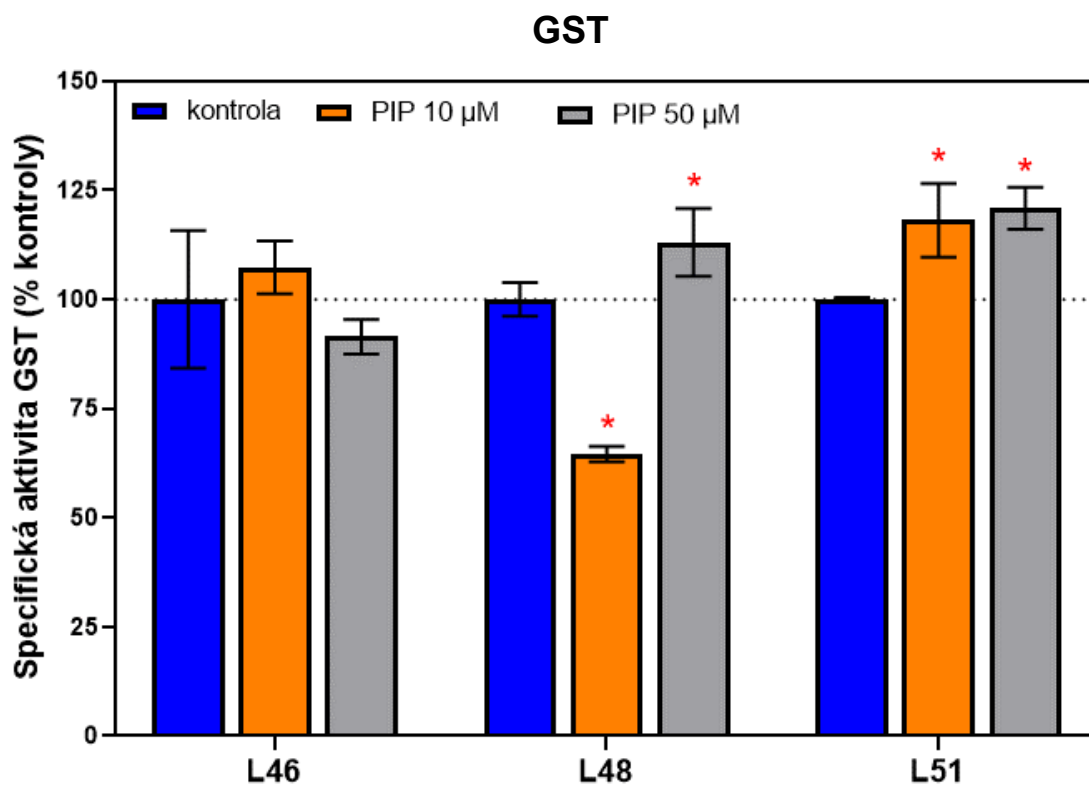
Obr. 31 Vliv monoterpenu piperitonu na genovou expresi SOD. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μM a 50 μM . Výsledky představují průměr \pm SD ze tří biologických replikátů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

5.6 Stanovení aktivity GST

Z předchozího měření vyplývá, že v subcelulárních frakcích monoterpeny nejvíce ovlivňovaly aktivitu enzymu GST. Jako nejaktivnější ze studovaných monoterpenů se projevil piperiton. Byl proto vybrán pro další experiment v ultratenkých lidských jaterních řezech (PCLS).

Při stanovení aktivity GST v řezech jsem postupovala stejně jako při stanovení aktivity v cytosolu (4.6.4.). Rozdílem byla příprava homogenátu, ve kterém jsem následně aktivitu měřila. Příprava zahrnovala rozmělnění řezů, stočení směsi v centrifuze, poté odpipetování vrchní části s homogenátem a nakonec naředění před stanovením. Řezy jsem inkubovala s piperitonem a postupovala jsem stejně jako v kapitole 4.5.

Změny aktivity byly významné u dvou jaterních vzorků (L48 a L51) v obou koncentracích. Jediný statisticky významný inhibiční účinek měl piperiton (10 μM) u pacienta číslo L48. Pokles aktivity činil 35,4 %. Naproti tomu výrazný nárůst aktivity způsobil piperiton (10 μM) u pacienta číslo L51. Aktivita GST narostla o 18,1 %. Aktivita vzrostla také vlivem piperitonu 50 μM . U pacienta číslo L48 o 13,0 % a u pacienta číslo L51 o 20,9 %. Tyto výsledky jsou statisticky významné (Obr. 32). U pacienta číslo L46 nebyly žádné výsledky signifikantní.



Obr. 32 Vliv monoterpenu piperitonu na aktivitu glutathion-*S*-transferasy v ultratenkých lidských jaterních řezech od tří dárců. Jaterní řezy byly inkubovány s piperitonem v koncentraci 10 μM a 50 μM . Výsledky představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

6. DISKUSE

Od nepaměti se lidé snažili hledat léčivé rostliny v přírodě, aby zmírnili bolest a léčili nejrůznější onemocnění. Používání léčivých rostlin bylo nejdříve instinktivní a získané zkušenosti byly později předávány z generace na generaci, o čemž svědčí dostatek důkazů. Neustálý a trvalý zájem společnosti o léčivé rostliny přinesl sofistikovaný způsob jejich zpracování a dnešní moderní farmakoterapie zahrnuje řadu léků rostlinného původu (Petrovska 2012).

V posledních desetiletích výrazně roste zájem o přírodní terapii, mnozí považují bylinné léky za bezpečnější alternativu k chemickým léčivům. Tento přístup ale může mít fatální následky, jelikož pacienti zpravidla nežádoucí účinky přírodních produktů nehlásí lékařům. Je proto obtížné nežádoucí účinky zaznamenat a určit mechanismy toxicity. Ve většině případů se jedná o nevhodné použití přírodní terapie (nevhodná indikace, nadměrné dávky, dlouhodobé užívání) (Zárybnický et al. 2018b).

Nejrozmanitější třídou sekundárních metabolitů rostlin zahrnující desítky struktur jsou terpeny. Najdeme je v různých částech rostlin, mají charakteristickou vůni a jejich úkolem je přitahovat opylovače, obrana rostliny a interakce s okolním prostředím. Především monoterpeny a seskviterpeny jsou hlavními složkami silic a používají se v lidovém léčitelství, kosmetice a potravinářství. Některé monoterpeny se využívají jako preventivní prostředky při nachlazení a chřipce, předcházejí osteoporóze, působí proti srdečním chorobám a mají protiplísňové, antibakteriální nebo protinádorové účinky. Vznik nebo průběh rakoviny mohou monoterpeny ovlivňovat různými mechanismy. Mimo jiné zvyšují aktivitu enzymů v játrech, které slouží k detoxikaci organismu (např. GST), tímto mechanismem působí například monoterpen karvon (Bártíková et al. 2014, Dvořáková et al. 2011).

Některé monoterpeny jsou toxické pro hmyz a využívají se jako insekticidy. Část může být toxická také pro člověka, kdy se většinou jedná o ketony, řada z nich způsobuje kožní vyrážky (Dvořáková et al. 2011). Většina terpenů snadno proniká do organismu, a to především perorální absorpcí, kůží nebo inhalací. Studie prokázaly jaterní toxicitu u monoterpenů pulegonu, menthofuranu, kafru a limonenu, jelikož tyto látky tvoří reaktivní metabolity, zvyšují koncentraci reaktivních forem kyslíku a porušují antioxidační ochranu organismu. Je tedy pravděpodobně, že i jiné terpeny, u kterých není

dostatečně prozkoumáno, jak ovlivňují játra, mohou působit hepatotoxicky (Zárybnický et al. 2018b). Proto bylo předmětem mé diplomové práce studovat účinky pěti vybraných monocyklických monoterpenů na aktivitu a expresi antioxidantních enzymů v lidských játrech.

In vitro modely umožňují studovat toxické/protektivní účinky různých látek v lidských buňkách, což je nezbytné kvůli velkým mezidruhovým rozdílům, ale nemohou předvídat ani napodobovat složité buněčné interakce, ke kterým dochází *in vivo*. Proto jsou zapotřebí *ex vivo* modely, které v této práci představují lidské ultratenké jaterní řezy. Jedná se o zmenšený model jater, který si zachovává složitou a mnohobuněčnou architekturu jaterního prostředí. Musíme počítat s variabilitou výsledků, jelikož zdravá část jaterní tkáně, která byla k experimentům použita, pochází z nemocných jater. Pacienti také měli různé komorbidity, užívali rozdílnou medikaci a někteří podstoupili chemoterapii (de Graaf et al. 2007, Palma et al. 2019, Olinga a Schuppan 2013).

U některých monoterpenů včetně isomenthonu, isopulegolu a piperitonu byla v mnoha případech hlášena hepatotoxicita, která pravděpodobně souvisí s isopropylidenovou dvojnou vazbou nebo ketoskupinou ve struktuře. Při jejich redukci se hepatotoxicita těchto monoterpenů snížila. Ačkoliv v současné době nejsou pro většinu bylin hepatotoxické mechanismy objasněny, studie ukazuje spojitost mezi některými chemickými vazbami nebo skupinami. Toxicitu látek lze zmírnit nebo zcela eliminovat úpravou struktury, změnou lékové formy nebo kombinací s jinými bylinami (He et al. 2019). Na druhé straně Zheng et al. (1992) ve své práci popisuje schopnost *D*-karvonu zvýšit aktivitu glutathion-*S*-transferasy v játrech, tenkém a tlustém střevě a předžaludku myši. Protinádorová aktivita terpenů zřejmě souvisí se schopností indukovat aktivitu detoxikačních enzymů. Sloučeniny karvonu by tak mohly být potenciálními chemoprotektivními látkami. V našem experimentu docházelo k mírné indukci enzymu GST vlivem *D*-karvonu u čtyř ze šesti studovaných pacientů (kapitola 5.4).

Ve své diplomové práci jsem nejprve hodnotila vliv pěti monocyklických monoterpenů ve výsledné koncentraci 100 μM na aktivitu detoxikačních enzymů v lidském jaterním cytosolu. Studované monoterpeny nejvíce ovlivňovaly enzym glutathion-*S*-transferasu a nejaktivněji se projevil piperiton. Ukázala se variabilita mezi vzorky, kdy u jednoho pacienta někdy docházelo k nárůstu aktivity a u druhého pacienta k poklesu. Nejméně terpeny ovlivňovaly vzorek číslo 37, kdy docházelo u všech enzymů

k nejmenším změnám aktivity. Což můžeme přisoudit nejnižšímu věku pacienta mezi studovanými. U tohoto pacienta nebyla provedena léčba chemoterapií a jeho medikace zahrnovala pouze insulin. Všechny zmíněné faktory mohly sehrát roli v naměřených výsledcích.

Následně byl hodnocen účinek piperitonu (10 μM a 50 μM) na katalytickou aktivitu a expresi mRNA antioxidantních enzymů v lidských jaterních řezech. Pro experiment byla zvolena metoda kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), mezi jejíž výhody patří vysoká citlivost, detekce průběhu reakce v reálném čase, rychlost analýzy a přesné měření zkoumaného materiálu ve vzorku (Kozera a Rapacz 2013). V PCLS byla zaznamenána nejvýznamnější indukce exprese mRNA GSTP1 a GPx1 vlivem piperitonu (10 μM) a GSTA1 (50 μM). Došlo také k významnému snížení hladin GPx2 a CAT vlivem piperitonu (50 μM). U enzymů GPx4, GR a SOD nebyly zjištěny žádné statisticky významné výsledky. Aktivita GST v lidských PCLS byla zvýšena ve dvou jaterních vzorcích působením piperitonu (50 μM). Druhá zkoušená koncentrace (10 μM) vedla v jednom jaterním vzorku k významnému nárůstu aktivity GST, ale u druhého pacienta k významnému poklesu aktivity.

I přes určité interindividuální rozdíly byla enzymem nejvýznamněji ovlivněným monoterpeny GST. Isoformy tohoto enzymu se podílejí na biotransformaci některých léčiv včetně cytostatik. GSTA1-1 katalyzuje konjugaci metabolitů cyklofosfamidu, zatímco thiotepa je substrátem GSTP (Dirven et al. 1994, Ekhardt et al. 2009). Změny v expresi a aktivitě GST mohou tedy zasáhnout do biotransformace těchto léčiv, která bude v případě zvýšení aktivity GST zvýšená a léčiva budou rychleji inaktivována a jejich účinek může být snížený. Naproti tomu cisplatina je pomocí GSTP konjugována a vzniklý konjugát je dále metabolizován na nefrotoxickou sloučeninu. Zvýšená aktivita GST tak může v případě cisplatinu způsobit zvýšenou bioaktivaci tohoto léčiva s jejím následným toxickým působením (Townsend et al. 2009).

7. ZÁVĚR

Nejprve jsem sledovala vliv (+)-karvonu, (-)-karvonu, (+)-isomenthonu, (-)-isopulegolu a piperitonu na katalytickou aktivitu antioxidantních enzymů v subcelulárních frakcích získaných ze šesti vzorků lidské jaterní tkáně. Subcelulární frakce byly inkubovány s jednotlivými monoterpeny (100 μM) po dobu 30 minut při 37 °C a následně byla stanovena specifická aktivita enzymů GPx, GR, GST a CAT pomocí spektrofotometrických metod. Studované monocyklické monoterpeny ovlivňovaly především aktivitu cytosolické GST a nejaktivněji se projevil monoterpen piperiton. Proto byl vybrán do další části experimentální práce.

V další části práce jsem hodnotila účinek piperitonu (10 μM a 50 μM) na katalytickou aktivitu a expresi mRNA antioxidantních enzymů. Jako model jsem použila lidské ultratenké jaterní řezy získané od tří dobrovolníků, které jsem získala pomocí Krumdieckova tkáňového kráječe (průměr 8 mm, 150-170 μm tloušťky). Po preinkubaci jsem řezy inkubovala ve 12-jamkové destičce, 24 hodin v atmosféře pneumoxidu 85 % $\text{O}_2/5\%$ CO_2 . Pomocí qPCR jsem sledovala vliv piperitonu na expresi mRNA isoform enzymů glutathionreduktasy (GR), glutathionperoxidasy (GPx1, GPx2, GPx4), katalasy (CAT), glutathion-S-transferasy (GSTA1, GSTP1) a superoxiddismutasy (SOD1). V PCLS jsem zaznamenala nejvýznamnější indukci exprese mRNA GSTP1 a GPx1 vlivem piperitonu (10 μM) a GSTA1 (50 μM). Došlo také k významnému snížení hladin GPx2 vlivem piperitonu (50 μM). Aktivita GST v lidských PCLS byla zvýšena ve dvou jaterních vzorcích působením piperitonu (50 μM). Druhá zkoušená koncentrace (10 μM) vedla v jednom jaterním vzorku k významnému nárůstu aktivity GST, zatímco u druhého pacienta k významnému poklesu aktivity.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

α - TTP	α - tocopherol transfer protein
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ACTB	β -aktin
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
cDNA	komplementární (jednořetězcová) deoxyribonukleová kyselina
CDNB	1-chlor-2,4-dinitrobenzen
Ct	threshold cycle
DEPC	diethylpyrokarbonát
DM2	diabetes mellitus 2. typu
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAsa	deoxyribonukleasa
dNTPs	deoxynukleotidy
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
F primer	forward primer
FOLFIRI	kombinace 5-fluorouracilu, leukovorinu a irinotekanu
FOLFOX	kombinace 5-fluorouracilu, leukovorinu a oxaliplatiny
FUFA	kombinace 5-fluorouracilu a leukovorinu
GPP	geranyldifosfát

GPx	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukovaná forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
GST	glutathion-S-transferasa
GSTA	glutathion-S-transferasa α
GSTP	glutathion-S-transferasa π
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
ICHS	ischemická choroba srdeční
IPP	isopentenyldifosfát
mikroRNA	mikro ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NTC	no template control
PCLS	ultratenké jaterní řezy
PIP	piperiton
qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce
R primer	reverse primer
RG	referenční gen
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu

rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
RT-qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí
SD	směrodatná odchylka
SG	SYBR green
SOD	superoxiddismutasa
TG	cílový gen
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
YWHAZ	tyrosin-3-monooxygenasa/tryptofan-5-monooxygenasa aktivační protein ζ

9. POUŽITÁ LITERATURA

- Abbas MA, Oriquat GA, Abbas MM, Al-Najjar BO, Kandil YI (2020) Hypolipidaemic and Insulin Secretagogue Activities of (R)-(-)-Carvone. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 27(6):39-52.
- Ardalan MR, Rafieian-Kopaei M (2013) Is the safety of herbal medicines for kidneys under question? *Journal of Nephroarmacology*. 2(2):11-12.
- Bártíková H, Hanušová V, Skálová L, Ambrož M, Boušová I (2014) Antioxidant, Pro-oxidant and Other Biological Activities of Sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 14(22):2478-2494.
- Bakirezer SD, Yaltirik CK, Kaya AH, Yilmaz SG, Ozdogan S, Billur D, Isbir T (2019) The Evaluation of Glutathione Reductase and Malondialdehyde Levels in Patients With Lumbar Disc Degeneration Disease. *In Vivo*. 33(3):811-814.
- Beránek M (2016) *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 1. vydání, 194 stran. ISBN 978-80-246-3246-9.
- Birden E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*. 5(1):9-19.
- Bonilla M, Denicola A, Novoselov SV, Turanov AA, Protasio A, Izemendi D, Gladyshev VN, Salinas G (2008) Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *Journal of Biological Chemistry*. 283(26):17898-17907.
- Boušová I, Dršata J (2017) *Oxidační stres, antioxidační ochrana* [elektronická skripta]. Poslední revize 10.2018 [cit. 2021-04-28]. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=5616§ion=2>
- Burbott AJ, Hennessey JP, Johnson WC, Loomis WD (1983) Configuration of piperitone from oil of *Mentha piperita*. *Phytochemistry*. 22(10):2227-2230.
- Butcher JD, Laubscher CHP, Coetzee JC (2017) A Study of Oxygenation Techniques and the Chlorophyll Responses of *Pelargonium tomentosum* Grown in Deep Water Culture Hydroponics. *HortScience*. 52(7):952-957.

- Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. 113:484-490.
- de Carvalho CCCR, da Fonseca MMR (2006) Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*. 95(3):413-422.
- Cooke MS, Evans MD, Mistry N, Lunec J (2002) Role of dietary antioxidants in the prevention of in vivo oxidative DNA damage. *Nutrition Research Reviews*. 15:19-41.
- Demarne FE, van der Walt JJA (1990) *Pelargonium tomentosum*: A potential source of peppermint-scented essential oil. *South African Journal of Plant and Soil*. 7(1):36-39.
- Dewick PM (2009) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Chichester: John Wiley, 3. vydání, 539 s. ISBN 978-0-470-74168-9.
- Dirven HA, van Ommen B, van Bladeren PJ (1994) Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Research*. 54(23):6215-6220.
- Díaz-Maroto MC, Castillo N, Castro-Vázquez L, González-Viñas MA, Pérez-Coello MS (2007) Volatile composition and olfactory profile of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants. *Flavour and Fragrance Journal*. 22:114-118.
- Dvořáková M, Valterová I, Vaněk T (2011) Monoterpeny v rostlinách. *Chemické Listy*. 105(11):839-845.
- Ekhardt C, Doodeman VD, Rodenhuis S, Smits PHM, Beijnen JH, Huitema ADR (2009) Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes (GST, CYP2B6 and CYP3A) affect the pharmacokinetics of thiotepa and tepa. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 67(1):50-60.
- Ekrami M, Emam-Djomeh Z, Ghoreishy SA, Najari Z, Shakoury N (2019) Characterization of a high-performance edible film based on Salep mucilage functionalized with pennyroyal (*Mentha pulegium*). *International Journal of Biological Macromolecules*. 133:529-537.

- Engel W (2001) In Vivo Studies on the Metabolism of the Monoterpenes S-(+)- and R-(-)-Carvone in Humans Using the Metabolism of Ingestion-Related Amounts (MICA) Approach. *Food Chemistry*. 49(8):4069-4075.
- Engin KN (2009) Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*. 15:855-860.
- Evidente A, Kornienko A, Lefranc F, Cimmino A, Dasari R, Evidente M, Mathieu V, Kiss R (2015) Sesterterpenoids with Anticancer Activity. *Current Medicinal Chemistry*. 22(30):3502-3522.
- Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 105:114-121.
- González-Burgos E, Gómez-Serranillos MP (2012) Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry*. 19(31):5319-5341.
- Gordon P, Khojasteh SC (2015) A decades-long investigation of acute metabolism-based hepatotoxicity by herbal constituents: a case study of pennyroyal oil. *Drug Metabolism Reviews*. 47(1):12-20.
- Góth L (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*. 196:143-152.
- de Graaf IAM, Groothuis GMM, Olinga P (2007) Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 3(6):879-898.
- Handy DE, Lubos E, Yang Y, Galbraith JD, Kelly N, Zhang YY, Leopold JA, Loscalzo J (2009) Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *Journal of Biological Chemistry*. 284(18):11913-11921.
- He S, Zhang CH, Zhou P, Zhang X, Ye T, Wang R, Sun G, Sun X (2019) Herb-Induced Liver Injury: Phylogenetic Relationship, Structure-Toxicity Relationship, and Herb-Ingredient Network Analysis. *Molecular Sciences*. 20(15):3633.

- Iraj A, Yazdanpanah S, Alizadeh F, Mirzamohammadi S, Ghasemi Y, Pakshir K, Yang Y, Zomorodian K (2020) Screening the antifungal activities of monoterpenes and their isomers against *Candida* species. *Journal of Applied Microbiology*. 129(6):1541-1551.
- Johnson RJ, Gaucher EA, Sautin YY, Henderson GN, Angerhofer AJ, Benner SA (2008) The Planetary Biology of Ascorbate and Uric acid and their Relationship with the Epidemic of Obesity and Cardiovascular Disease. *Medical Hypotheses*. 71(1):22-31.
- Kalaivani K, Sankaranarayanan CH (2019) Modulatory effect of isopulegol on hepatic key enzymes of glucose metabolism in high-fat diet/ streptozotocin-induced diabetic rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 1-9.
- Ketoh GK, Koumaglo HK, Glitho IA, Huignard J (2006) Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia*. 77:506-510.
- Klouda P (2013) *Základy biochemie*. Ostrava: Pavko, 3. vydání, 220 stran. ISBN 978-80-86369-16-7.
- Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*. 54(4):391-406.
- Linton S, Davies MJ, Dean RT (2001) Protein oxidation and ageing. *Experimental Gerontology*. 36(9):1503-1518.
- Naves YR (1948) Etudes sup les matieres vegktales volatiles LXIW). SUP l'huile essentielle de *Micromeria abyssinica* (Hoehst.) Benth., source de d-isomenthone. *Helvetica Chimica Acta*. 31(3):932-936.
- Nogoceke FP, Barcaro IMR, de Sousa DP, Andreatini R (2016) Antimanic-like effects of (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone in mice. *Neuroscience Letters*. 619:43-48.
- Oakley A (2011) Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*. 43(2):138-151.

- Ojopagogo YA, Adewale IO, Adeyemi JA, Afolayan A (2015) Some novel features of glutathione transferase from juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to lindane-contaminated water. *Perspectives in Sciences*. 4:62-65.
- Olinga P, Schuppan D (2013) Precision-cut liver slices: A tool to model the liver ex vivo. *Journal of Hepatology*. 58(6):1252-1253.
- Palma E, Doornebal EJ, Chokshi S (2019) Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepatology International*. 13(1):51-57.
- Petrovska BB (2012) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*. 6(11):1-5.
- Pláteník J (2009) Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi*. 11(1):30-33.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82(4):513-523.
- Próspero DFA, Filho ACR, Piauilino CA, Lopes EM, de Sousa DP, de Castro Almeida FR (2018) Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and L-arginine/NO/cGMP pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 293:55-60.
- Racek J (2003) *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Praha: Galén, 1. vydání, 90 stran. ISBN 80-7262-231-5.
- Raina VK, Srivastava SK, Aggarwal KK, Ramesh S, Kumar S (2001) Essential oil composition of *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves from Little Andaman, India. *Flavour and Fragrance Journal*. 16:374-376.
- Rao BRR, Kaul PN, Syamasundar KV, Ramesh S (2003) Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Flavour and Fragrance Journal*. 18:133-135.
- Roy DN (2019) *Terpenoids against human diseases*. Boca Raton: CRC Press, 1. vydání, 252 s. ISBN 978-0-8153-7066-6.
- Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J (2008) Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65(19):2979-2999.

- Sell CHS (2003) A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry. Cambridge,UK: The Royal Society of Chemistry, 410 stran. ISBN 0-85404-681-X.
- Shahverdi AR, Rafii F, Fazeli MR, Jamalifar H (2004) Enhancement of antimicrobial activity of furazolidone and nitrofurantoin against clinical isolates of Enterobacteriaceae by piperitone. The International Journal of Aromatherapy. 14:77-80.
- Silva MIG, de Aquino Neto MR, Neto PFT, Moura BA, do Amaral JF, de Sousa DP, Vasconcelos SMM, de Sousa FCF (2007) Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 88(2):141-147.
- Skálová L, et al. (2017) Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Praha: Karolinum, 2., upravené a rozšířené vydání, 172 stran. ISBN 9788024637334.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry. 150(1):76-85.
- Souza FVM, da Rocha MB, de Souza DP, Marçal RM (2013) (-)-Carvone: Antispasmodic effect and mode of action. Fitoterapia. 85:20-24.
- Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. Mutation Research. 482:21-26.
- Šadibolová M, Zárýbnický T, Smutný T, Pávek P, Šubrt Z, Matoušková P, Skálová L, Boušová I (2019) Sesquiterpenes Are Agonists of the Pregnane X Receptor but Do Not Induce the Expression of Phase I Drug-Metabolizing Enzymes in the Human Liver. Molecular Sciences. 20(18):4562.
- Štípek S, et al. (2000) Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha: Grada, 1. vydání, 320 stran. ISBN 80-7169-704-4.
- Telci I, Demirtas I, Bayram E, Arabaci O, Kacar O (2010) Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). Industrial Crops and Products. 32:588-592.

- Theis N, Lerdau M (2003) The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal in Plant Sciences*. 164(S3):93-100.
- Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH (2009) Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomedical Pharmacotherapy*. 63(2):79-85.
- Wattenberg LW, Sporn VL, Barany G (1989) Inhibition of Aflatoxin B₁-Induced Carcinogenesis in Mice by Naturally Occurring Organosulfur Compounds and Monoterpenes. *Cancer Research*. 49(10):2689-2692.
- Wojtunik-Kulesza KA, Kasprzak K, Oniszczyk T, Oniszczyk A (2019) Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent. *Chemistry & Biodiversity*. 16(12):e1900434.
- Ye L, Zhang Y (2001) Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. 22(12):1987-1992.
- Zárbynický T, Boušová I, Ambrož M, Skálová L (2018a) Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Archives of Toxicology*. 92(1):1-13.
- Zárbynický T, Matoušková P, Lancošová B, Šubrt Z, Skálová L, Boušová I (2018b) 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*. 19(6):1805.
- Zheng GQ, Kenney PM, Lam LKT (1992) Effects of Carvone Compounds on Glutathione S-Transferase Activity in A/J Mice. *Food Chemistry*. 40:751-755.

Zdroje obrázků

Obr. 1: Isoprene - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure6/034/mfcd00008600.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00008600-large.png>

Obr. 2: (+)-Carvone - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure1/184/mfcd00062997.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00062997-large.png>

Obr. 3: Farnesol - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure0/058/mfcd00002918.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00002918-large.png>

Obr. 4: Retinol - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure3/059/mfcd00001552.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00001552-large.png>

Obr. 5: Ophiobolin A - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml1478?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Insite--caSrpResults_srpRecs_srpModel_ophiobolin--srpRecs3-1>

Obr. 6: Skvalen - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/product1/118/821068_squalene_821068_squalene_all.jpg/_jcr_content/renditions/821068_squalene_821068_squalene_all-large.jpg>

Obr. 7: β -Carotene - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure7/059/mfcd00001556.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00001556-large.png>

Obr. 8: Polyisoprene, cis - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma>>

aldrich/structure9/163/a_____182141.eps/_jcr_content/renditions/a_____182141-large.png>

Obr. 10: (+)-karvon - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure1/184/mfcd00062997.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00062997-large.png>

Obr. 11: Biosyntéza (+)-karvonu - *Queen Mary University of London*. [online]. [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/reaction/terp/carvone.html>>

Obr. 12: (-)-karvon - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure3/067/mfcd00001578.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00001578-large.png>

Obr. 14: (+)-isomenthon - *LGC* [online]. [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <<https://assets.lgcstandards.com/sys-master%2Fimages%2Fh44%2Fhe4%2F10300839067678%2F19.png>>

Obr. 15: (-)-isopulegol - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure4/036/mfcd00134655.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00134655-large.png>

Obr. 16: Piperiton - *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure5/177/mfcd00045532.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00045532-large.png>

Obr. 17: Glutathione Reductase Activity Kit - *StressMarq*. [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <<https://www.stressmarq.com/products/assay-kits/activity-kits/glutathione-reductase-activity-kit-skt-204/?v=3e8d115eb4b3>>

Obr. 19: Bicinchoninic Acid Assay (BCA) - *Mycrobe*. [online]. [cit. 2021-03-06]. Dostupné z: <<https://www.mycrobe.org/blog/2018/6/21/bicinchoninic-acid-assay-bsa>>