

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

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

**Anna Křížová**

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

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2021**

## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala vedoucí diplomové práce doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup při řešení dané práce. Zároveň mé poděkování patří PharmDr. Tomáši Zárybnickému, Ph.D. za pomoc a rady v experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat také všem pracovníkům z katedry biochemických věd, kteří mi jakýmkoliv způsobem pomohli při řešení experimentální práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při studiu. Také bych chtěla poděkovat za finanční podporu grantu GAČR 18-09946S.

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

V Hradci Králové

Anna Křížová

## Obsah

ABSTRAKT.....	5
ABSTRACT.....	6
1. ÚVOD.....	10
2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ.....	11
2.1 Terpenoidy.....	11
2.1.1 Monoterpeny.....	13
2.1.2 Bicyklické monoterpeny.....	14
2.1.2.1 Kafr.....	14
2.1.2.2 Fenchon.....	15
2.1.2.3 Kamfen.....	16
2.1.2.4 Thujon.....	17
2.2 Antioxidační systém.....	19
2.2.1 Antioxidační enzymy.....	21
2.2.1.1 Superoxiddismutasa.....	21
2.2.1.2 Katalasa.....	23
2.2.1.3 Glutathionperoxidasa.....	24
2.2.1.4 Glutathion-S-transferasa.....	25
2.2.1.5 Glutathionreduktasa.....	27
2.2.2 Neenzymové antioxidanty.....	28
2.2.2.1 Vysokomolekulární endogenní antioxidanty.....	28
2.2.2.2 Nízkomolekulární endogenní antioxidanty.....	31
2.2.2.3 Antioxidanty v potravě.....	33
3. CÍL PRÁCE.....	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
4.1 Chemikálie, přístroje, biologický materiál.....	38
4.1.1 Chemikálie.....	38

4.1.2	Přístroje.....	39
4.1.3	Biologický materiál .....	40
4.2	Příprava základních roztoků .....	42
4.3	Příprava zásobních roztoků jednotlivých monoterpenů.....	42
4.4	Příprava subcelulárních frakcí z jaterní tkáně.....	42
4.4.1	Postup .....	43
4.5	Příprava inkubačních směsí .....	44
4.5.1	Ředění cytosolu .....	44
4.5.2	Přidání inhibitorů.....	44
4.5.3	Příprava slepých vzorků .....	44
4.6	Stanovení koncentrace bílkoviny metodou BCA.....	44
4.6.1	Princip.....	44
4.6.2	Kalibrační křivka .....	45
4.6.3	Postup .....	46
4.7	Stanovení aktivity glutathionreduktasy .....	46
4.7.1	Příprava zásobních roztoků .....	47
4.7.2	Postup .....	47
4.7.3	Vyhodnocení.....	48
4.8	Stanovení aktivity glutathionperoxidasy .....	48
4.8.1	Příprava zásobních roztoků .....	49
4.8.2	Postup .....	50
4.8.3	Vyhodnocení.....	50
4.9	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy.....	51
4.9.1	Příprava zásobních roztoků .....	51
4.9.2	Postup .....	52
4.9.3	Vyhodnocení.....	52
4.10	Stanovení aktivity katalasy – metoda s molybdenanem amonným ....	53

4.10.1	Příprava zásobních roztoků .....	53
4.10.2	Postup .....	54
4.10.3	Vyhodnocení.....	55
4.11	Příprava ultratenkých jaterních řezů .....	55
4.11.1	Příprava Krebsova–Henseleitova pufru.....	55
4.11.2	Příprava kultivačního Williamsova media E s <i>L</i> –glutaminem.....	56
4.11.3	Postup .....	56
4.11.4	Preinkubace a inkubace ultratenkých řezů .....	56
4.11.5	Odběr vzorku .....	57
4.11.6	Příprava homogenátu a stanovení aktivity GST .....	57
4.12	Stanovení genové exprese.....	57
4.12.1	Izolace RNA Trizolem .....	57
4.12.1.1	Příprava DEPC H <sub>2</sub> O .....	58
4.12.1.2	Postup .....	58
4.12.2	Měření koncentrace a čistoty RNA .....	59
4.12.3	Ošetření DNAsou .....	59
4.12.3.1	Zásobní roztoky .....	59
4.12.3.2	Postup .....	60
4.12.4	Reverzní transkripce.....	60
4.12.4.1	Reagencie .....	60
4.12.4.2	Postup .....	61
4.12.5	Kvantitativní PCR v reálném čase.....	62
4.12.5.1	Reagencie .....	62
4.12.5.2	Postup .....	62
4.13	Statistické zpracování výsledků.....	63
5.	VÝSLEDKY .....	65

5.1	Vliv monoterpenů na aktivitu antioxidantních enzymů v lidském jaterním cytosolu .....	65
5.1.1	Vliv monoterpenů na aktivitu glutathionreduktasy .....	67
5.1.2	Vliv monoterpenů na aktivitu glutathionperoxidasy .....	68
5.1.3	Vliv monoterpenů na aktivitu glutathion-S-transferasy .....	69
5.1.4	Vliv monoterpenů na aktivitu katalasy.....	71
5.1.5	Závěr.....	71
5.2	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na aktivitu GST a expresi mRNA antioxidantních enzymů v ultratenkých lidských jaterních řezech .....	72
5.2.1	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na enzymovou aktivitu GST v PCLS .....	73
5.2.2	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GSTA1 v PCLS .....	74
5.2.3	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GSTP1 v PCLS.....	75
5.2.4	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GPx1 v PCLS .....	76
5.2.5	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GPx2 v PCLS .....	77
5.2.6	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GPx4 v PCLS .....	78
5.2.7	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GR v PCLS.....	79
5.2.8	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi CAT v PCLS.....	80
5.2.9	Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi SOD v PCLS.....	81
6.	DISKUSE .....	82
7.	ZÁVĚR .....	86
8.	POUŽITÉ ZKRATKY .....	87
10.	POUŽITÁ LITERATURA.....	90
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....	98

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických věd**

Uchazečka: Anna Křížová

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

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

Monoterpeny jsou sekundární metabolity rostlin, které jsou díky své vůni a chuti využívány jako dochucovadla či aromata v potravinářství. Nenahraditelnou roli představují i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Jedná se o látky s širokým spektrem biologické aktivity. Vykazují například antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidantní, hypotenzní a analgetické účinky. Kromě pozitivních účinků těchto látek jsou známy i případy jejich toxického působení v různých orgánech, zejména v játrech. Monoterpeny mají také vliv na aktivitu a expresi antioxidantních enzymů. Cílem této práce bylo zjistit, jaký je vliv pěti vybraných bicyklických monoterpenů, (+)-kafru, (-)-kafru, (-)-fenchonu, kamfenu a (-)- $\alpha$ -thujonu, na aktivitu a expresi antioxidantních enzymů. Z těchto enzymů byly studovány glutathion-S-transferasa (GST), glutathionperoxidasa (GPx), glutathionreduktasa (GR), superoxiddismutasa (SOD) a katalasa (CAT). Nejprve byl hodnocen účinek monoterpenů v koncentraci 100  $\mu$ M na aktivitu antioxidantních enzymů v subcelulárních frakcích získaných z lidských jater. Katalytická aktivita enzymů byla stanovena pomocí spektrofotometrických metod. Z vybraných monoterpenů největší účinek na aktivitu vykazoval (-)- $\alpha$ -thujon. Účinek tohoto monoterpenu na aktivitu GST a expresi mRNA osmi hlavních isoform antioxidantních enzymů (GSTA1, GSTP1, GPx1, GPx2, GPx4, GR, CAT, SOD) byl dále sledován v ultratenkých lidských jaterních řezech. Jaterní řezy byly inkubovány 24 hodin s (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentraci 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M. (-)- $\alpha$ -Thujon 10 i 50  $\mu$ M signifikantně zvýšil aktivitu GST v jednom vzorku. Dále zvýšil expresi mRNA GSTA1 (50  $\mu$ M), GSTP1 a GPx2 (10  $\mu$ M) rovněž v jednom vzorku. V účinku monoterpenů na aktivitu i expresi mRNA jednotlivých antioxidantních enzymů byly mezi jednotlivými jaterními vzorky pozorovány rozdíly.



# ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

Candidate: Anna Křížová

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

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

Monoterpenes are plant secondary metabolites, which are used as flavourings or aromas in the food industry due to their smell and flavour. They also play an irreplaceable role in the cosmetic and pharmaceutical industry. Monoterpenes are substances with a wide spectrum of biological activities. They exert, for example, antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, hypotensive, and analgesic effects. In addition to the positive effects of these substances, some cases of their toxic effects in various organs were also observed, mostly in the liver. Monoterpenes also affect the activity and expression of antioxidant enzymes. The aim of this thesis was to determine the effect of five selected bicyclic monoterpenes, (+)-camphor, (-)-camphor, (-)-fenchone, camphene, and (-)- $\alpha$ -thujone, on the activity and expression of antioxidant enzymes. Of those enzymes, glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) were studied. At first, the effect of monoterpenes at a 100  $\mu$ M concentration on the activity of antioxidant enzymes in subcellular fractions obtained from the human liver was evaluated. The catalytic activities of enzymes were assessed by spectrophotometric methods. Among studied monoterpenes, (-)- $\alpha$ -thujone showed the greatest effect on the activity. The effect of this monoterpene on the GST activity and mRNA expression of eight main isoforms of antioxidant enzymes (GSTA1, GSTP1, GPx1, GPx2, GPx4, GR, CAT, SOD) was further monitored in precision-cut liver slices. Liver slices were incubated with (-)- $\alpha$ -thujone at a concentration of 10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M for 24 hours. The (-)- $\alpha$ -thujone 10 and 50  $\mu$ M significantly increased GST activity in one liver sample. It further increased mRNA expression of GSTA1 (50  $\mu$ M), GSTP1, and GPx2 (10  $\mu$ M) also in one liver sample. In the effect of monoterpenes on the activity and mRNA expression of individual antioxidant enzymes, differences were observed between individual liver samples.

# 1. ÚVOD

Přírodní produkty s antioxidačními účinky se stále více používají k léčbě různých patologických stavů, s ohledem na úlohu oxidačního stresu v jejich patogenezi. Oxidační stres je jednou z rozhodujících příčin při vyvolání mnoha chronických a degenerativních onemocnění, jmenovitě kardiovaskulárních onemocnění, diabetu mellitu, revmatických onemocnění, cerebrovaskulárních onemocnění, rakoviny a dalších. Zájem o přírodní antioxidanty se proto značně zvýšil, kvůli jejich příznivým účinkům v prevenci a snižování rizik těchto onemocnění (Rašković et al. 2014, Bora a Sharma 2011).

Kromě pozitivních účinků přírodních látek jsou známy i případy jejich toxického působení, které může organismus poškodit. Mezi přírodní látky, u nichž bylo zaznamenáno toxické působení, patří i terpeny, kterými jsem se zabývala v experimentální části své diplomové práce. Příkladem mohou být otravy dětí po náhodném požití kafru, které vyvolávají závažnou neurotoxicitu s tonicko-klonickými křečemi a často končí smrtí. Rovněž u thujonu byly popsány otravy provázené závažnou neurotoxicitou, hepatotoxicitou a renální toxicitou (Zárybnický et al. 2018).

Cílem této diplomové práce bylo zjistit účinek vybraných bicyklických monoterpenů na aktivitu a expresi antioxidačních enzymů v lidských játrech. Z monoterpenů byly studovány (+)-kafr, (-)-kafr, (-)-fenchon, kamfen a (-)- $\alpha$ -thujon. Vliv monoterpenů na enzymovou aktivitu byl studován v lidském jaterním cytosolu a také v ultratenkých lidských jaterních řezech. Ve druhém modelu jsem sledovala i vliv monoterpenů na expresi mRNA hlavních antioxidačních enzymů.

## 2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

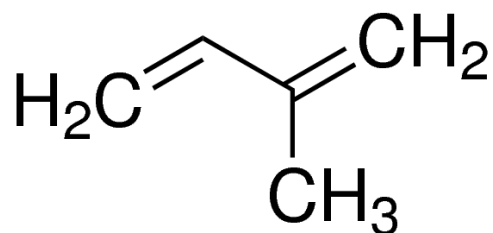
### 2.1 Terpenoidy

Rostlinné potraviny obsahují tisíce primárních a sekundárních metabolitů, které se díky své nízkomolekulární lipofilní povaze vstřebávají do těla. Tyto složky obsažené v rostlinách, lze rozdělit do několika skupin, a to na alkaloidy, flavonoidy, isoflavony, fytoosteroly nebo terpenoidy. Terpenoidy prokázaly farmakologickou aktivitu v prevenci rakoviny i zánětlivých onemocnění (Calleja et al. 2013).

Spolu s alkaloidy a flavonoidy představují terpenoidy rostlinné sekundární metabolity. Terpenoidy zahrnují více než 40 000 struktur a tvoří největší třídu všech známých rostlinných metabolitů. Díky svým různorodým biologickým aktivitám, chemickým a fyzikálním vlastnostem byly využívány lidmi od starověku. Jsou nezbytné pro růst, vývoj i obecný metabolismus rostlin. Mezi jejich fyziologické, metabolické a strukturální role patří mimo jiné i role pigmentů pro sběr světla ve fotosyntéze a přitahování hmyzu k opylování. Jsou používány jako léčiva, ochucovadla, vůně, sladidla, doplňky stravy nebo pesticidy. Terpenoidy jsou hlavní součástí přírodních silic (Bohlmann et al. 2008).

Jedná se o chemicky velmi rozmanitou skupinu, mohou být lipofilní, hydrofilní, těkavé nebo netěkavé, cyklické nebo acyklické, chirální nebo achirální. Chemická rozmanitost rostlinných terpenoidů pochází z často velmi složitých biosyntetických drah (Bohlmann et al. 2008).

Jsou tvořeny z pětiuhlíkatých isoprenových jednotek (2-methylbuta-1,3-dien). Isopren je charakterizován jako produkt rozkladu přírodních cyklických uhlovodíků a tvoří základní stavební kostru pro tyto sloučeniny (Obr. 1). Tyto sloučeniny mohou být rozděleny na uhlovodíky (limonen), alkoholy (menthol, fytol), aldehydy (citrál), ketony (karvon), kyseliny a estery (geranylacetát) (Calleja et al. 2013, Harborne et al. 1991).

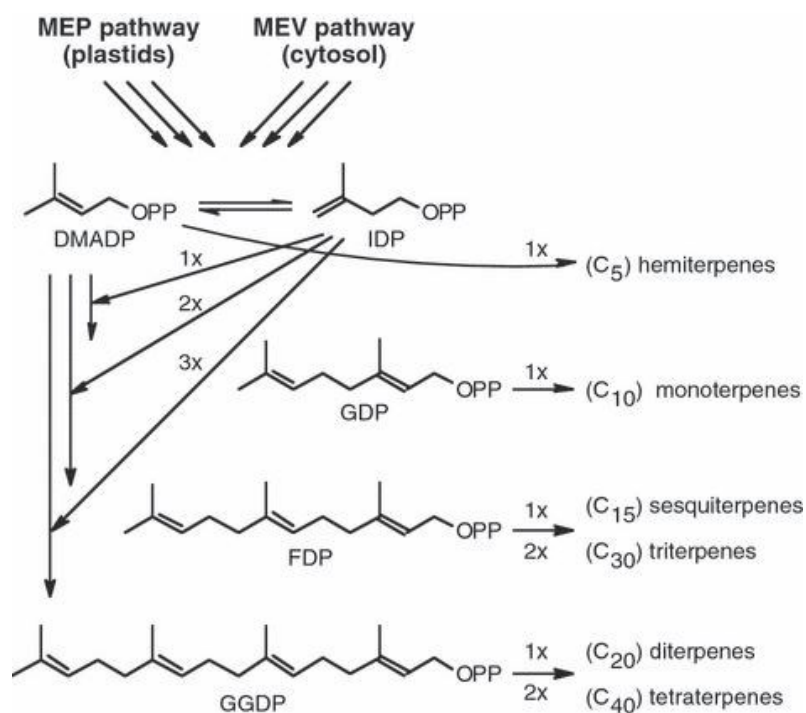


Obrázek 1.: Isopren (převzato z Sigma-Aldrich 2021).

Různé metabolické dráhy rostlinných terpenoidů jsou založeny na tvorbě pouze dvou izomerních prekurzorů dimethylallyldifosfátu (DMADP) a isopentenyldifosfátu (IDP). DMADP a IDP se tvoří v dráze kyseliny mevalonové (MEV) a v dráze 2C-methyl-D-erythritol-4-fosfátu (MEP). Nejmenší rostlinné terpenoidy hemiterpenoidy (C<sub>5</sub>) mohou být tvořené přímo z DMADP aktivitou terpenové synthasy (TPS). Alternativně se spojením dvou, tří nebo čtyř jednotek hemiterpenoidů pomocí prenyltransferas (PT) získá geranyldifosfát (GDP, C<sub>10</sub>), farnesyldifosfát (FDP, C<sub>15</sub>) a geranylgeranyldifosfát (GGDP, C<sub>20</sub>). GDP, FDP, a GGDP slouží jako prekurzory monoterpenů (C<sub>10</sub>), seskviterpenů (C<sub>15</sub>) a diterpenů (C<sub>20</sub>). Párová kondenzace FDP a GGDP vede ke vzniku tříd triterpenů (C<sub>30</sub>) a tetraterpenů (C<sub>40</sub>) respektive polyterpenů. Polyterpeny, tj. terpenoidy s větším počtem isoprenových jednotek (C > 40), řadíme spolu s tetraterpeny mezi tzv. vyšší terpenoidy (Bohlmann et al. 2008).

Isoprenové jednotky se spojují způsobem hlava – hlava, hlava – pata nebo pata – pata (Klouda 2005). Kromě běžných terpenoidů se v rostlinách tvoří velké množství nepravidelných terpenoidů, derivátů terpenoidů a také terpenové konjugáty. Terpenoidy jsou velmi rozmanitou skupinou, a to především díky řadě funkčních skupin připojených k základní kostře (Bohlmann et al. 2008).

Syntéza rostlinných terpenoidů je znázorněna na Obr. 2.



Obrázek 2.: Syntéza terpenoidů (převzato z Bohlmann et al. 2008).

V další části se podrobněji věnuji bicyklickým monoterpenům, jelikož jsem se v experimentální části práce zaměřila právě na tuto skupinu sloučenin.

### 2.1.1 Monoterpeny

V rostlinných zdrojích bylo identifikováno více než 1 000 monoterpenů. Monoterpeny jsou látky přítomné jako složky silic a obranných oleoresinů aromatických rostlin. Jsou používány v parfumerii, potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Velmi bohatým zdrojem monoterpenů jsou pryskyřice v jehličnanech, kde mají ochrannou funkci před škůdci (Salminen et al. 2008, Dewick 2002, Mahmoud a Croteau 2002, Zulak a Bohlmann 2010).

V rostlinách se tyto látky obvykle nacházejí v sekrečních kanálech, dutinách, žlázových trichomech nebo speciálních olejových buňkách a obvykle jsou syntetizovány v epitelálních buňkách lemujících tyto struktury (Seigler 1998).

Jsou tvořené ze dvou isoprenových jednotek a mohou se vyskytovat ve formě acyklické, monocyklické nebo bicyklické. Právě díky cyklizačním reakcím je množství nalezených monoterpenů tak značné. V přírodě se většina monoterpenů vyskytuje ve formě terpenových derivátů, které lze modifikovat oxidací, methyloací nebo glykosylací. Dále můžeme monoterpeny charakterizovat jako formy uhlovodíků, alkoholů, aldehydů nebo esterů, zejména acetátů (Salminen et al. 2008, Dewick 2002).

Monoterpeny vynikají svými farmakologickými vlastnostmi, zejména antimikrobiálními, protizánětlivými, antioxidačními, hypotenzními a analgetickými (Zielińska-Błajet a Feder-Kubis 2020).

Mezi monoterpeny řadíme například geraniol, což je vonný terpen obsažený v eukalyptovém a růžovém oleji, citral, který vzniká mírnou oxidací geraniolu a nachází se v pomerančové silici. Dále myrcen, který je obsažen ve vavřínové silici, limonen obsažený v kůře citrusových plodů a kmínové silici, menthol a karvon, jež jsou obsaženy v máté peprné. Znamé jsou také pineny, které jsou bicyklickými monoterpeny a jsou obsaženy v terpentýnovém oleji, nejvíce jich obsahuje kůra borovice. Dále pak i bornan, borneol a kafir, který vyniká katalytickou dehydrogenací borneolu (Klouda 2005).

Studie Cikoše et al. (2019) uvádí, že při hledání nových léčiv a testování sloučenin vyskytujících se v mořském prostředí vykazaly mořské řasy produkci sloučenin, které

mají antibakteriální, protizánětlivé, protinádorové, antioxidační a další účinky. Prokázal se u nich obsah monoterpenů a během posledních desetiletí byli hlášeni noví mořští zástupci.

## 2.1.2 Bicyklické monoterpeny

### 2.1.2.1 Kafr

Kafr je bicyklický monoterpen se systematickým názvem 1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-on (Obr. 3). Kafr se v přírodě vyskytuje v pravotočivé i levotočivé formě. Pravotočivá forma (+)-kafr byl jedním z prvních rostlinných metabolitů izolovaných v chemicky čisté formě. V dnešní době se získává destilací dřeva kastrovníku lékařského (*Cinnamomum camphora*, Lauraceae) nebo chemickou transformací jiných přírodních produktů, jako například terpentýnů. Levotočivá forma (-)-kafr existuje pouze v syntetické formě nebo ve velmi malém množství u konkrétních druhů rostlin, například u rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae), šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*, Lamiaceae), bazalky pravé (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae) a mrkve obecné (*Daucus carota*, Apiaceae) (Zielińska-Błajet a Feder-Kubis 2020).

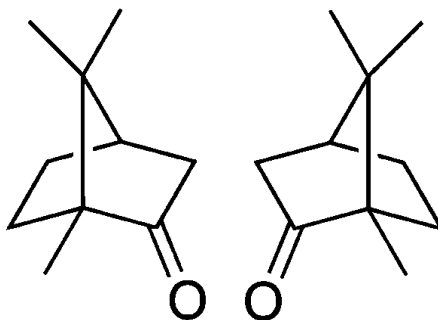
Kafr byl široce používán jako vůně v kosmetice a parfémeh, dochucovadlo potravin a v domácích čistících prostředcích. Má ale mnoho biologických aktivit, a to insekticidní, analgetické účinky k léčbě menších bolestí svalů, antimikrobiální, antivirové, antikokcidické, antitusické a protirakovinné. Iminy založené na přírodním (+)-kafru se ukázaly jako slibný zdroj antimikrobiálních a antivirových látek, kdy série prací zaměřených na téma iminových derivátů na bázi kafru poukazuje na velmi účinnou inhibiční aktivitu vůči virům chřipky A (H1N1) (Zielińska-Błajet a Feder-Kubis 2020, Chen et al. 2013).

Ve studii Fu et al. (2015) zaměřené na zkoumání chemického složení a insekticidní aktivity silic, respektive silice z *Cinnamomum camphora*, byl zjištěn silný fumigační efekt. Silice byly extrahovány metodou parní destilace. Výsledky tedy ukazují, že kafr lze považovat za přírodní zdroj ochrany proti hmyzu.

Další ze studií byla zaměřena na antioxidační efekt rozmarýnu, který je používán jako antioxidační látka v potravinářství, nicméně cílem této studie bylo vyhodnotit účinek

silice na poškození jater vyvolané tetrachlormethanem. Antioxidační aktivita byla stanovena *in vitro* za použití DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) testu. Výsledky ukazují, že silice s obsahem kafru vykazuje antioxidační aktivitu (vychytávání volných radikálů) a zprostředkovává hepatoprotektivní účinky také prostřednictvím aktivace fyziologických obraných mechanismů (Rašković et al. 2014).

Kafr je také využíván jako plastifikátor při výrobě celulóidu (Klouda 2005).



Obrázek 3.: Chemická struktura (+)-kafru a (-)-kafru (převzato z Wikipedia).

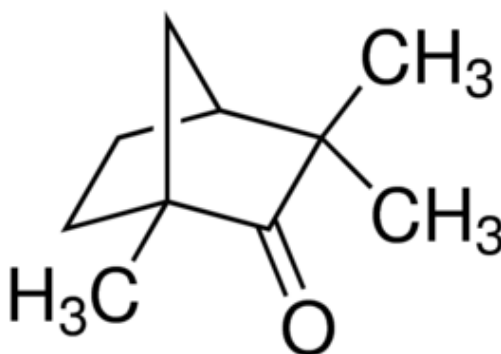
### 2.1.2.2 Fenchon

Fenchon je bicyklický monoterpen se systematickým názvem (*1R*)-1,3,3-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-on (Obr. 4), nacházející se v silicích rostlinných druhů jako jsou zerav západní (*Thuja occidentalis*, Cupressaceae), fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*, Apiaceae) a boldovník vonný (*Peumus boldus*, Monimiaceae). Skládá se ze dvou enantiomerů (+)-fenchon a (-)-fenchon. Fenykl je aromatická bylina používaná již od starověku v Evropě a Malé Asii, jako aromatická přísada do potravinářských výrobků. Dále pak přísada v alkoholických likérech a používá se jako složka v kosmetických a farmaceutických přípravcích. Farmakologické studie uvádějí jeho dyspeptické účinky, protizánětlivou, diuretickou, hepatoprotektivní, protiplísňovou, antinociceptivní a antioxidační aktivitu (Him et al. 2008, Pessoa et al. 2020).

Pessoa et al. (2020) ve své studii prokázali antidiarrhoické účinky fenchonu, kde vykázal aktivitu s významným poklesem evakuačního indexu. K hodnocení bylo využito modelu průjmu vyvolaného ricinovým olejem. Fenchon vykázal také antifungální aktivitu, jelikož v provedených studiích inhiboval růst kmenů hub s minimální koncentrací fungicidinu 32 µg/ml.

Dále byla prokázána u silice fenyklu antimikrobiální aktivita proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím. Jako referenční materiál byl použit ampicilin (Shahat et al. 2011). Tyto údaje o antibakteriálních účincích se shodují se studií Lo Cantore et al. (2004), kteří též uvádějí, že fenyklová silice vykazuje významnou antibakteriální aktivitu, která byla stanovena metodou difuze v agaru (diskový difuzní test).

Také byly sledovány rozdíly mezi silicemi z plodů tří ekologicky pěstovaných kultivarů fenyklu z hlediska jejich antimikrobiálních a antioxidačních účinků. Na základě této studie bylo prokázáno, že fenyklová silice obsahující fenchon vykazuje schopnost působit jako inhibitor volných radikálů a také jako primární antioxidant, který reaguje s volnými radikály (Shahat et al. 2011).



Obrázek 4.: Chemická struktura (-)-fenchonu (převzato z Sigma-Aldrich 2021).

### 2.1.2.3 Kamfen

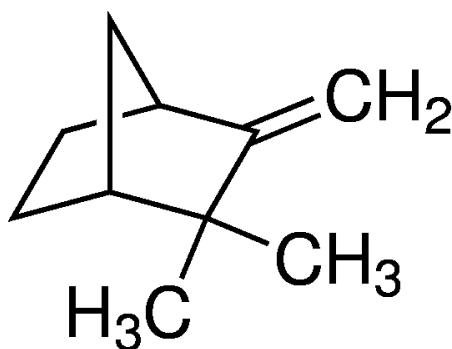
Kamfen (2,2-dimethyl-3-methylen-bicyklo[2.2.1]heptan) je bicyklický monotерpen (Obr. 5) a složka silic, včetně terpentýnového oleje, cypřišové, citronelové a zázvorové silice. Je také přítomen v meruňce, mrkvi, skořici, zázvoru, kmínu, muškátovém oříšku, kardamomu, kurkumě, rozmarýnu a borovici. Používá se v parfumerii a jako přísada do potravin k aromatizaci. Farmakologické studie ukázaly, že kamfen má antioxidační, expektorační, protizánětlivé, hypolipidemické a antimikrobiální vlastnosti. Kromě toho může kamfen inhibovat nebo zpomalit růst řady bakterií a mikroskopických hub (Tiwari a Kakkar 2009).

Ve studii Tiwari a Kakkar (2009) byly terpenoidy kamfen a geraniol hodnoceny z hlediska jejich antioxidační aktivity. Referenčním materiálem byl flavonoid kvercetin, který vykazuje velký antioxidační potenciál. Dva testované terpenoidy byly schopny zvýšit odolnost buněk proti oxidačnímu stresu vyvolanému *t*-butylhydroperoxidem.



Dále má kamfen protizánětlivý účinek, jelikož v myších makrofázích došlo k potlačení produkce oxidu dusnatého a exprese součástí signální kaskády transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Konkrétně se jednalo o expresi kinasového komplexu IKK a samotného transkripčního faktoru (Sohee et al. 2014).

Studie zabývající se *in vivo* účinky kamfenu jako ochrany proti jaterní steatóze indukované stravou s vysokým obsahem tuku a inzulinovou rezistencí u myši odhalily nižší ukládání lipidů v játrech (Sohee et al. 2014).



Obrázek 5.: Chemická struktura kamfenu (převzato z Sigma-Aldrich 2021).

#### 2.1.2.4 Thujon

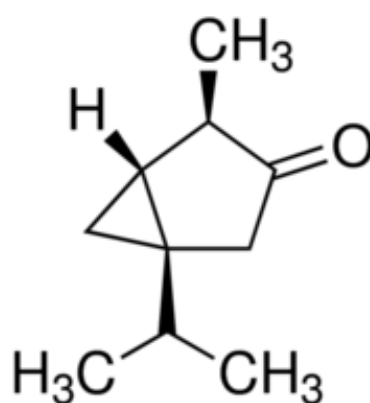
Thujon se v přírodě vyskytuje jako směs  $\alpha$ -thujonu a  $\beta$ -thujonu. (-)- $\alpha$ -Thujon je bicyklický monoterpen se systematickým názvem (1*S*,4*R*)-1-isopropyl-4-methylbicyklo[3.1.0]hexan-3-on (Obr. 6). Je přítomný v poměrně velkém počtu rostlin, a proto je významnou složkou mnoha doplňků stravy a rostlinných léčivých přípravků. Byl považován za neurotoxický, hlavně kvůli proslulosti alkoholického nápoje Absinthu. Absinthový likér byl ve většině evropských zemí zakázán, jelikož byl zneužíván a studie potvrzují, že je  $\alpha$ -thujon modulátorem GABA receptoru typu A. V rámci procesu přizpůsobování právních předpisů EU je absinthový likér opět povolen, pokud je používán dle pokynů a se stanoveným limitním obsahem  $\alpha$ -thujonu. Thujon se vyskytuje například v pelyňku pravém (*Artemisia absinthium*, Asteraceae), šalvěji lékařské (*Salvia officinalis*, Lamiaceae), vratiči obecném (*Tanacetum vulgare*, Asteraceae), zeravu západním (*Thuja occidentalis*, Cupressaceae) a dalších (Pelkonen et al. 2013, Srinivasan et al. 2020).

$\alpha$ -Thujon je považován za hlavní aktivní složku pelyňkové silice a uvádí se, že má antinociceptivní aktivitu a používá se k léčbě gastrointestinálních potíží, jako například

dyspeptických potíží, potíží s játry a žlučníkem. Dále se pelyněk vyznačuje antioxidační, antidiabetickou a insekticidní aktivitou. Thujon obsažený v rostlině *Thuja occidentalis* má navíc antivirové, antibakteriální, protizánětlivé, antiaterosklerotické a hepatoprotektivní účinky (Höld et al. 2000, Lee et al. 2020).

Studie Lee et al. (2021) se zabývala protirakovinnými vlastnostmi  $\alpha$ -thujonu v buňkách lidského karcinomu ovarií a jeho účinkem na senzibilizaci k cisplatině.  $\alpha$ -Thujon inhiboval proliferaci rakovinných buněk ES2 a OV90 a indukoval buněčnou smrt prostřednictvím vnitřní apoptotické dráhy, která je zprostředkována kaspasami. Kromě toho  $\alpha$ -thujon senzibilizoval buňky rakoviny vaječníků na cisplatinu, což způsobilo synergický efekt.

Další studie se zaměřila na vyhodnocení antioxidačního a antiproliferativního potenciálu thujonu izolovaného z listů *Elaeagnus indica* (Elaeagnaceae) a *Memecylon edule* (Melastomataceae). Antioxidační potenciál izolovaných sloučenin byl zkoumán na různých typech volných radikálů (DPPH, oxid dusnatý atd). Při analýze potenciálu vychytávat radikály byly použity různé koncentrace izolovaných sloučenin. Jako referenční molekuly byly použity podobné koncentrace přírodní kyseliny askorbové a syntetické sloučeniny butylhydroxyanisolu (BHA). Thujon vykazoval dobrou až střední aktivitu vychytávání radikálů ve všech metodách v závislosti na koncentraci. Dále pak thujon vykazoval mírný antiproliferativní účinek v buněčné linii U-937 lidských monocytů získaných z histiocytového lymfomu (Srinivasan et al. 2020).



Obrázek 6.: Chemická struktura (-)- $\alpha$ -thujonu (převzato z Sigma-Aldrich 2021).

## 2.2 Antioxidační systém

Organismy během svého života produkují reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), které mají značný fyziologický i patologický význam. Tyto látky pohotově reagují s různými biologickými strukturami, jako jsou mastné kyseliny, lipidy, aminokyseliny, proteiny, mononukleotidy, polynukleotidy, a také s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Avšak za určitých okolností působí toxicky a jako desinformační agens, schopná organismus poškodit či usmrtit (Štípek et al. 2000).

ROS jsou především volné radikály vytvořené z molekuly kyslíku, které obsahují nepárový elektron. Dále mezi ROS řadíme sloučeniny kyslíku, které sice nemají charakter radikálů, ale mohou je poskytovat (Ledvina et al. 2009). Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku redukuje na monoradikál superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) a další elektron redukuje superoxid na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Je-li k dispozici další elektron, dvouatomová molekula peroxidu vodíku se rozpadne na vodu a hydroxylový radikál ( $HO^{\cdot}$ ). Jinou možností pro superoxid je protonizace na hydroperoxylový radikál ( $HO_2^{\cdot}$ ). Excitací elektronů v molekule kyslíku spojenou se změnou spinu jednoho z vnějších elektronů vzniká forma označovaná jako singletový kyslík ( $^1O_2$ ), který představuje velmi reaktivní formu. Reaktivní formy kyslíku jsou velmi nestálé a reaktivní, zvláštností superoxidu je schopnost dismutovat, což znamená vykazovat jak oxidační, tak redukční vlastnosti při vzájemné reakci. Tato reakce probíhá spontánně a v organismu je katalyzována enzymem superoxidodismutasou. Mezi ROS řadíme též kyselinu chlornou ( $HClO$ ), což je silný oxidant (Ledvina et al. 2009, Štípek et al. 2000).

Reaktivní formy kyslíku vznikají v mnoha enzymových i neenzymových reakcích. Nemalá množství volných radikálů vznikají vysokoenergetickým zářením v ovzduší, ze smogu a výfukových plynů nebo cigaretového kouře (Ledvina et al. 2009).

Na organismy působí samy, ale také zprostředkovaně přes druhotně vznikající alkoxylové ( $RO^{\cdot}$ ) a peroxylové ( $ROO^{\cdot}$ ) radikály. Vyvolávají oxidační poškození lipidů (lipoperoxidaci), kde nejcitlivějším místem je fosfolipidová dvojvrstva membrán, oxidační poškození bílkovin a enzymů, zejména napadání SH-skupin. Dále poškozování makromolekul a nízkomolekulárních látek (Ledvina et al. 2009).

Existují také reaktivní formy dusíku a jejich efekt je přirovnáván k reaktivním formám kyslíku. Základní látkou pro vznik RNS představuje arginin. Z guanidinové skupiny argininu se působením NO-synthasy, což je enzym obsahující železo, vytváří citrullin a koncový dusík se transformuje na skupinu látek konvenčně označovanou jako oxid dusíku. Oxid dusnatý a jeho metabolity jsou za určitých okolností prudce jedovatými látkami. Ve vysoké koncentraci oxid dusnatý reaguje s kyslíkem na oxid dusičitý a posléze na dusitan ( $\text{NO}_2^-$ ). Dále do této skupiny řadíme i další sloučeniny, jako nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ), nitrosyl ( $\text{NO}^-$ ) a peroxyinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Reaktivita NO je velmi vysoká a vytváří se nitrosylované sloučeniny (Ledvina et al. 2009).

Reaktivní formy kyslíku a dusíku se v těle neustále generují z vnitřního metabolismu a vnější expozice. V normálních buňkách jsou reaktivní oxidanty produkovány řízeným způsobem a některé slouží užitečným účelům. Reaktivní formy tvořené v reakci na fyziologické podněty fungují jako důležité signální molekuly v regulaci takových procesů, jako je dělení buněk, zánět, imunitní funkce, autofagie a stresová reakce. Naopak nekontrolovaná produkce oxidantů vede k oxidačnímu stresu, který zhoršuje buněčné funkce a přispívá k rozvoji rakoviny, chronických onemocnění a toxicity (Ma 2013).

Aby se tělo bránilo oxidačnímu stresu z přemíry volných radikálů, disponuje řadou ochranných systémů. Mají charakter enzymů, ale i neenzymových faktorů. Mezi enzymové způsoby ochrany těla patří superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa, některé isofomy glutathion-S-transferasy, katalasa a peroxidasy. Mezi neenzymové způsoby ochrany patří tokoferol (vitamin E), askorbát (vitamin C),  $\beta$ -karoten, koenzym Q, bioflavonoidy a další (Ledvina et al. 2009).

Studie Lintona et al. (2001) prezentuje, že aktivita klíčových antioxidačních enzymů se může s přibývajícím věkem snižovat. U antioxidantů neenzymového typu se zdá, že se s věkem aktivita nemění.

Dle Halliwella a Gutteridge (2015) mohou být obecné zásady antioxidační obranné strategie organismu rozděleny do následujících skupin:

- a) látky, které katalyticky odstraňují volné radikály, jako je superoxiddismutasa a katalasa;
- b) látky, které regulují tvorbu volných radikálů, např. odpojením proteinů nebo seskupením nosičů elektronů do komplexů, které brání úniku elektronů do  $\text{O}_2$ .

- Tato kategorie zahrnuje proteiny, které minimalizují dostupnost takových prooxidantů, jako jsou ionty železa, ionty mědi nebo hem. Příkladem jsou transferiny, albumin, haptoglobiny, hemopexin, hemoxygenasy a metalothionein;
- c) látky, které chrání molekuly před oxidačním poškozením jinými mechanismy. Příkladem jsou chaperony, proteiny obalující DNA nebo enzymy, které určují hladiny polynenasycených mastných kyselin v mitochondriálních membránách;
  - d) zhaščeče reaktivních forem, např. singletového kyslíku, jako jsou karotenoidy;
  - e) nahrazení molekul citlivých na oxidační poškození molekulami, které jsou rezistentní, např. fumarasa C z *E. Coli*;
  - f) „obětavé“ látky, které přednostně reagují s reaktivními formami a zabraňují jim v útoku na důležitější biomolekuly. Příkladem jsou redukovaný glutathion (GSH),  $\alpha$ -tokoferol, askorbát nebo urát;
  - g) reakce volných radikálů s biomolekulami za vzniku produktů, které jsou cytoprotektivní, např. nitro-mastné kyseliny a některé konečné produkty oxidace lipidů;
  - h) Rozdělení do kompartmentů. Jedním z příkladů je oddělení iontů železa od  $H_2O_2$ . Homogenizace tkáně urychluje oxidační poškození, protože se při ní uvolňují ionty kovů. Druhým příkladem je, že kvasinky a bakterie vystavené  $H_2O_2$ , se mohou přizpůsobit tak, aby přijímaly méně této molekuly.

Úroveň a složení antioxidační obrany se liší tkáň od tkáně, buněčný typ od buněčného typu (možná dokonce od buňky k buňce stejného typu v dané tkáni) a v různých subcelulárních frakcích. Mohou se také lišit v různou denní dobu, např. GSH a peroxiredoxiny. Také extracelulární tekutiny mají odlišné ochranné mechanismy než intracelulární prostředí (Halliwell a Gutteridge 2015).

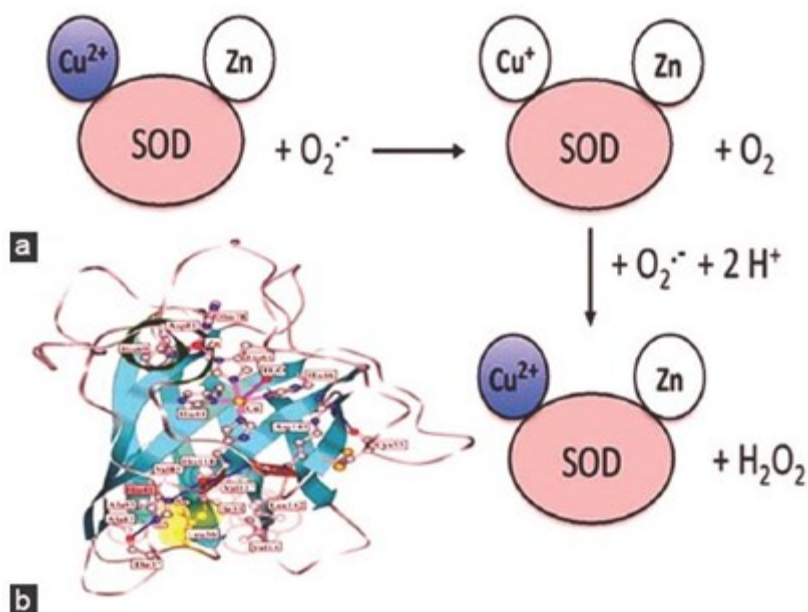
## **2.2.1 Antioxidační enzymy**

### **2.2.1.1 Superoxiddismutasa**

Superoxiddismutasa (SOD) je obsažena v každé buňce. Spontánní dismutace superoxidu na dioxygen a peroxid vodíku je při pH kolem hodnoty 7 velmi rychlá, přesto ji příroda urychlila superoxiddismutasou o další čtyři řády (rychlostní konstanta je pak  $2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Štípek et al. 2000). Rodina enzymů superoxiddismutasy se specializuje na eliminaci radikálů superoxidových aniontů odvozených od extracelulárních

stimulantů, včetně ionizačního záření a oxidačního poškození. Společně s těmi, které jsou primárně produkovány jako vedlejší produkty metabolismu kyslíku prostřednictvím elektronového transportního řetězce. U savců byly identifikovány tři odlišné isoformy SOD, a to: Cu,Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD/Fe-SOD (SOD2) a EC-SOD (extracelulární superoxididmutasa, SOD3). Tyto formy SOD mají podobné funkce, ale liší se charakteristikami jejich proteinových struktur, lokalizací genů na chromosomech, požadavky na kovové kofaktory a nitrobuňčnou lokalizací (Miao et al. 2009). Zdá se pravděpodobné, že střední délka života savčích druhů závisí na poměru aktivity SOD a koncentrace  $O_2$ . Čím vyšší je tento poměr, tím je ochrana před superoxidem lepší a tím delší je průměrná doba života (Ledvina et al. 2009).

Enzym Cu,Zn-SOD se skládá ze dvou identických podjednotek, z nichž každá má molekulovou hmotnost 16 000 Da a v každé je jeden atom mědi a jeden atom zinku. Jedná se o velmi stabilní enzym, který katalyzuje dismutaci při rozmezí pH 4,5 – 9,5. Halliwell a Gutteridge (2015) uvádějí rozmezí pH 5,3 – 9,5 a rychlostní konstantu reakce  $1,5 \times 10^9 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Vyskytuje se v cytosolu a mezimembránovém prostoru mitochondrií. Přenos elektronu z jedné molekuly superoxidu na druhou zajišťuje atom mědi. Cu(II) se redukuje na Cu(I) a poté zase oxiduje. Zn(II) má stabilizační funkci, vlastní katalýzy se neúčastní (Obr. 7). Gen pro tuto SOD se nachází na 21. chromosomu (Štípek et al. 2000).



Obrázek 7.: Mechanismus dismutace superoxidu katalyzované Cu,Zn-SOD a struktura podjednotky hovčezí Cu,Zn-SOD (převzato z Younus 2018).

Mn-SOD a Fe-SOD patří vývojově a strukturně do druhé rodiny superoxididismutas a vyskytují se u prokaryot jako dimery. Mn-SOD je enzymem mitochondriální matrix (tetramerní forma) a Fe-SOD nebyla v živočišných buňkách nalezena. Oba tyto enzymy mají dvě až čtyři podjednotky s molekulovou hmotností kolem 20 000 Da, ale nejsou tak stabilní jako Zn,Cu-SOD. Gen pro Mn-SOD byl během vývoje přenesen do jaderné DNA na 6. chromosom. Proenzym má signální úsek, který je přesnou adresou pro přesun vytvořeného proteinu do mitochondrie (Racek 2003, Štípek et al. 2000).

Jako poslední byla objevena živočišná extracelulární SOD. Její molekula má čtyři podjednotky (tetramer) a molekulovou hmotnost 135 000 Da. Dismutaci katalyzuje iont mědi a stabilizuje atom zinku (Štípek et al. 2000). Chrání před oxidačním stresem extracelulární prostor a je vysoce exprimována ve vybraných tkáních, včetně krevních cév, srdce, plic, ledvin a placenty. Na svém karboxylovém konci obsahuje jedinečnou doménu vázající heparin, prostřednictvím které je navázána na extracelulární matrix, kde enzym vycytává superoxid (Nozik-Grayck et al. 2005).

Chybění aktivity SOD má pro postižený organismus závažné následky. U člověka vede deficit Cu,Zn-SOD k těžkému postižení motorických neuronů v mozkové kůře a míše. Mutace genu pro Cu,Zn-SOD se vyskytuje u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou, což je smrtelné onemocnění charakterizované rozpadem motoneuronů. SOD se může podat i jako léčebný přípravek, její intraartikulární aplikace nemocným s revmatoidní artritidou snižuje zánětlivé projevy v kloubu vyvolané nadprodukcí superoxidu. Intravenózní podání SOD pacientům po transplantaci ledviny snížilo reperfúzní poškození štěpu a zlepšilo jeho funkci (Halliwell a Gutteridge 2015, Racek 2003).

### **2.2.1.2 Katalasa**

Katalasa je enzym zabraňující oxidačnímu poškození buněk degradací peroxidu vodíku na vodu a kyslík, a tak vlastně navazuje na činnost superoxididismutasy. Kromě dvouelektronové dismutace peroxidu na dioxygen a vodu může katalyzovat peroxidasové reakce. Katalasa má čtyři tetraedricky uspořádané podjednotky, každá obsahuje jednu prostetickou protoporfyrinovou skupinu s  $Fe^{3+}$  (Goyal a Basak 2010, Štípek et al. 2000). Působí na peroxid vodíku ve vysokých koncentracích. Tím se liší od peroxidas, které působí na nízké koncentrace peroxidu vodíku (Racek 2003). Přestože katalasa není za

normálních podmínek pro některé typy buněk nezbytná, tak hraje důležitou roli při získávání tolerance k oxidačnímu stresu v adaptivní odpovědi buněk (Matés et al. 1999).

V lidském organismu je aktivita katalasy nejvyšší v mitochondriích, peroxisomech hepatocytů a cytoplazmě erytrocytů. Katalasy zahrnují tři typy, a to typické katalasy, katalasy-peroxidasy a pseudokatalasy, též označované jako Mn-katalasy. Typické či monofunkční katalasy, jako například savčí typ katalasy, se obvykle izolují ze zvířat, rostlin, hub nebo bakterií. Typické i bifunkční katalasy-peroxidasy obsahují ve své molekule hem, zatímco pseudokatalasy obsahují atom manganu. Katalasy vykazují široké optimální rozmezí pH hodnot 5–10 (Goyal a Basak 2010, Racek 2003).

Dědičný deficit katalasy je velmi vzácný a není doprovázen závažnými klinickými příznaky. U tzv. japonského typu se deficit projevuje ulcerací v dutině ústní (Racek 2003).

### **2.2.1.3 Glutathionperoxidasa**

Glutathionperoxidasa (GPx) je intracelulární enzym, který redukuje peroxid vodíku na vodu a lipidové peroxidy na jejich odpovídající alkoholy. Tento děj probíhá za účasti koenzymu glutathionu (GSH), zejména v mitochondriích a někdy v cytosolu (Ighodaro a Akinloye 2018). Metabolismus glutathionu, který chrání buňky před oxidačním stresem, je ve skutečnosti jedním z nejdůležitějších antioxidačních obranných mechanismů (Matés et al. 1999).

U člověka bylo popsáno osm isoenzymů GPx, které se liší strukturou, lokalizací, funkcí a závislostí na selenu (Ighodaro a Akinloye 2018). Isoenzymy GPx1, GPx2, GPx3 a GPx6 jsou složeny ze čtyř identických podjednotek, které obsahují vždy jeden selenocysteinový zbytek. Selenocystein je součástí aktivního centra enzymu. Isoforma GPx4 je monomerní enzym obsahující selenocystein. GPx5 je tetramerní protein, zatímco GPx7 a GPx8 jsou monomerní proteiny, u všech tří těchto isoform je v aktivním centru přítomen cysteinový zbytek (Štípek et al. 2000).

Jedním z isoenzymů je GPx1, často nazývaná jako cytosolová GPx, která je přítomná v cytosolu zvířecích buněk a dále v jádře, mitochondriích a peroxisomech (Halliwell a Gutteridge 2015). Cytosolová GPx rozkládá několik typů hydroperoxidů mastných kyselin, které nejprve musí být uvolněny z poškozených lipidů fosfolipasou A<sub>2</sub>. Je aktivní



i v dismutaci  $\text{H}_2\text{O}_2$  a v buňkách spolupracuje s katalasou při odstraňování peroxidu vodíku. Jejím substrátem jsou i 1-monoacylglycerolhydroperoxy (Štípek et al. 2000).

Další typ GPx se nachází v buněčné výstelce gastrointestinálního traktu (GPx2). Střevní GPx2 může sloužit k metabolizaci peroxidů v požitých lipidech potravy. Savčí krevní plazma obsahuje formu GPx nazývanou GPx3. Tato forma se nachází také v extracelulárních tekutinách jako glykoprotein. Je tedy přítomen například v mateřském mléce, spermatu, plodové vodě, komorové vodě v oku a ledvinách (Halliwell a Gutteridge 2015).

Dále GPx4, často nazývaná jako fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidasa (PHGPx), která dokáže redukovat fosfolipidové hydroperoxy a neškodné hydroxyderiváty přímo v membránách bez uvolnění mastných kyselin z lipidů. PHGPx zabraňuje neenzymové peroxidaci lipidů mechanismem, při kterém jsou peroxylové radikály mastných kyselin v membránách nejprve redukovány  $\alpha$ -tokoferolem na odpovídající hydroperoxy a ty jsou poté redukovány enzymem PHGPx za současné oxidace GSH. Znemožní se tak rozklad hydroperoxidů na alkoxylové radikály a odstartování nového řetězce radikálových reakcí v membráně. Předpokládá se, že tímto mechanismem se PHGPx kromě antioxidační ochrany účastní také regulace syntézy prostaglandinů a leukotrienů (Štípek et al. 2000).

GPx5, GPx7 a GPx8 se liší od ostatních glutathionperoxidas tím, že jejich aktivity jsou nezávislé na selenu. To znamená, že tyto formy nemusí být schopné účinně zachytit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , což je vlastnost charakteristická pro GPx závislé na selenu (Ighodaro a Akinloye 2018).

#### **2.2.1.4 Glutathion-S-transferasa**

Glutathion-S-transferasy (GST) jsou rodinou multifunkčních isoenzymů zapojených do buněčné detoxikace řady endogenních a exogenních sloučenin. GST katalyzují nukleofilní atak glutathionu (GSH) na elektrofilní centra substrátů, včetně insekticidů, toxických sloučenin, metabolitů a organických hydroperoxidů. GST hrají klíčovou roli v ochraně proti karcinogenům a různým typům buněčného oxidačního poškození (Kim et al. 2017). Kromě konjugace s GSH také regulují biosyntézu a intracelulární transport hormonů, degradaci tyrosinu, rozpad peroxidu, redukci dehydroaskorbátu a další (Oakley 2011).

GST lze rozdělit do tří odlišných rodin podle lokalizace v buňce, a to na cytosolickou, mikrosomální a mitochondriální. Mezi nimi jsou cytosolické GST největší a nejlépe popsanou rodinou. Mikrosomální GST jsou integrální membránové proteiny, které se účastní syntézy eikosanoidů a katalyzující transferasové a isomerasové reakce závislé na GSH. Také se ukázalo, že mitochondriální GST se nachází v peroxisomech, což naznačuje, že může být zapojena do  $\beta$ -oxidace mastných kyselin prostřednictvím své katalytické aktivity, určité transportní funkce nebo interakce s póry membrány (Boušová a Skálová 2012).

V současné době je identifikováno sedm tříd savčích cytosolických GST, označovaných jako alfa, mí, pí, sigma, zeta, théta a omega. Ostatní třídy cytosolických GST, označované jako beta, delta, epsilon, lambda, ný, tau a fi, byly identifikovány v rostlinách a jiných než savčích druzích organismů. Členové stejné třídy cytosolických GST mají z více než 40 % shodnou aminokyselinovou sekvenci. Mezi třídami je pak sekvenční identita nižší než 25 %. Mitochondriální rodinu GST u lidí představuje jediná třída, a to kappa, která sdílí evoluční vztah s cytosolickými GST. Mitochondriální i cytosolické GST se vyskytují jako dimery s přibližnou molekulovou hmotností 45-55 kDa. Rodina mikrosomálních GST se skládá ze čtyř podskupin, mezi podskupinami je sekvenční shoda v proteinové sekvenci menší než 20 %. Stejně jako mitochondriální a cytosolické GST, několik mikrosomálních GST, např. MGST1, katalyzuje konjugaci GSH s řadou elektrofilních sloučenin. Další členové dále katalyzují reakce biosyntézy leukotrienů a prostaglandinů (Boušová a Skálová 2012, Oakley 2011).

V tkáních dospělých lidí je pozorována různá exprese různých isoformů GST. Například v játrech bylo prokázáno, že isoenzymy třídy alfa (GSTA) v hepatocytech převládají, zatímco zástupci třídy MGST a GSTM jsou přítomny v malém množství. Třída GSTP je exprimována pouze v biliárním epitelu. Expres jednotlivých isoformů GST se v lidských tkáních mění s věkem, přičemž GSTP1 je nejdůležitější v období vývoje plodu (Boušová a Skálová 2012).

Lidské alfa GST (GSTA1 a GSTA2) vykazují také peroxidasovou aktivitu vůči endogenním produktům peroxidace lipidů, jako jsou hydroperoxy mastných kyselin a fosfolipidové hydroperoxy. GSTA1 účinně redukuje kyselinu 13-hydroperoxyoktadekadienovou na odpovídající hydroxyderivát (Boušová a Skálová 2012). Dále bylo prokázáno, že GSTA1, GSTP1 a GSTM1 vykazují aktivitu proti

metabolitům polycyklických aromatických uhlovodíků, což jsou karcinogenní látky obsažené v cigaretovém kouři a jsou rizikovým faktorem pro výskyt rakoviny močového měchýře. Zmíněné isoformy GST prokazují cennou aktivitu právě v oblasti epitelu močového měchýře (Matic et al. 2013). GSTP1 je jedním z nejvíce studovaných členů rodiny GST. Má širokou škálu fyziologických funkcí, zejména podíl na metabolismu, detoxikaci a eliminaci potenciálně genotoxických cizorodých komplexů. Dále se podílí na metabolizaci karcinogenních sloučenin a ochraně buněk před rakovinou. Bylo zjištěno, že léky na bázi platiny jsou metabolizovány GSTP1, což umožňuje expresi GSTP1 v nádorech vaječníků (Cui et al. 2020).

GST hraje hlavní roli v proliferaci a smrti rakovinných buněk prostřednictvím svých cytoprotektivních a regulačních funkcí. Isoenzymy GST také hrají důležitou roli v detoxikaci chemoterapeutik. Mohou být použity k přímé detoxikaci oxidovaných nebo alkylovaných léčiv. Kromě jejich dobře charakterizované katalytické aktivity existují důkazy, že isoenzymy GST se také podílejí na regulaci exprese mitogenem aktivovaných proteinkinás a podporují S-glutathionylaci cysteinových zbytků v cílových proteinech (Cui et al. 2020). Významným faktorem, který ovlivňuje aktivitu GST je genetický polymorfismus. Mutace a delece některých isoform GST (např. GSTT1, GSTM1 a GSTP1) zvyšují pravděpodobnost vzniku některých nádorových onemocnění (Okat 2018).

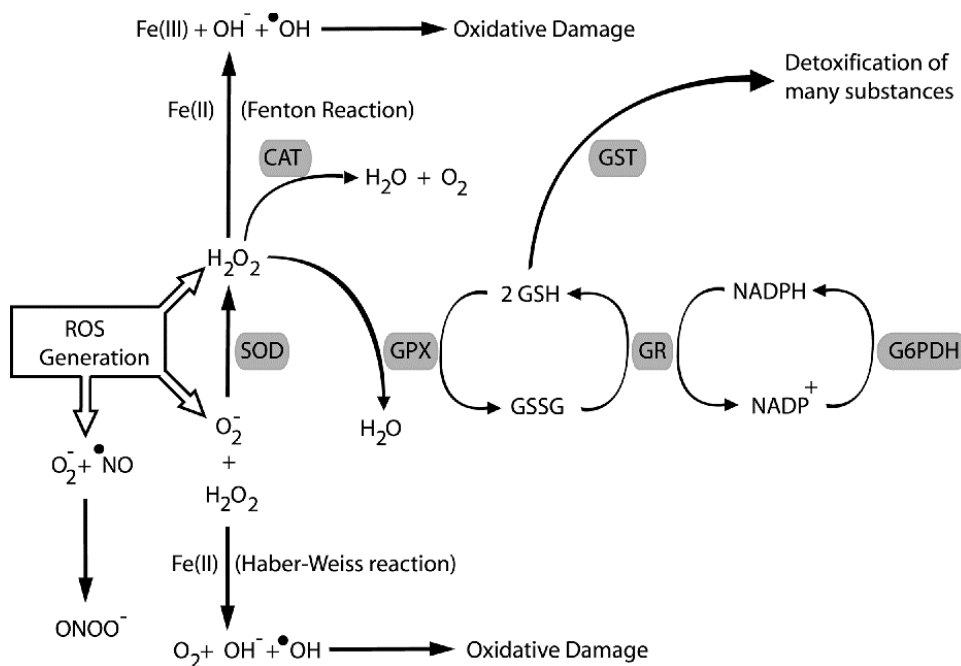
#### **2.2.1.5 Glutathionreduktasa**

Glutathionreduktasa (GR) je základní enzym, který recykluje oxidovaný glutathion (GSSG) zpět do redukované formy (GSH). Živočišné glutathionreduktasy obsahují dvě podjednotky, každá má v aktivním místě flavinadenindinukleotid (FAD). Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) redukuje FAD, který poté předává elektrony na disulfidový můstek v aktivním místě. Takto vytvořené dvě SH-skupiny poté interagují s GSSG a redukují ho na 2GSH (Halliwell a Gutteridge 2015). Glutathionreduktasa je zodpovědná za udržení přísunu redukováného glutathionu dalším detoxikačním enzymům. Ve své redukované formě představuje glutathion klíčovou molekulu v buněčné kontrole reaktivních forem kyslíku (Couto et al. 2016).

V kvasinkách a lidských buňkách jediný gen exprimuje více než jednu formu glutathionreduktasy, určenou pro aktivitu v cytoplazmě nebo pro translokaci do různých organel. U rostlin je situace odlišná, jelikož byly objeveny dva geny (GR1 a GR2), které

kódují glutathionreduktasu. Předpokládá se, že GR2 kóduje isoformu určenou pro transport do chloroplastů a mitochondrií a GR1 kóduje cytosolický protějšek. Nicméně není zcela pochopeno, jak se stejný protein translokuje do chloroplastů i mitochondrií (Couto et al. 2016).

Shrnutí účasti antioxidantních enzymů na odstraňování ROS je na Obr. 8.



Obrázek 8.: Působení hlavních antioxidantních enzymů v ochraně buňky před působením ROS (převzato z Hermes-Lima 2004). G6PDH, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

## 2.2.2 Neenzymové antioxidanty

Neenzymové antioxidanty představují četnou skupinu a dají se rozdělit na tři skupiny: vysokomolekulární endogenní látky (transferin, laktoferin, feritin, haptoglobin, hemopexin, ceruloplazmin, albumin, metalothioneiny, chaperony), nízkomolekulární endogenní antioxidanty (bilirubin, melatonin, kyselina lipoová, kyselina močová, koenzym Q, glutathion) a složky potravy (askorbát, tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy) (Halliwell a Gutteridge 2015, Štípek et al. 2000).

### 2.2.2.1 Vysokomolekulární endogenní antioxidanty

Jedná se o proteiny schopné vázat přechodné kovy, hlavně železo a měď. Přechodné kovy nemají předposlední valenční sféru zcela zaplněnou elektrony a chovají se proto jako radikály a podílejí se na radikálových reakcích. Volné redoxně aktivní ionty

přechodných kovů mohou být extrémně prooxidační, což znamená, že mohou reagovat s peroxidem vodíku a katalyzovat tvorbu reaktivních látek ve Fentonově reakci. Aby se zabránilo jejich účasti ve Fentonově reakci, tak se využívá ochrana buď vazbou železa a mědi v pevném chelátu (v transportním či skladovacím proteinu) nebo oxidace přechodného kovu na vyšší valenci. V tomto smyslu se mezi antioxidanty řadí transferin v plazmě, laktoferin v leukocytech a feritin v kostní dřeni (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018, Racek 2003, Štípek et al. 2000).

### Ceruloplazmin

Ceruloplazmin je vysokomolekulární glykoprotein syntetizovaný v několika orgánech a tkáních, jako jsou mozek nebo játra. Tento protein váže měď, která je podstatná pro ferooxidasovou aktivitu ceruloplazminu, díky které oxiduje dvojmocné železo na trojmocné. Umožňuje tak uvolnění železa z buněk a jeho předání transferinu. Tato vlastnost brání tvorbě hydroxylových radikálů, a proto vykazuje antioxidační aktivitu (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018, Štípek et al. 2000).

### Transferin

Je protein krevní plazmy, který transportuje železo absorbované ze střeva do kostní dřeni, kde se tvoří červené krvinky. Je považován za antioxidant díky své schopnosti snižovat koncentraci volných železnatých iontů, které katalyzují přeměnu  $H_2O_2$  na vysoce toxický hydroxylový radikál během Fentonovy reakce (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018).

### Feritin

Feritin je protein, který slouží jako intracelulární zásobárna železa a může být zdrojem železa pro syntézu enzymů, které ho obsahují, pokud je absorpce z potravy nedostatečná. Tento protein má rovněž ferooxidasovou aktivitu a železo je tak skladováno ve formě  $Fe^{3+}$ . Jedna molekula feritinu dokáže vázat až 4 500 atomů železa. Je schopen minimalizovat tvorbu ROS vazbou volného železa, čímž chrání buňky před poškozením (Dusek et al. 2013, Mirończuk-Chodakowska et al. 2018).

### Laktoferin

Laktoferin je člen skupiny transferinů. Jedná se o glykoprotein přítomný v sekretech epiteliálních buněk, například v mateřském mléce, slzách, slinách, sekretech dýchacích a

pohlavních cest. Antioxidační účinek laktoferinu je výsledkem vazby  $\text{Fe}^{3+}$  iontů (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018).

### Albumin

Albumin je multifunkční protein, který vykazuje řadu fyziologických funkcí. Jeho primární rolí je regulace onkotického tlaku krve a distribuce látek mezi různými tělesnými oddíly. Některé studie považují plazmatický albumin za hlavní extracelulární antioxidant. Vykazuje afinitu k navázání mnoha typů molekul a iontů, hlavně  $\text{Cu(II)}$ , který se peroxidem vodíku oxiduje na  $\text{Cu(III)}$  za současného vzniku hydroxylového radikálu, který poškozuje okolní struktury. Antioxidační vlastnosti albuminu vyplývají také z jeho nepřímého účinku spojeného s vazbou bilirubinu a nenasycených mastných kyselin, což brání jejich oxidaci. Nižší koncentrace albuminu úzce souvisí s procesem stárnutí a výskytem chronických onemocnění, které vykazují souvislost s působením ROS a nerovnováhou oxidantů a antioxidantů (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018, Štípek et al. 2000).

### Myoglobin

Primární funkcí myoglobinu je ukládání kyslíku ve svalových buňkách, ale může také působit jako scavenger RNS a je schopen chránit buňky myokardu před ROS při hypoxii (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018).

### Haptoglobin a hemopexin

Prooxidačně nebezpečnou formou železa je hemoglobin uvolněný z erytrocytů a hem uvolněný z hemoproteinů včetně hemoglobinu a myoglobinu. Proto se za antioxidanty považují také haptoglobin, vychytávající extracelulární hemoglobin a hemopexin, vázající uvolněný hem (Štípek et al. 2000).

### Metalothioneiny

Jsou tvořeny 61–68 aminokyselinami s významnou převahou cysteinu. Tyto proteiny zajišťují správnou homeostázu iontů přechodných kovů a také jim poskytují úložnou kapacitu. Hrají významnou roli v buněčném jádře a prostřednictvím síry chelatují ionty kovů (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018).

## Chaperony

Základní funkcí těchto proteinů je navázat na sebe ještě nesvinuté proteiny a pomáhat při jejich posttranslačním prostorovém uspořádání a začlenění do buněčných organel. Oxidační stres indukuje syntézu chaperonů, které zřejmě rozpoznají oxidací poškozené proteiny, vážou je na sebe a urychlí jejich odstranění v proteosomech. Mohou též pomoci při opravách konformace proteinu, a tak je třeba je považovat za součást systému reparujícího tkáň po oxidačním poškození (Štípek et al. 2000).

### **2.2.2.2 Nízkomolekulární endogenní antioxidanty**

#### Koenzym Q (Ubichinon)

Je jedním z derivátů 1,4-benzochinonu. Za normálních podmínek homeostázy je syntetizován ve všech částech těla. U živočišných druhů byly nalezeny různé homology ubichinonu, které se vzájemně liší délkou postranního isoprenového řetězce. Jeho funkcí je zejména podíl na transportu elektronů v mitochondriálním dýchacím řetězci a na transportu elektronů mimo mitochondrie. Podílí se také na redoxních reakcích dehydrogenas, cytochromů nebo jiných nehemových proteinů. Ubichinon dále umožňuje vazbu vodíku na volné radikály, což vede k transformaci ubichinonu a tvorbě radikálu. Tento radikál vykazuje antioxidační vlastnosti a může reagovat s jinými radikály a molekulárním kyslíkem (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018).

#### Glutathion (GSH)

Jedná se o sloučeninu s nízkou molekulovou hmotností, která je složená z tří aminokyselin: glycinu, cysteinu a kyseliny glutamové. Za fyziologických podmínek je syntetizován v mnoha tkáních, ale nejintenzivněji v hepatocytech. Glutathion je v lidském těle přítomen v několika redoxních formách, z nichž nejdůležitější jsou redukovaný glutathion (GSH) a oxidovaný glutathion (GSSG). V buňkách za normálních podmínek převládá jeho redukovaná forma GSH, a to v poměru 100:1. Organismus se stále snaží udržet stabilní poměr GSH/GSSG, aby nedošlo k narušení antioxidační kapacity buňky. Je to antioxidant, který je v savčích buňkách v poměrně vysoké koncentraci (1-10 mmol·l<sup>-1</sup>). Je jedním z nejvýznamnějších redoxních pufrů buňky a jeho úlohou je odstraňovat ROS, udržovat v redukované formě thiolové skupiny proteinů, cysteinu, koenzymu A a regenerovat tokoferol a askorbát. Glutathion je významný nejen v neenzymových reakcích chránících před volnými radikály, ale je spjat i s funkcí

některých enzymů (např. GPx, GST), kde vystupuje v roli koenzymu (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018, Racek 2003, Štípek et al. 2000).

### Kyselina lipoová

Jako antioxidant reaguje kyselina lipoová s alkylperoxylovými radikály ( $RO_2^*$ ), askorbylovými radikály,  $HO^*$ ,  $NO^*$ , tokoferolovými radikály,  $O_2^{\cdot-}$  a  $HClO$ . Jedná se tedy o univerzální antioxidant (Štípek et al. 2000). Tato látka se využívá ve farmakoterapii diabetické polyneuropatie (Nosková 2020).

### Melatonin

Melatonin je hormon produkovaný hlavně v epifýze, ale i v retině a jiných tkáních. U člověka zasahuje hlavně do řízení spánkového cyklu. Jeho významnou funkcí je redukce oxidačního stresu, vyplývající z jeho schopnosti vylučovat volné radikály a zabránit jejich tvorbě regulací aktivity antioxidantních enzymů a stimulací aktivit endogenních antioxidantů. Je účinný lapač hydroxylových radikálů a má schopnost detoxikovat některé ROS a RNS, jmenovitě singletový kyslík, peroxyinitritový anion a oxid dusnatý (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018).

### Bilirubin

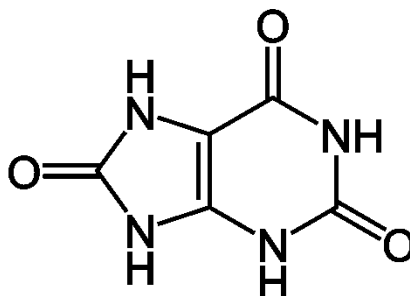
Je to produkt degradace hemoglobinu a dalších hemových proteinů. V biologických studiích vykazuje silné antioxidantní vlastnosti proti peroxylovým radikálům. Antioxidantní význam má zřejmě jak volný bilirubin, tak bilirubin vázaný na albumin a jiné proteiny. Bilirubin vázaný na albumin se mění na biliverdin, který je rozpustný ve vodě. Bilirubin tak exportuje radikálovou reakci z LDL do vodné fáze. Studie prokázaly jeho antioxidantní aktivitu v polárních médiích, jako jsou vodné lipidové dvojvrstvy (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018, Štípek et al. 2000).

### Kyselina močová

Kyselina močová (Obr. 9) je konečným produktem odbourávání purinů a dlouho byla považována za odpadní látku. Ukazuje se ale, že je zároveň nejhojnějším antioxidantem plazmy. Antioxidantní vlastnosti spočívají v její schopnosti zachytávat různé ROS, jako například peroxyinitrit, hydroxylový radikál, singletový kyslík a lipidové peroxidy. Pravděpodobně také dokáže zachytit ionty oxidu dusičitého a uhličitanu a vytvořit stabilní komplexy s ionty mědi a železa. To vede k inhibici reakcí volných radikálů, jako je



Fentonova reakce. Kromě toho přispívá k ochraně antioxidačních enzymů, zejména SOD1 a SOD3 (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018, Racek 2003).

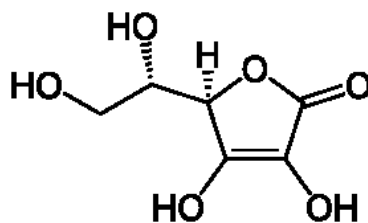


Obrázek 9.: Kyselina močová (převzato z Wikipedia 2021).

### 2.2.2.3 Antioxidanty v potravě

#### Kyselina askorbová – Vitamin C

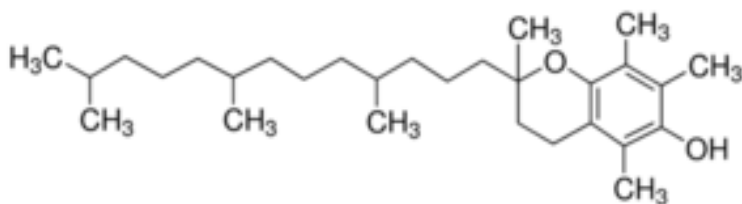
Kyselina askorbová (Obr. 10) působí jako kofaktor řady enzymů, je potřebná např. pro hydroxylaci prolinu a lysinu při biosyntéze kolagenu, uplatňuje se při tvorbě glykosaminoglykanů, karnitinu, noradrenalinu a účastní se metabolismu cholesterolu. Je důležitým redukčním činidlem. Redukuje Fe(III) na Fe(II), Cu(II) na Cu(I) a umožňuje tak vstřebávání železa ze střeva a využití přechodných prvků v aktivaci hydroxylas. Antioxidační účinek askorbátu spočívá v redukci anorganických i organických radikálů, jako  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO_2^{\cdot}$ ,  $HO^{\cdot}$ , hydrofilní  $RO_2^{\cdot}$ ,  $NO_2^{\cdot}$  a reaguje s  $^1O_2$  a HClO. Askorbát také regeneruje tokoferolový radikál a při těchto reakcích ztratí elektron a změní se na semidehydroaskorbát neboli askorbylový radikál, který je mnohem méně reaktivní než zmíněné radikály kyslíku a dusíku. Regeneruje se dehydrogenasou za účasti NADH nebo dismutuje na askorbát a dehydroaskorbát. Následně pomocí dehydroaskorbátoreduktasy s účastí GSH dochází k regeneraci zpět na askorbát. Na druhou stranu může askorbát působit prooxidačně a stimulovat oxidační poškození tkáně díky své schopnosti redukovat měď a železo na formy katalyzující Fentonovu reakci, a tedy i vznik volných radikálů (Štípek et al. 2000).



Obrázek 10.: Kyselina askorbová (převzato z Wikipedia 2021).

### Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)

Vitamin E je skupinou osmi isomerů, z nichž biologicky nejúčinnější je  $\alpha$ -tokoferol (Obr. 11). Vedlejší isoprenový řetězec způsobuje nerozpustnost vitaminu E ve vodě, a tak se jedná o lipofilní antioxidant. Vitamin E je typický membránový antioxidant a uplatňuje se v antioxidantní ochraně lipidů biologických membrán a lipoproteinových částic plazmy. Při peroxidaci lipidů dochází k řetězové reakci, která vede ke štěpení uhlíkového řetězce a vzniku reaktivních aldehydů a alkanů. Tokoferol reaguje s meziprodukty lipoperoxidace, alkylperoxylovými radikály lipidů, které mění na hydroperoxydy a ty jsou pak rozkládány působením GPx. Při reakci tokoferolu s volným radikálem vzniká tokoferyllový radikál a je důležité zajistit jeho zpětnou redukci. K tomu slouží kyselina askorbová a reakce se dále účastní ještě GSH s celým systémem regenerujícím tento koenzym. Místo GSH se mohou uplatnit i bilirubin, kyselina močová nebo bioflavonoidy (Racek 2003, Štípek et al. 2000).

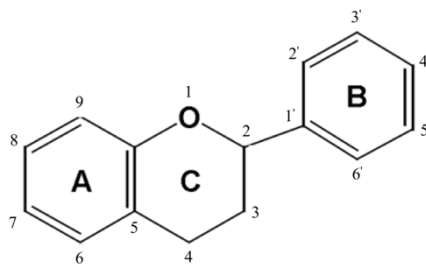


Obrázek 11.:  $\alpha$ -tokoferol (převzato ze Sigma-Aldrich 2021).

### Flavonoidy

Jsou to sekundární rostlinné metabolity, které jsou významnou součástí lidské stravy (zelenina, ovoce, čaj, červené víno). Jsou součástí velké skupiny přírodních antioxidantů polyfenolů a jsou odvozené od heterocyklu flavanu (Obr. 12). Jejich antioxidantní účinek závisí na jejich struktuře, respektive počtu a poloze hydroxylových skupin a dvojných vazeb heterocyklického jádra. S volnými radikály reagují za tvorby dostatečně stabilních fenoxyllových radikálů. Jejich antioxidantní mechanismy jsou dány schopností přímo vázat peroxylové, hydroxylové a superoxidové radikály i peroxid vodíku. Dále schopností podílet se na regeneraci vitaminů C a E, vazbou přechodných kovů v pevné cheláty a inhibicí enzymů, které katalyzují vznik volných radikálů. Jako antioxidanty působí protizánětlivě, antikarcinogenně a zasahují do buněčného signálního systému. Pravidelný příjem potravy s obsahem flavonoidů úzce souvisí s prevencí výskytu kardiovaskulárních

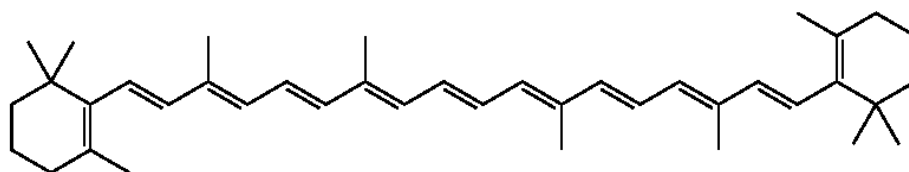
onemocnění, aterosklerózy, rakoviny a dalších onemocnění (Racek 2003, Štípek et al. 2000).



Obrázek 12.: Základní struktura flavonoidů (převzato z Alkhalidy et al. 2018).

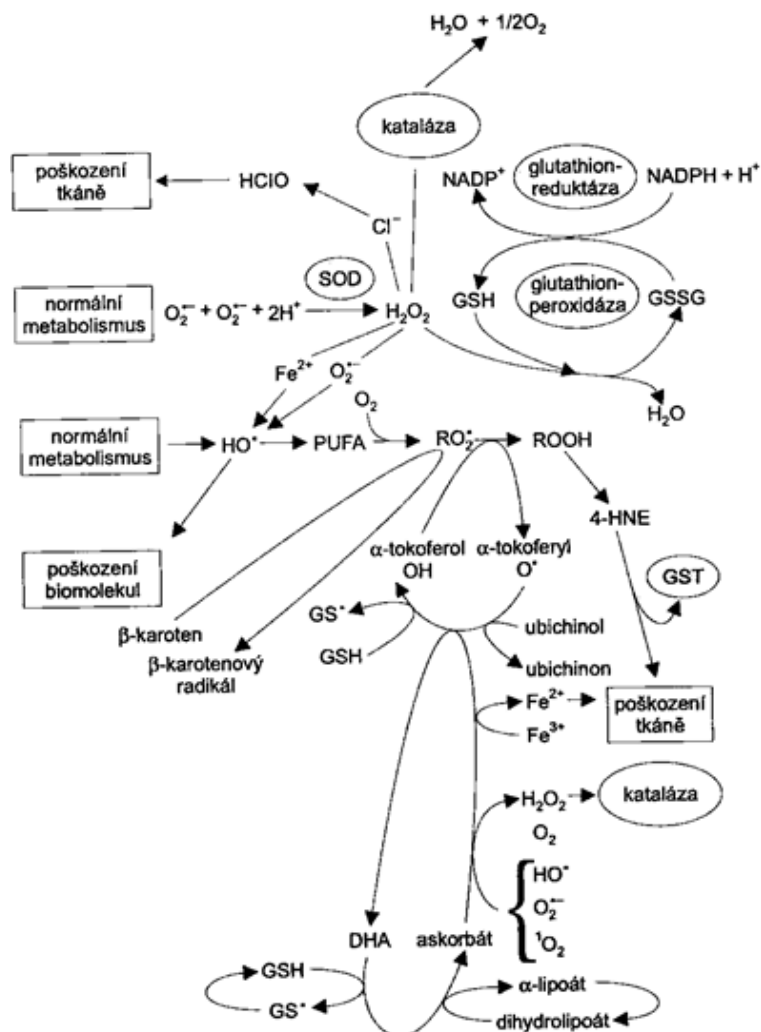
### Karotenoidy

Jsou to isoprenové sloučeniny, řadící se svou strukturou mezi terpeny. Jedná se o lipofilní látky obsažené v listové zelenině a mrkvi. Nejdůležitější jsou  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, lykopen, lutein a zeaxantin. V mrkvi je z 85 % zastoupen  $\beta$ -karoten a z 15 %  $\alpha$ -karoten.  $\beta$ -karoten (Obr. 13) je největším zdrojem vitamínu A, který se v sítnici mění na retinal důležitý pro vidění.  $\beta$ -karoten hraje důležitou roli v antioxidační ochraně, jelikož zháší singletový kyslík a je schopen likvidovat volné radikály. Ještě účinnější je lykopen, obsažený zejména v rajčatech, zatímco antioxidační schopnosti vitamínu A jsou zanedbatelné. Mechanismus jejich působení není přesně znám, zdá se, že se uplatňují prostřednictvím tokoferolu. Lze předpokládat, že  $\beta$ -karoten může mít významnou úlohu v prevenci zhoubných nádorů, přesto toto působení není zcela potvrzeno, jelikož v některých studiích způsobila suplementace  $\beta$ -karotenem dokonce nárůst incidence plicního karcinomu u kuřáků. Řada dalších prací naopak uvádí snížení rizika, proto se zdá pravděpodobné, že v prostředí se zvýšenou tvorbou volných radikálů (např. u kuřáků) je oxidován a jeho oxidační produkty usnadňují karcinogenezi (Racek 2003, Štípek et al. 2000).



Obrázek 13.:  $\beta$ -karoten (převzato z Wikipedia 2021).

Jednotlivé složky AOX systému jsou mezi sebou propojené a spolupracují. Funkce jednoho antioxidantu ovlivňuje činnost jiného (Obr. 14) (Štípek et al. 2000).



Obrázek 14.: Vzájemné propojení jednotlivých složek antioxidačního systému organismu (převzato ze Štípek et al. 2000).

### 3. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv vybraných bicyklických monoterpenů na aktivitu a expresi antioxidantních enzymů v lidských játrech. Vybrané monoterpeny zahrnovaly (+)-kafr, (-)-kafr, (-)-fenchon, kamfen a (-)- $\alpha$ -thujon. K dosažení cíle bylo nutné provést:

- Připravit zásobní roztoky jednotlivých monoterpenů a subcelulární frakce z lidské jaterní tkáně
- Stanovit vliv jednotlivých monoterpenů v koncentraci 100  $\mu$ M na specifickou aktivitu glutathionreduktasy, glutathionperoxidasy, glutathion-S-transferasy a katalasy
- Připravit ultratenké lidské jaterní řezy a inkubovat je s (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentraci 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M
- Stanovit vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na aktivitu GST a expresi mRNA osmi hlavních isoform antioxidantních enzymů (GSTA1, GSTP1, GPx1, GPx2, GPx4, GR, CAT, SOD) v ultratenkých lidských jaterních řezech

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie, přístroje, biologický materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

- (-)-fenchon
- (-)-kafr
- (-)- $\alpha$ -thujon
- (+)-kafr
- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES)
- 1-chlor-2,4-dinitrochlorobenzen (CDNB)
- Bovinní sérový albumin (BSA)
- Detergent RNaseZAP
- Diethylpyrokarbonát (DEPC)
- Dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Dithiotreitol (DTT)
- DNAsa
- Ethanol (EtOH)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)
- Gentamycin
- Glukosa monohdrát
- Glutathion (GSH)
- Glutathion disulfid (GSSG)
- Glutathionreduktasa (GR)
- Hydrogenfosforečnan draselný ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahdrát ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ )
- Hydrogenuhličitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ )
- Hydroxid sodný (NaOH)
- Chlorid draselný (KCl)
- Chlorid sodný (NaCl)
- Chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ )

- Chloroform
- Isopropanol
- Kamfen
- Kyselina bicinchoninová (BCA)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Molybdenan amonný tetrahydrát ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> x 4 H<sub>2</sub>O)
- Náhodné hexamery
- Nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH)
- Peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Reverzní transkriptasa (RT)
- Síran hořečnatý heptahydrát (MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O)
- Síran měďnatý hexahydrát (CuSO<sub>4</sub> x 6 H<sub>2</sub>O)
- *t*-butylhydroperoxid (*t*-BHP)
- Trizol
- Uhličitan sodný (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)
- Williamsovo medium E (s *L*-glutaminem)

#### 4.1.2 Přístroje

- Analytické váhy CP225D – Sartorius
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos – Thermo Fisher Scientific
- CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> inkubátor – Binder
- Hlubokomrazicí box – Arctiko
- Laboratorní váhy M-Prove – Sartorius
- Magnetická míchačka – Heidolph
- Multifunkční modulární reader SPARK – Tecan
- NanoDrop 2000 – Thermo Fischer Scientific
- PCR cyklér MJ Mini Thermal Cyclers – BioRad
- PCR QuantStudio 6 Flex – Applied Biosystems
- pH metr inoLab – WTW
- Thermomixer Comfort – Eppendorf
- Tkáňový kráječ Krumdieck Tissue Slicer MD4000
- Ultracentrifuga – Sorvall

- Ultrazvukový homogenizátor – Sonopuls Bandelin HD 2070
- Vortex-V-1 plus – Biosan

### **4.1.3 Biologický materiál**

Biologickým materiálem byla lidská játra od dárců mužského i ženského pohlaví ve věku od 50 do 80 let. Biologický materiál pocházel z Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Pacientům byla z terapeutických důvodů (obvykle jako součást léčby nádorových onemocnění) provedena parciální hepatektomie. Odběr tkáně k experimentálním účelům byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (povolení č. 201703 S14P) a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Dostupné údaje o pacientech jsou uvedeny v Tab. 1.



Tabulka 1.: Údaje o souboru pacientů.

č. pacienta	datum	pohlaví	věk (roky)	diagnóza	komorbidity	medikace	chemoterapie
37	27.08.2018	♂	50	metastáze neuroendokrinního tumoru	DM2	insulin	∅
38	30.08.2018	♂	59	cholangiokarcinom	∅	∅	∅
39	22.01.2019	♀	71	metastáze kolorektálního karcinomu	fibrilace síní, hypertenze, mitrální insuficience, trikuspidální insuficience	felodipin+ramipril, bisoprolol, apixaban, cholekalciferol, flavonoidy, levothyroxin	FOLFOX
42	21.05.2019	♂	70	metastáze kolorektálního karcinomu	glomerulonefritida, Wegenerova granulomatoza, ICBS, kardiomyopatie, fibrilace síní, hyperthyreoz, tromboembolická nemoc, karcinom prostaty, monoklonální gamopatie, DM2	bisoprolol, gabapentin, methylprednisolon, cholekalciferol, azathioprin, omeprazol, amiodaron, furosemid, fraxiparin, perindopril, amilorid, spironolakton, repaglinid, insulin, ipratropium/fenoterol	∅
43	29.05.2019	♂	57	cholangiokarcinom	kardiální selhání, mitrální insuficience, myeloproliferativní onemocnění, vrozený trombofilní stav, hyperlipoproteinemie	anagrelid, losartan, amlodipin, betaxolol, rosuvastatin, hydrochlorothiazid, paroxetin, ASA	∅
44	01.10.2019	♂	66	metastáze kolorektálního karcinomu	fibrilace síní, hypertenze, ICBS, mitrální insuficience, mikrocytární anemie, DM2	felodipin, rilmenidin, perindopril, alopurinol, omeprazol, glyklazid, levocetirizin, budesonid	bevacizumab/FOLFOX
46	20.11.2019	♂	53	metastáze kolorektálního karcinomu	hypertenze	indapamid+perindopril	FUFA, pak FOLFIRI/panitumumab
48	28.01.2020	♀	72	metastáze endokrinního tumoru	DM2, hypertenze	metformin, glimepirid, ramipril	∅
51	15.06.2020	♀	69	metastáze kolorektálního karcinomu	hypertenze	amlodipin, bisoprolol, perindopril	FOLFOX /bevacizumab
52	15.06.2020	♂	80	hepatocelulární karcinom	ICBS, 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; ICBS, ischemická choroba srdeční; FUFA, 5-fluorouracil + leukovorin; FOLFOX, 5-fluorouracil + leukovorin + oxaliplatin; FOLFIRI, 5-fluorouracil + leukovorin + irinotekan

## 4.2 Příprava základních roztoků

### Sodnofosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4

Navážila jsem si 35,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  a rozpustila v redestilované vodě. Následně jsem doplnila v odměrné baňce do 1000 ml a promíchala pomocí magnetické míchačky. Navážku 3,9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  jsem rozpustila v redestilované vodě a v odměrné baňce doplnila do 250 ml a promíchala na míchačce. Oba připravené roztoky jsem za stálého míchání magnetickou míchačkou slévala dohromady a pomocí pH metru jsem kontrolovala hodnoty pH, aby výsledné pH roztoku bylo 7,4. Připravený pufr jsem přelila do skleněné lahve s uzávěrem a uchovávala v lednici.

Takto připravovaný pufr jsem dále používala k ředění vzorků cytosolu u všech popsaných metod.

## 4.3 Příprava zásobních roztoků jednotlivých monoterpenů

Pro přípravu zásobních roztoků jednotlivých monoterpenů ((+)-kafr, (-)-kafr, kamfen, (-)-fenchon, (-)- $\alpha$ -thujon) jsem si podle molární hmotnosti, výsledné koncentrace a objemu dopočítala navážky. Používaný vzorec uvádím níže. Jednotlivé navážky jsem si připravila do plastových mikrozkušavek a poté přepočítala přesnou navážku na 1 ml EtOH a tento objem napipetovala do zkumavky. Následně jsem míchala pomocí Vortexu do úplného rozpuštění. Výsledná koncentrace roztoků monoterpenů byla 10 mM.

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

kde  $c$  je koncentrace (10 mM),  $m$  je hmotnost,  $M$  je molární hmotnost a  $V$  je objem (1 ml).

Takto připravené zásobní roztoky monoterpenů jsem si označila štítkem a uchovávala při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tyto roztoky jsem poté používala ve všech experimentech.

## 4.4 Příprava subcelulárních frakcí z jaterní tkáně

Před samotným experimentem jsem si v chladicí místnosti připravila Na-fosfátový pufr 0,1 M (pH 7,4) a stejný pufr s 20 % glycerolu. Dále jsem přichystala centrifugační kyvety na 50 ml, homogenizátor 30 ml s pístem, nádobu s ledem a vodou, buničinu, Erlenmeyerovu baňku na pufr a pufr s glycerolem, injekční stříkačku (10-20 ml), dlouhou

jehlu, míchačku, kádinky na cytosol a mikrosomy, plastové mikrozkumavky, zamrazovací stojánky, pipety (5 ml a 1 ml), špičky, nůžky, buničinu, pinzetu, homogenizační píst na resuspendaci mikrosomů, fix, malé mističky s ledítkem.

#### 4.4.1 Postup

V centrifugovně jsem nechala vychladit rotory a centrifugy. Játra jsem rozvážíla do malých mističek na ledítku po 5 g a rozstříhala je. Na kousky rozstříhaná játra jsem z jedné mističky přendala do 30 ml homogenizátoru a přilila 15 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4, zhomogenizovala pohybem pístu nahoru a dolů ve třech opakováních. Zhomogenizovaná játra jsem přelila do centrifugační kyvety. Píst a homogenizátor jsem vypláchla 15 ml pufru, který jsem pak přilila do kyvety. Umístila jsem kyvety do centrifugy (Heraeus) s rotorem a stočila 20 min na 5 000 g při 4 °C.

Supernatant z prvního točení jsem přelila do čistých kyvet a stočila ve stejném rotoru 60 min na 20 000 g při 4 °C ve stejné centrifuze.

Supernatant z druhého točení jsem s opatrností, aby netekly kaly, které jsem nakonec odlila do odpadu, slila do 12,5 ml kyvet pro ultracentrifugu Sorvall. Kyvety jsem plnila maximálně do tří čtvrtin a uzavřela víčkem. Následně jsem vložila kyvety do rotoru tak, aby byly vždy dvě proti sobě, zašroubovala víko, přišroubovala rotor k centrifuze, zavřela víko centrifugy a spustila na 67 min 105 000 g při 4 °C.

Po třetím točení jsem vyndala rotor z centrifugy, otevřela, vyjmula kyvety, supernatant (cytosol) odebrala a po 1,1 ml rozpipetovala do mikrozkumavek za stálého míchání.

Peletu z třetího točení jsem resuspendovala v 5 ml pufru, kyvety doplnila, vyvážíla, uzavřela a dala do rotoru, který jsem uzavřela a znovu dala do ultracentrifugy Sorvall a spustila na 67 min 105 000 g při 4 °C. Po skončení točení jsem vyndala rotor a vyjmula kyvety. Supernatant jsem vylila a k peletě jsem přidala podle gramů jater tolik ml pufru s 20 % (v/v) glycerolu. Malým pístem jsem zhomogenizovala, slila do kádinky, dala do ultrazvukové lázně (zhomogenizovat) a na míchačce jsem za stálého míchání rozpipetovala po 1,1 ml do mikrozkumavek a dala zmrazit.

## **4.5 Příprava inkubačních směsí**

### **4.5.1 Ředění cytosolu**

Vzorky cytosolu jsem ředila 10x. Do plastové mikrozkuřavky (2 ml) jsem napipetovala 160  $\mu$ l cytosolu a 1440  $\mu$ l Na-fosfátového pufru 0,1 M (pH 7,4). Následně jsem vše důkladně promíchala pomocí Vortexu.

### **4.5.2 Přidání inhibitorů**

Zředěné vzorky cytosolu jsem rozpipetovala do plastových mikrozkuřavek vždy po 247,5  $\mu$ l cytosolu a přidala 2,5  $\mu$ l roztoků jednotlivých monoterpenů 10 mM. Výsledná koncentrace monoterpenů v inkubačních směsích byla 100  $\mu$ M. Pro kontrolní vzorky jsem k cytosolu přidala 2,5  $\mu$ l EtOH. Následně jsem vše promíchala pomocí Vortexu.

### **4.5.3 Příprava slepých vzorků**

Do plastových mikrozkuřavek pro slepé vzorky jsem místo cytosolu pipetovala 495  $\mu$ l Na-fosfátového pufru 0,1 M (pH 7,4). Jedná se o dvojnásobné množství, jelikož jsem blanky používala pro 2 vzorky pacientů na jednu destičku. K pufru jsem přidala vždy 5  $\mu$ l monoterpenu 10 mM. Pro kontrolní blanky jsem místo inhibitoru přidávala 5  $\mu$ l EtOH.

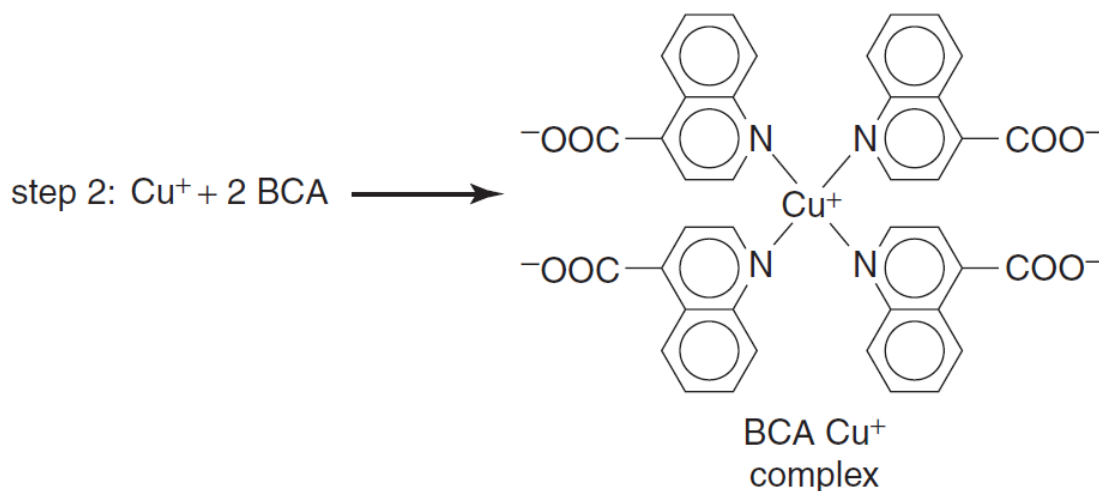
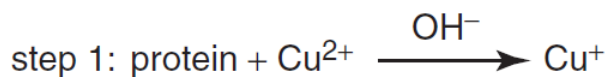
Následně jsem vše nechala inkubovat 30 min při 25 °C v Thermomixeru.

Takto připravované inkubační směsi jsem dále používala ve všech metodách.

## **4.6 Stanovení koncentrace bílkoviny metodou BCA**

### **4.6.1 Princip**

V alkalickém prostředí proteiny reagují s  $\text{Cu}^{2+}$ . Měď přechází na  $\text{Cu}^{1+}$ , která v prostředí kolem pH 10 vytváří stabilní modrofialový komplex s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny ve vzorku (Obr. 15). Absorbance komplexu se měří při 562 nm (Smith et al. 1985).



Obrázek 15.: Princip stanovení koncentrace proteinů metodou BCA (převzato z Krohn 2011).

#### Zásobní roztoky

Roztok A – NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, BCA v 0,1 M NaOH, roztok je čirý.

Roztok B – 4 % CuSO<sub>4</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, roztok má modré zbarvení.

Roztok C – vznikne smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1, výsledný roztok má zelené zbarvení.

#### 4.6.2 Kalibrační křivka

Do 6 plastových mikrozkušavek jsem napipetovala roztoky dle Tab. 2. Roztok bovinního sérového albuminu (BSA) 0,2 % jsem zředila 2x destilovanou vodou.

Tabulka 2.: Kalibrační křivka.

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

### 4.6.3 Postup

Vzorky jsem naředila 10x destilovanou vodou do mikrozkušavek. Do jamek mikrotitrační destičky jsem poté postupně pipetovala:

Pro kalibrační křivku jsem napipetovala 10  $\mu\text{l}$  bílkoviny ze zkumavek 1–6 v 8 paralelních měřeních a 200  $\mu\text{l}$  roztoku C multikanálovou pipetou.

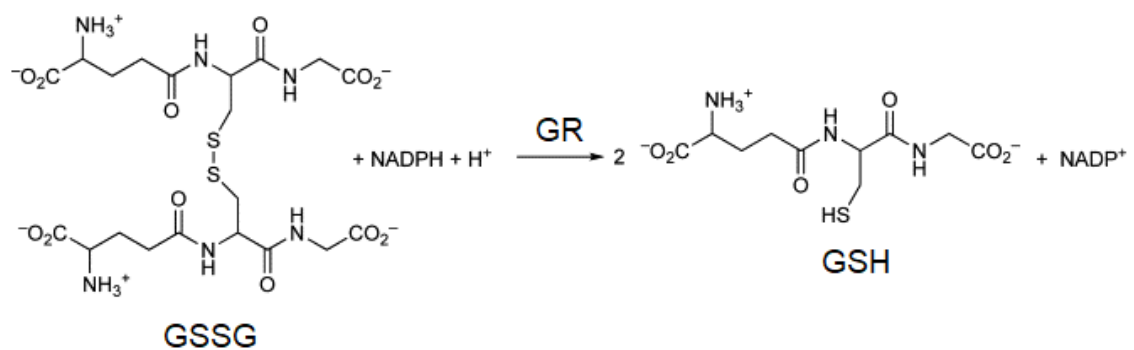
Pro vzorky jsem napipetovala 10  $\mu\text{l}$  vzorku bílkoviny v 8 paralelních měřeních a 200  $\mu\text{l}$  roztoku C multikanálovou pipetou.

Mikrotitrační destičku jsem lehce protřepala a nechala inkubovat při 37  $^{\circ}\text{C}$  v Thermomixeru po dobu 30 min.

Po 30 minutách jsem změřila absorbanci na přístroji Tecan.

## 4.7 Stanovení aktivity glutathionreduktasy

Glutathionreduktasa (GR) je důležitým enzymem, který hraje roli v obraně organismů před oxidačním stresem. Metoda je založena na přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za současné oxidace NADPH (Bonilla et al. 2008, Carlberg a Mannervick 1985). Spotřeba NADPH je zaznamenávána pomocí sledování úbytku absorbance při 340 nm po dobu 6 min při 37  $^{\circ}\text{C}$  (Obr. 16).



Obrázek 16.: Princip stanovení aktivity GR (převzato z Fagan a Palfey 2010).

#### 4.7.1 Příprava zásobních roztoků

##### K-fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,0

##### Roztok $K_2HPO_4$

Navážila jsem 8,7 g látky, rozpustila v kádince v redestilované vodě, přelila do odměrné baňky a doplnila v odměrné baňce redestilovanou vodou do 500 ml. Následně jsem baňku umístila na magnetickou míchačku a nechala míchat do úplného rozpuštění.

##### Roztok $KH_2PO_4$

Navážila jsem 6,8 g látky, rozpustila v kádince v redestilované vodě a přelila do odměrné baňky. Doplnila v odměrné baňce redestilovanou vodou do 500 ml. Poté jsem baňku umístila na magnetickou míchačku a nechala míchat do úplného rozpuštění.

Následně jsem oba roztoky smíchala v přibližném poměru 5:2 v kádince a upravila pH pomocí pH metru a magnetické míchačky na 7,0. Pufr jsem následně přelila do skleněné lahve s uzávěrem a uchovávala v lednici.

##### Roztok EDTA 5 mM

Navážila jsem 0,186 g EDTA a rozpustila v 100 ml redestilované vody v kádince. Roztok jsem uchovávala ve skleněné lahvi s uzávěrem při laboratorní teplotě.

##### Roztok NADPH 2,5 mM

Navážila jsem 2,9 mg NADPH do plastové mikrokumavky (2 ml) na analytických vahách a doplnila 1,4 ml redestilované vody. Následně jsem pomocí Vortexu míchala do úplného rozpuštění.

##### Roztok GSSG 4 mM

Navážila jsem 17,15 mg GSSG do kádinky a doplnila 7 ml redestilované vody. Pomocí magnetické míchačky jsem míchala do rozpuštění.

#### 4.7.2 Postup

Nejprve jsem si ve skleněné kádince podle návodu připravila mastermix na 1 destičku. Pipetovala jsem 6 ml K-fosfátového pufru 0,1 M (pH 7,0), 4,8 ml EDTA, 6 ml GSSG a 1,2 ml NADPH. Vše jsem pomocí magnetické míchačky promíchala.

Vlastní stanovení proběhlo v mikrotitrační destičce, do které jsem pipetovala do všech jamek 50  $\mu\text{l}$  inkubačních směsí (cytosol/slepý vzorek) a 150  $\mu\text{l}$  mastermixu multikanálovou pipetou. Každý vzorek byl stanoven ve 4 paralelkách.

Destičku jsem ihned vložila do Tecanu vytemperovaného na 37 °C a sledovala pokles absorbance po dobu 6 min při 340 nm.

### 4.7.3 Vyhodnocení

Nejprve jsem odečetla od  $A/\text{min}$  vzorku  $A/\text{min}$  slepého vzorku. Pomocí vzorce a molárního extinkčního koeficientu ( $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) jsem vypočítala koncentraci spotřebovaného NADPH/min.

Pomocí následujícího vzorce jsem vypočítala aktivitu GR (nmol/min/ml):

$$A = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) * V_i}{\epsilon * l * V_s} * 1000$$

kde  $\epsilon$  je molární extinkční koeficient ( $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $A_{vz}$  je absorbance vzorku,  $A_{bl}$  je absorbance blanku,  $l$  je délka měřené vrstvy neboli výška jamky ( $l = 0,75 \text{ cm}$ ),  $V_i$  je objem reakční směsi ( $V_i = 0,2 \text{ ml}$ ) a  $V_s$  je objem biol. frakce ( $V_s = 0,05 \text{ ml}$ ).

Aktivitu jsem vydělila hodnotou koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích (mg/ml) podle následujícího vzorce, čímž jsem získala hodnoty specifické aktivity.

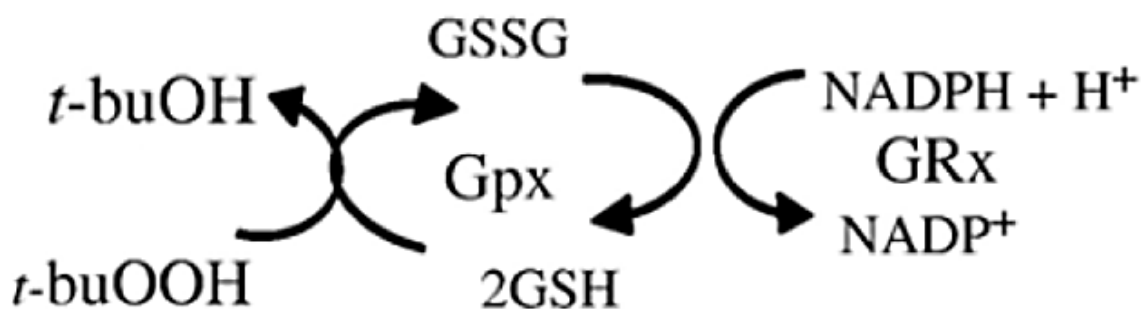
$$A_{sp} = A/m_{prot}$$

kde  $A_{sp}$  je specifická aktivita (nmol/min/mg) a  $m_{prot}$  je množství bílkoviny (mg/ml).

## 4.8 Stanovení aktivity glutathionperoxidasy

V průběhu reakce katalyzované glutathionperoxidasou (GPx) je *t*-butylhydroperoxid přeměňován na *t*-butylalkohol za současné oxidace GSH na GSSG. Vzniklý oxidovaný glutathion je průběžně redukován glutathionreduktasou, která zajišťuje konstantní hladinu GSH (Obr. 17). Reakci doprovází oxidace NADPH, což je monitorováno fotometricky poklesem absorbance při 340 nm na Tecanu (Flohé a Günzler 1984, Handy et al. 2009).





Obrázek 17.: Princip stanovení aktivity GPx (převzato z Korte 2013).  
*t-buOH*, *t*-butylalkohol; *t-buOOH*, *t*-butylhydroperoxid

#### 4.8.1 Příprava zásobních roztoků

##### K-fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,0

Použila jsem stejný pufr jako v případě stanovení aktivity GR.

##### Roztok EDTA 20 mM

Navážila jsem 0,186 g EDTA a rozpustila v 25 ml K-fosfátového pufru 0,1 M (pH 7,0).

##### Roztok glutathionreduktasy (10 U/ml)

Napipetovala jsem 33  $\mu$ l GR do 1,467 ml pufru v plastové mikrokumavce (2 ml) a promíchala.

##### Roztok glutathionu 10 mM

Navážila jsem 0,0086 g GSH a doplnila 2,8 ml pufru v plastové mikrokumavce (5ml). Následně jsem míchala do rozpuštění.

##### Roztok NADPH 4 mM

Navážila jsem 0,0038 g NADPH a doplnila 1,2 ml redestilované vody v plastové mikrokumavce (2 ml). Následně jsem míchala do rozpuštění.

##### Roztok *t*-butylhydroperoxidu 70 % (*t*-BHP)

Napipetovala jsem 34,3  $\mu$ l *t*-BHP do 10 ml pufru v kádince. Následně jsem míchala na magnetické míchače.

## 4.8.2 Postup

Podle návodu jsem připravila mastermix v kádince. Na jednu destičku jsem použila 10,8 ml K-fosfátového pufru 0,1 M (pH 7,0), 1,2 ml EDTA, 1,2 ml GR a 2,4 ml GSH. Vše jsem důkladně promíchala na míchače a přelila do rezervoáru pro multikanálovou pipetu.

Vlastní stanovení probíhalo v mikrotitrační destičce, kam jsem pipetovala do všech jamek 50  $\mu$ l inkubačních směsí nebo 50  $\mu$ l slepých vzorků. Následně jsem multikanálovou pipetou přidala 130  $\mu$ l mastermixu. Každý vzorek či slepý vzorek byl proveden 4x.

Destičku jsem nechala inkubovat 10 min při 37 °C v Thermomixeru. Mezitím jsem nastavila vytemperování Tecanu rovněž na 37 °C.

Po skončení doby inkubace jsem u Tecanu přidala 10  $\mu$ l NADPH multikanálovou pipetou po řádcích a po dobu 5 min sledovala spotřebu NADPH nezávislou na hydroperoxidu.

Po skončení měření jsem přidala 10  $\mu$ l *t*-butylhydroperoxidu rovněž multikanálovou pipetou po řádcích, nastartovala tím reakci a znovu spustila na Tecanu tutéž metodu.

Pokles absorbance byl sledován při 340 nm.

## 4.8.3 Vyhodnocení

Aktivita GPx je vyjadřována v jednotkách U, kdy 1 U katalyzuje oxidaci 1  $\mu$ molu GSH na GSSG za 1 min při pH 7,0. Aktivitu GPx ( $\mu$ mol/min/ml) jsem spočítala podle následujícího vzorce:

$$U/ml = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) * 2 * V_i}{\epsilon * l * V_s}$$

kde  $A_{vz}$  je absorbance vzorku,  $A_{sl}$  je absorbance blanku,  $\epsilon$  je molární extinkční koeficient ( $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $l$  je délka měřené vrstvy ( $l = 0,75 \text{ cm}$ ),  $V_i$  je objem reakční směsi ( $V_i = 0,2 \text{ ml}$ ),  $V_s$  je objem biol. frakce ( $V_s = 0,05 \text{ ml}$ ) a  $x2$  vyplývá ze stechiometrie reakce (2  $\mu$ mol GSH produkovány 1  $\mu$ molem NADPH).

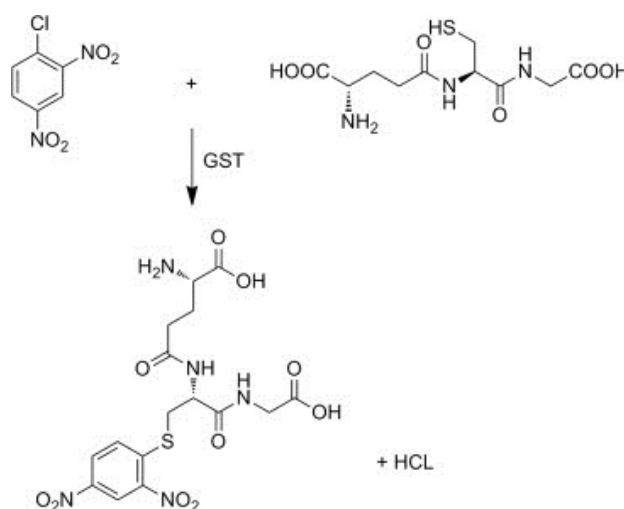
Jednotky U/ml jsem následně přepočítala podle vzorce pro specifickou aktivitu na jednotky U/mg proteinu.

$$A_{sp} = A/m_{prot}$$

kde  $A_{sp}$  je specifická aktivita (U/mg) a  $m_{prot}$  je množství bílkoviny (mg/ml).

## 4.9 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy

Měření aktivity glutathion-S-transferasy (GST) je založeno na tvorbě konjugátu 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu s GSH (GS-DNB), který má absorpční maximum při 340 nm (Habig et al. 1974). Princip stanovení je uveden na Obr. 18.



Obrázek 18.: Princip stanovení aktivity GST (převzato z Ojopagogo et al. 2015).

### 4.9.1 Příprava zásobních roztoků

Na-fosfátový pufr 0,1 M, pH 6,5

Roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$

Navážila jsem 1,79 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , rozpustila v kádince v redestilované vodě, přelila do odměrné baňky a doplnila redestilovanou vodou do 50 ml. Následně jsem pomocí magnetické míchačky míchala do rozpuštění.

Roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Navážila jsem 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , rozpustila v kádince v redestilované vodě, přelila do odměrné baňky, doplnila redestilovanou vodou do 100 ml a nechala obdobně rozpustit pomocí míchačky.

Následně jsem oba roztoky smíchala v přibližném poměru 1:3 v kádince. Za stálého míchání magnetickou míchačkou jsem upravila pH pomocí pH metru na požadovaných 6,5. Pufr jsem pak uchovávala ve skleněné lahvi s uzávěrem v lednici.

#### Roztok GSH 5,15 mM

Navážila jsem 7,92 mg GSH a rozpustila v kádince v 5 ml Na-fosfátového pufru 0,1 M (pH 6,5).

#### Roztok CDNB 51,5 mM

Navážila jsem 5,22 mg CDNB a rozpustila v plastové mikrozkušavce v 0,5 ml ethanolu.

### **4.9.2 Postup**

Nejprve jsem si podle návodu zapnula Tecan a nechala vytemperovat na 37 °C. Vlastní stanovení probíhalo v mikrotitrační destičce s plochým dnem. Do 6 jamek v každém sloupci jsem napipetovala 6 µl inkubační směsi a do 2 jamek ve všech sloupcích jsem pipetovala 6 µl pufru (blank).

Těsně před stanovením jsem si připravila mastermix. Použila jsem 4 ml GSH, 0,4 ml CDNB, 15,6 ml Na-fosfátového pufru 0,1 M (pH 6,5) a vše jsem pomocí míchačky promíchala.

Do všech jamek jsem multikanálovou pipetou napipetovala 194 µl mastermixu po řádcích.

Destičku jsem vložila do Tecanu. Přístroj destičku lehce protřepal a měřil absorbanci 6x v minutových intervalech při 340 nm.

### **4.9.3 Vyhodnocení**

Poměr konjugovaného substrátu jsem spočítala z odečtené absorbance po 1 min s použitím molárního extinkčního koeficientu 9,6 mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> při 340 nm pomocí následujícího vzorce:

$$A = \frac{(\Delta Avz - \Delta Asl) * V_{celk} * z}{\epsilon * l * V_{vz}}$$

kde  $A$  je aktivita (mmol/min/mg),  $\epsilon$  je molární extinkční koeficient ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $A_{vz}$  je absorbance vzorku,  $A_{sl}$  je absorbance blanku,  $V_{celk}$  je celkový objem v jamce ( $V_{celk} = 0,2 \text{ ml}$ ),  $V_{vz}$  je objem cytosolu v jamce ( $V_{vz} = 0,006 \text{ ml}$ ),  $zř$  je zředění (10x) a  $l$  je optická dráha ( $l = 0,75 \text{ cm}$ ).

Hodnotu specifické aktivity jsem pak vypočítala pomocí vzorce a hodnoty koncentrace proteinů ve frakcích.

$$A_{sp} = A/m_{prot}$$

kde  $A_{sp}$  je specifická aktivita (mmol/min/mg) a  $m_{prot}$  je množství bílkoviny (mg/ml).

## 4.10 Stanovení aktivity katalasy – metoda s molybdenanem amonným

Molybdenan amonný vytváří žlutý komplex s  $\text{H}_2\text{O}_2$  a jeho absorbance se měří při 405 nm (Góth 1991).

### 4.10.1 Příprava zásobních roztoků

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

Roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

Navážila jsem 10,74 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ , rozpustila v kádince v redestilované vodě, přelila do odměrné baňky a doplnila redestilovanou vodou do 500 ml. Následně jsem pomocí magnetické míchačky míchala do rozpuštění.

Roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Navážila jsem 4,08 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , rozpustila v kádince v redestilované vodě, přelila do odměrné baňky a doplnila redestilovanou vodou do 500 ml. Následně jsem pomocí magnetické míchačky míchala do rozpuštění.

Následně jsem oba roztoky slívala v kádince za stálého míchání a kontroly pH pomocí pH metru až do dosažení požadované hodnoty 7,4. Roztok jsem přelila do skleněné lahve s uzávěrem a uchovávala v lednici.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 65 mM

Pipetovala jsem 152,4 µl peroxidu do 20 ml sodno-draselného pufru 60 mM (pH 7,4) v kádince a promíchala.

### Molybdenan amonný 32,4 mM

Navázila jsem 0,8 g molybdenanu amonného a rozpustila v 20 ml redestilované vody.

## 4.10.2 Postup

Stanovení aktivity probíhalo v mikrotitrační destičce s plochým dnem. Podle následující tabulky jsem pipetovala blank 1, vzorky, blank 2 a blank 3. Vše kromě inkubačních směsí jsem pipetovala multikanálovou pipetou dle rozpisu uvedeného v Tab. 3. Následně jsem destičku nechala inkubovat při 37 °C 1 min s třepáním v Thermomixeru.

Tabulka 3.: Stanovení aktivity katalasy.

	<b>blank 1</b>	<b>vzorek</b>	<b>blank 2</b>	<b>blank 3</b>
1.	100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl pufru
2.	100 µl molybd.	20 µl ink. směs	20 µl pufru	20 µl pufru
3.	<i>inkubace 1 min při 37 °C, třepání</i>			
4.	-----	100 µl molybd.	100 µl molybd.	100 µl molybd.
5.	<i>1 min nechat stát</i>			
6.	20 µl ink. směs	-----	-----	-----
7.	<i>změřit absorbanci při 405 nm</i>			

Po inkubaci jsem k vzorku, blanku 2 a blanku 3 přidala 100 µl molybdenanu amonného a destičku nechala 1 min stát při laboratorní teplotě.

V dalším kroku jsem k blanku 1 přidala 20 µl inkubační směsi. Tento krok jsem pipetovala přímo u Tecanu a co nejrychleji. Před samotným měřením jsem pomocí mírného sklepávání a drátku propíchlá všechny bublinky, které se vytvořily unikáním kyslíku. Tyto bublinky by rušily měření absorbance. Poté jsem destičku vložila do Tecanu a spustila měření. Měřila jsem absorbanci při 405 nm.

### 4.10.3 Vyhodnocení

Aktivitu katalasy (U/ml), kde jednotka U je definována jako  $\mu\text{mol}/\text{min}$  (1 U rozloží 1,0  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  za minutu) jsem vypočítala podle následujícího vzorce:

$$[U/ml] = (A_{bl1} - A_{vz}) / (A_{bl2} - A_{bl3}) * 390 * zř$$

kde  $A_{vz}$  je absorbance vzorku,  $A_{bl1}$  je absorbance blanku 1,  $A_{bl2}$  je absorbance blanku 2,  $A_{bl3}$  je absorbance blanku 3 a  $zř$  je zředění frakce ( $zř = 10x$ ).

Následně jsem na základě hodnot proteinů v biologickém materiálu aktivitu přepočítala na specifickou aktivitu pomocí vzorce.

$$A_{sp} = A / m_{prot}$$

kde  $A_{sp}$  je specifická aktivita ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) a  $m_{prot}$  je množství bílkoviny ( $\text{mg}/\text{ml}$ ).

## 4.11 Příprava ultratenkých jaterních řezů

### 4.11.1 Příprava Krebsova–Henseleitova pufru

Složky uvedené v Tab. 4 jsem rozpustila v redestilované vodě a následně pomocí pH metru a HCl upravila pH na hodnotu 7,4. Spotřeba pufru na jedna játra byla asi 1 000 ml. Jako poslední jsem přidávala chlorid vápenatý, a to až po ujištění, že jsou všechny předchozí složky rozpuštěny, protože by mohlo dojít k vysrážení uhličitanů z pufru.

Tabulka 4.: Příprava Krebsova-Henseleitova pufru.

<b>Zásobní roztok (10x koncentrát, 0,5 l)</b>	
KCL	1,87 g
NaCl	34,5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,36 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,82 g
CaCl <sub>2</sub>	1,39 g
<b>Finální roztok</b>	
NaHCO <sub>3</sub>	2,1 g
glukosa monohydrát	4,95 g (4,5 g anhydridu)
HEPES	2,38 g
Zásobní roztok (10x koncentrát)	100 ml
<i>Doplnit do 1000 ml</i>	

#### **4.11.2 Příprava kultivačního Williamsova media E s *L*-glutaminem**

Do výchozího Williamsova media, které už obsahuje 11 mmol glukosy, jsem ještě přidala 25 mmol glukosy, celkem tedy výsledný roztok obsahoval 36 mmol. Následně jsem médium suplementovala 0,5 ml gentamycinu (finální koncentrace 50 µg/ml).

#### **4.11.3 Postup**

Rozložené části kráječe jsem postříkala 70 % ethanolem a po oschnutí poskládala, překryla alobalem a spolu s Krebsovým-Henseleitovým pufrům (K-H pufr) a médiem umístila do chladicí místnosti.

V den experimentu jsem nechala vychlazený K-H pufr přibližně hodinu probublávat pneumoxidem (95 % O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). Kráječ byl připojen k vodní lázni s termostatem a voda temperovaná na 4 °C cirkulovala chladícím oběhem. Důležité je plnit kráječ pomalu a ujistit se, že neprotéká. Kráječ jsem začala cca 20 min před krájením chladit.

Pro celou metodu je zásadní držet játra na ledu a v roztoku Euro-Collins po okamžité excizi. Není potřeba játra proplachovat, ale pouze opláchnout pufrům od krve.

Připravila jsem si box s ledem, kádinku s K-H pufrům na řezy a Petriho misku s filtračním papírem a pufrům pro přípravu válečků z tkáně.

Vykrajovačem o průměru 8 mm jsem z jater vykrojila válečky. Při jejich tvorbě jsem se snažila vyhnout vazivu a cévám a tvořit je souměrné. Z nich jsem pak pomocí Krumdieckova kráječe krájela řezy o tloušťce 150 µm rychlostí krájení 8-10. Plátky jater, válečky i výsledné řezy jsem držela v K-H pufru neustále na ledu. Před krájením je vhodné trochu namazat hybná raménka silikonovým lubrikantem.

#### **4.11.4 Preinkubace a inkubace ultratenkých řezů**

Použila jsem 12 jamkové destičky, kde jsem do každé jamky pro prepreinkubaci napipetovala 1 ml suplementovaného média, které bylo 30 min před inkubací předehříváno na 37 °C a pro inkubaci 1,3 ml média, které již není třeba předehřívát. Preinkubace probíhala v inkubátoru, který byl připojen na přívod pneumoxidu. V inkubátoru (37 °C) byla umístěna třepačka s horizontálním pohybem, která byla během inkubace nastavena na 90 rpm. Kvůli častému větrání v inkubátoru během vkládání destiček byla hladina plynů nastavena na 70 % O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> a po naplnění zvednuta na



85 % O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Po 60 min preinkubace v suplementovaném médiu bez obsahu testovaných látek, bylo médium vyměněno za nové, které již obsahovalo testované látky. S řezy jsem manipulovala entomologickou pinzetou. Kultivace řezů by neměla přesáhnout 24 hod (pokles exprese a aktivity CYP, fibróza).

Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na antioxidační enzymy byl testován v závislosti na koncentraci, výsledná koncentrace studovaných látek byla 10 a 50  $\mu$ M. Kontrolní řezy byly inkubovány v přítomnosti dimethylsulfoxidu. Řezy jsem inkubovala pro danou látku/kontrolu v triplicátech (genová exprese) nebo hexaplikátech (stanovení enzymové aktivity).

#### **4.11.5 Odběr vzorku**

Inkubaci jsem ukončila po 24 hodinách a následně jsem řezy odebrala pinzetou do 1,5 ml mikrozkušavek obsahujících 200  $\mu$ l Na-fosfátového pufru 0,1 M (pH 7,4) pro stanovení aktivity enzymů (6 řezů do jedné zkumavky). Pro genovou expresi jsem odebrala vzorek do 2 ml mikrozkušavky, přidala 500  $\mu$ l Trizolu a dala na led (1 řez ve zkumavce). Mikrozkušavky jsem umístila do hlubokomrazicího boxu, kde byly uchovávány při - 80 °C.

#### **4.11.6 Příprava homogenátu a stanovení aktivity GST**

Řezy ve fosfátovém pufru jsem na ledu rozmělnila pomocí tyčinkového homogenizátoru a poté ultrazvukového hrotu (cca 10 sekund). Zbytky vaziva a potrhaných buněčných membrán jsem odstranila centrifugací (10 000 g, 20 minut, 4 °C). Výsledný homogenát jsem odebrala a rozpipetovala do plastových mikrozkušavek. Před stanovením aktivity GST jsem homogenát 3x naředila 0,1 M Na-fosfátovým pufrům (pH 7,4). Poté jsem stanovila aktivitu GST podle postupu uvedeného v kapitole 4.9. Koncentraci proteinů jsem stanovila metodou BCA (viz. kapitola 4.6) a homogenát jsem naředila 15x.

### **4.12 Stanovení genové exprese**

#### **4.12.1 Izolace RNA Trizolem**

Trizol je specifická směs fenolu a guanidinisothiokyanátu, která 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.

#### **4.12.1.1 Příprava DEPC H<sub>2</sub>O**

Jedná se o redestilovanou vodu (ddH<sub>2</sub>O) ošetřenou diethylpyrokarbonátem (DEPC) 0,1 %. Do 1 l ddH<sub>2</sub>O jsem přidala 1 ml DEPC, po protřepání nechala stát přes noc a poté provedla sterilizaci v autoklávu (120 °C, 20 min).

#### **4.12.1.2 Postup**

Těsně před izolací RNA jsem pracovní plochu postříkala a otřela detergentem RNaseZAP a vychladila centrifugu na 4 °C. Do mikrozkušavek s řezy uchovávanými v Trizolu jsem přidala nerezovou kuličku a pomocí kuličkového homogenizátoru jsem provedla homogenizaci (40 s, 6 m/s). Vzorky jsem pak nechala stát 5 min při laboratorní teplotě. Následně jsem přidala 100 µl chloroformu a třepala celý stojánek s mikrozkušavkami 15 s v ruce. Vzorky jsem nechala stát 2-3 minuty při laboratorní teplotě. Poté jsem je stočila ve vychlazené centrifuze (Heraeus) 15 minut při 12 000 g. Po stočení jsem přepipetovala horní vodnou fázi (cca 2 x 100 µl) do nových 1,5 ml zkumavek. Přepipetování jsem prováděla opatrně tak, abych se špičkou nedotkla mezifáze nebo dolní organické fáze, protože by mohlo dojít ke kontaminaci RNA genomovou DNA a proteiny. K přepipetované horní vodné fázi jsem přidala 250 µl isopropanolu a důkladně protřepala. Vzorky jsem nechala stát 10 minut při laboratorní teplotě. Mezitím jsem připravila 75 % ethanol naředěním absolutního ethanolu DEPC vodou. Vzorky jsem stočila v centrifuze (Heraeus) 10 min při 12 000 g. Zkušavky jsem vkládala do rotoru tak, aby byly všechny stejně otevřením ke středu, aby bylo jasné, kde lze předpokládat peletu RNA a nedošlo k jejímu odsátí. Poté jsem ihned slitím odstranila supernatant a omyla peletu 0,5 ml 75 % ethanolu. Vzorky jsem v ruce překlápěním promíchala a stočila ve chlazené centrifuze 5 min při 7 500 g. Skleněnou pipetou s vytaženým koncem jsem opatrně odstranila supernatant tak, aby nedošlo k odsátí pelety. Peletu jsem pak usušila na vzduchu, až začala zprůhledňovat (cca 10 min). Rozpustila jsem peletu v 50 µl DEPC vody (50 µl pro pěkně viditelnou peletu, 20 µl pro

neviditelnou) a promíchala. Vzorky jsem nechala stát asi 5 min při laboratorní teplotě a ještě jednou promíchala. Po rozpuštění jsem vzorky uložila do ledu.

#### **4.12.2 Měření koncentrace a čistoty RNA**

S sebou k měření jsem si nachystala vzorky, pipetu na malé objemy, špičky, redestilovanou vodu, čtverečky buničiny, kádinku na odpad, USB–flash disk a fix. Zapnula jsem počítač, kde jsem otevřela program NanoDrop a odklopila páčku přístroje. Nanesla jsem 2 µl vody na očištění na spodní kovový hrot a buničinou jsem pak otřela horní i dolní hrot. Otevřela se tabulka, kde jsem nastavila měření RNA. Na spodní kovový hrot jsem nanesla 2 µl vody jako blank, lehce přiklopila a změřila. Vodu jsem po změření otřela buničinou z obou hrotů. Vzorek jsem si zamíchala na třepačce a nanesla 2 µl na spodní hrot, přiklopila a změřila. Do počítače jsem napsala název vzorku. Poté jsem tímto způsobem změřila všechny vzorky. Nakonec jsem přístroj otřela a očistila 2 µl vody. Z NanoDropu jsem exportovala celou tabulku s výsledky.

V tabulce jsem vyčetla potřebné údaje a to:

- 1) koncentraci RNA;
- 2) čistotu I (kontaminace proteiny) – poměr absorbancí  $A_{260}(\text{DNA})/A_{280}(\text{proteiny})$  by měl být  $> 1,8$ ;
- 3) čistota II (kontaminace fenolem) – hodnota by se měla blížit 2, ale obvykle je kolem 1.

#### **4.12.3 Ošetření DNAsou**

Ošetření vzorků RNA DNAsou, která selektivně štěpí pouze DNA a odstraní případnou kontaminaci vzorků genomovou DNA.

##### **4.12.3.1 Zásobní roztoky**

###### DEPC H<sub>2</sub>O

Popis v kapitole 4.12.1.1.

###### 0,5 M EDTA pH 8,0

Navážila jsem 18,61 g EDTA (ethylendiamintetraacetát) a rozpustila v 80 ml DEPC vody. Následně jsem přidala 2 g NaOH pelet, míchala a měřila pH, dokud se EDTA

nerozpustila, což bylo, když se hodnota pH přibližovala hodnotě 8,0. Poté jsem doplnila vodou do 100 ml.

#### 0,1 M EDTA pH 8,0

Naředila jsem ze zásobního 0,5 M roztoku redestilovanou vodou v poměru 1:4. Použila jsem 100 µl zásobního roztoku a 400 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### **4.12.3.2 Postup**

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

4 µg RNA (přepočítané dle koncentrace)

18 µl pufru

6 µl DNase

x µl DEPC H<sub>2</sub>O (do 30 µl).

Nejprve jsem pro všechny vzorky + 2 navíc připravila mastermix, který obsahoval DEPC vodu, DNAsu a pufr, promíchala jsem ho špičkou a mírně stočila. Mastermix jsem rozpipetovala do jednotlivých 0,5 ml mikrozkušavek a přidala jsem vzorky v množství 4 µl. Vzorky jsem promíchala, stočila a nechala inkubovat v Thermomixeru 25 min při 37 °C s třepáním 400 rpm. Po inkubaci jsem vzorky uložila na led a přidala 1,5 µl 0,1 M EDTA, promíchala a mírně stočila. Poté jsem je nechala inkubovat 5 minut při 75 °C, čímž došlo k inaktivaci DNAsy. Nakonec jsem přidala 8,5 µl DEPC H<sub>2</sub>O.

Výsledná koncentrace RNA je 0,1 µg/µl. Takto ošetřená RNA je připravena pro reverzní transkripci. Vzorky se uchovávají v hlubokomrazicím boxu při -70 °C.

#### **4.12.4 Reverzní transkripce**

RNA je reverzní transkriptasou převedena na jednořetězcovou cDNA s použitím jednoho primeru.

##### **4.12.4.1 Reagencie**

Reverzní transkriptasa (RT) – ProtoScript II

Reakční pufr – je dodáván spolu s reverzní transkriptasou

DTT – 10x, dodáván s reverzní transkriptasou

Směs dNTP – 5 mM

Náhodné hexamery (N6)

DEPC H<sub>2</sub>O

#### 4.12.4.2 Postup

Připravila jsem si směs 8 µl RNA ředěné na 0,1 µg/µl a 1 µl hexamerů do 0,2 ml mikrozkušavek, ve dvou paralelních sadách pro každý vzorek, kdy jedna je na reverzní transkripci a jedna na noRT kontrolu (bez přidávané RT). Vzorky jsem promíchala na třepače a stočila.

Vzorky jsem vložila do PCR cykléru, zavřela a kolečkem utáhla víko. Poté jsem vybrala metodu PMCDNA a spustila. V cykléru se vzorky zahřívají 5 min při 65 °C. Poté jsem zkumavky umístila do chladicího stojánku a na cykléru mezitím nastavila *pause*.

Připravila jsem si mastermixy RT a noRT podle počtu vzorků (+ 1-2 navíc) dle Tab. 5.

Tabulka 5.: Složení mastermixu RT+ a noRT.

RT+	noRT
16 µl pufru 5x	16 µl pufru 5x
8 µl DTT	8 µl DTT
16 µl dNTPs	16 µl dNTPs
2 µl RT	-
14 µl H <sub>2</sub> O	16 µl H <sub>2</sub> O

Vzorky jsem vyjmula z ledu a v boxu jsem k nim přidala 11 µl mastermixu RT+ do jedné sady a 11 µl mastermixu noRT do sady druhé. Následně jsem vzorky promíchala na třepače a stočila.

Vzorky jsem dala zpět do cykléru a opět spustila metodu. Při použití náhodných hexamerů se vzorky nejprve zahřívají 10 min na 25 °C, poté se reakční směs zahřívá v PCR cykléru 50 min při 42 °C (syntéza DNA) a 5 min při 85 °C (denaturace RT).

Po reakci jsem k směsi přidala 80  $\mu$ l redestilované vody, čímž jsem zředila připravenou cDNA 5x a do následných PCR reakcí jsem přidala 5  $\mu$ l (5  $\mu$ l odpovídá 40 ng RNA) ředěné cDNA.

Takto připravenou cDNA uchováváme při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.12.5 Kvantitativní PCR v reálném čase

##### 4.12.5.1 Reagencie

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

Forward primer – ředěný na koncentraci 5  $\mu$ M

Reverse primer – ředěný na koncentraci 5  $\mu$ M

Redestilovaná voda

Ředěná cDNA (1:4)

##### 4.12.5.2 Postup

Nejprve jsem si do 0,5 ml plastových mikrozkušavek napipetovala mastermix pro cílový gen a mastermix pro referenční gen. Struktura použitých primerů je v Tab. 7.

Příprava qPCR směsi při finální koncentraci primerů 250 nM byla provedena podle Tab. 6.

Tabulka 6.: SYBR qPCR Master Mix.

SYBR qPCR Master Mix	1X	250 nM Pro x reakcí - Ref. gen	250 nM Pro x reakcí – Cíl. gen
voda	4,2	109,2	75,6
2 X SG mix	10,0	260,0	180,0
F Primer (5 $\mu$ M)	0,4	10,4	7,2
R Primer (5 $\mu$ M)	0,4	10,4	7,2
Smíchat MasterMix a pipetovat 15 $\mu$ l do stripů			
cDNA (ředěná 1:4)	5,0	-	-
Celkem	20,0	-	-

X = 26

X=18

Směs mastermixu jsem rozpipetovala po 15  $\mu$ l do PCR destiček. Poté jsem přidala 5  $\mu$ l ředěné cDNA v duplikátech, pro NTC jsem pipetovala 5  $\mu$ l vody. noRT cDNA jsem zhotovila jen pro referenční gen a jen jednou.

PCR destičku jsem uzavřela folií, důkladně utěsnila a stočila v centrifuze s výkyvným rotorem pro destičky. Destičku jsem poté vložila do PCR cykléru a spustila program QuantStudio 6, kde jsem popsala vzorky a jejich rozložení. Zkontrolovala jsem průběh fluorescenčních křivek, křivky tání a data exportovala do Excelu.

Výpočet jsem provedla podle metody „Comparative Ct“ dle vzorce.

$$2^{(-\Delta Cq)} \quad (\Delta Cq = Cq(TG) - Cq(RG))$$

kde *TG* představuje cílový gen a *RG* referenční gen. Geometrický průměr Ct hodnot genů ACTB a YWHAZ jsem použila jako referenční gen. Tyto geny byly vyhodnoceny jako nejstabilnější v programu RefFinder.

Použité primery (Tab. 7) navrhla doc. Petra Matoušková v programu Primer3 a společnost Geneti Biotech (Hradec Králové) je nasyntetizovala a dodala. Funkčnost a účinnost těchto primerů před použitím ověřil PharmDr. Tomáš Zárybnický, Ph.D.

### 4.13 Statistické zpracování výsledků

Vzorky jsem měřila vždy alespoň v triplikátech a každé stanovení jsem provedla alespoň třikrát. Výsledky jsem vyjádřila jako průměr  $\pm$  SD. Statistické hodnocení rozdílů mezi skupinami jsem provedla pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým testem v programu GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Rozdíly jsou považovány za významné, když  $p < 0,05$  a jsou v grafu označeny \*.

Tabulka 7.: Struktura použitých primerů.

Zkratka	Číslo v genové bance	Název genu	Fyziologická funkce	Sekvence primerů 5'-3'
<b>Cílové geny</b>				
GSTA1	NM_145740.5	Glutathion-S-transferasa $\alpha$	Detoxikace elektrofilních látek, ochrana před ROS a produkty peroxidace	F: CGCTACTTCCCTGCCTTTGA R: GCCCGGCTCAGCTTGTG
GSTP1	NM_000852.4	Glutathion-S-transferasa $\pi$	Metabolismus xenobiotik	F: AGCCTTTTGAGACCCTGCTG R: GTCAGCGAAGGAGATCTGGTC
GPx1	NM_201397.3	Glutathionperoxidasa 1	Ochrana před oxidačním stresem – odstranění H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	F: TATCGAGAATGTGGCGTCCC R: TCTTGGCGTTCTCCTGATGC
GPx2	NM_002083.4	Glutathionperoxidasa 2	Ochrana před oxidačním stresem	F: GCACCTTCCCAACCATCAAC R: GCAACTTAAAGGAGCGCTT
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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	F: GAGAAGTGCGGAGATTCAACAC R: TCACATAGAATGCCCGCACC
GR	NM_000637.5	Glutathionreduktasa	Udržování glutathionu v redukovaném stavu	F: TGCGTGAATGTTGGATGTGT R: CCCTCACAACCTGGAAAGCC
<b>Referenční geny pro normalizaci mRNA</b>				
ACTB	NM_001101.4	$\beta$ -aktin	Strukturní protein cytoskeletu	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGAG R: CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
YWHAZ	NM_003406.3	Tyrosin-3-monooxygenasa/tryptofan-5-monooxygenasa aktivační protein $\zeta$	Součást celé řady signálních drah	F: TGATCCCCAATGCTTCACAAG R: GCCAAGTAACGGTAGTAATCTCC



## 5. VÝSLEDKY

V experimentální části práce jsem nejprve sledovala vliv pěti bicyklických monoterpenů v koncentraci 100  $\mu$ M na aktivitu hlavních antioxidačních enzymů v jaterním cytosolu získaném od šesti pacientů. Konkrétně se jednalo o dva isomery kafru ((*1R*)-(+)-kafr a (*1S*)-(-)-kafr), kamfen, (-)-fenchon a (-)- $\alpha$ -thujon. Na základě získaných výsledků jsem vybrala nejúčinnější monoterpen.

V další části práce jsem použila komplexnější modelový systém, kterým byly ultratenké jaterní řezy (PCLS) získané od tří pacientů. Výhodou tohoto modelu je zachování struktury tkáně, kde jsou přítomny všechny typy buněk typické pro danou tkáň. Interakce mezi buňkami a mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou jsou rovněž neporušeny. PCLS tedy napodobují funkci jater a je možné s pomocí nich studovat změny v genové i proteinové expresi a v aktivitě enzymů metabolických drah. Jsou rovněž vhodným modelem pro studium jaterních onemocnění, jako jsou alkoholická a nealkoholická steatohepatitida, virová hepatitida či nádory (Palma et al. 2019). V této části práce jsem sledovala vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na aktivitu GST a expresi mRNA osmi hlavních isoform antioxidačních enzymů, které jsou exprimovány v játrech.

### 5.1 Vliv monoterpenů na aktivitu antioxidačních enzymů v lidském jaterním cytosolu

Sledovala jsem vliv bicyklických monoterpenů na aktivitu čtyř antioxidačních enzymů, konkrétně se jednalo o GST, GPx, GR a CAT. Všechny monoterpeny byly testovány v koncentracích 100  $\mu$ M. Aktivitu ve vzorcích obsahujících monoterpeny jsem porovnávala s aktivitou v kontrolních vzorcích. Stanovení aktivity probíhalo sledováním vzrůstu nebo poklesu absorbance. Z naměřené absorbance jsem vypočítala aktivitu enzymu, kterou jsem vztáhla na množství proteinu a získala tak specifickou aktivitu enzymu a její hodnoty zanesla do grafu. Specifická aktivita v kontrolních vzorcích byla vyjádřena jako 100 %.

V následujících kapitolách diplomové práce, jsou na obrázcích vždy znázorněny změny aktivity antioxidačních enzymů vlivem jednotlivých bicyklických monoterpenů. K vyhodnocení jsem využívala statistické analýzy, které jsem získala v programu GraphPad Prism pomocí jednocestné ANOVy (one-way ANOVA). Statisticky významné

změny jsou v obrázcích označeny \*. Data jsou v grafech prezentována v rozsahu 80-125 %, aby byl lépe patrný vliv daných látek na aktivitu enzymů.

Mezi jednotlivými pacienty jsou patrné interindividuální rozdíly.

### 5.1.1 Vliv monoterpenů na aktivitu glutathionreduktasy

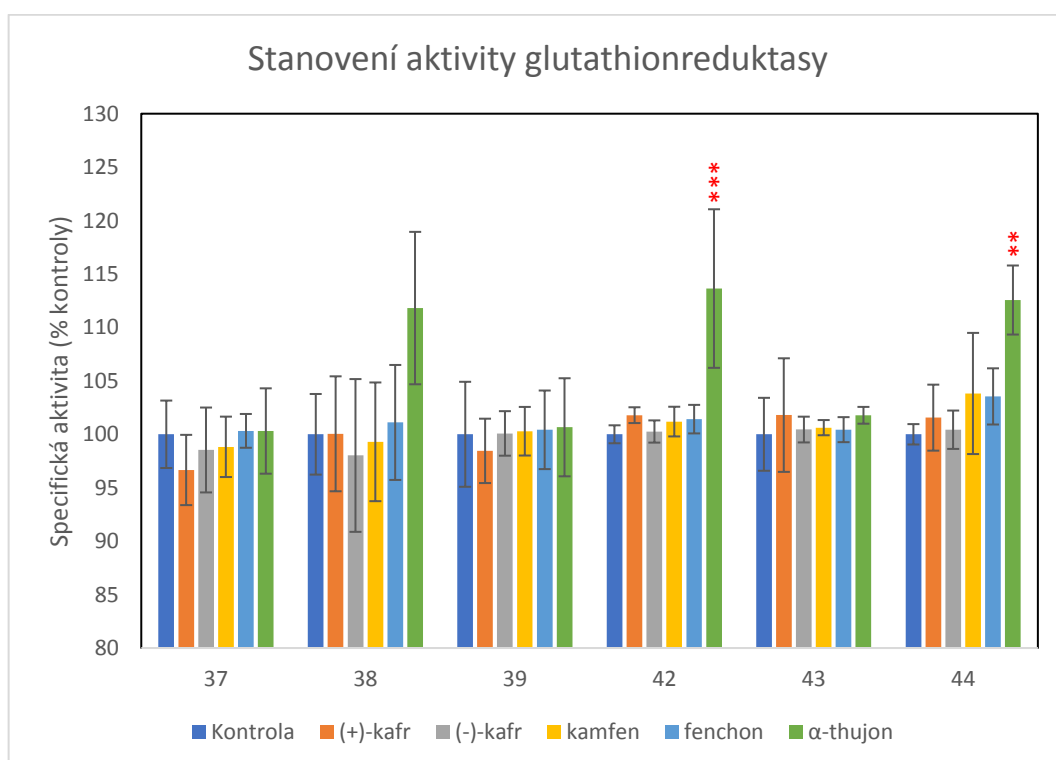
Ze zjištěných výsledků (Obr. 19) je patrné, že vliv monoterpenů (+)-kafru, (-)-kafru, kamfenu a (-)-fenchonu na aktivitu glutathionreduktasy (GR) je nevýznamný. Rozdíl vůči kontrole se pohyboval pouze v rozmezí  $\pm 4\%$ .

Jediný statisticky významný vliv vykazoval (-)- $\alpha$ -thujon, který u pacientů 38, 42 a 44 vyvolal zvýšení aktivity GR.

U pacienta 38 (-)- $\alpha$ -thujon mírně zvýšil aktivitu GR o 11,8 %, nicméně se nejedná o statisticky významné zvýšení aktivity.

U pacienta 42 (-)- $\alpha$ -thujon však vykázal statisticky významné zvýšení aktivity ve srovnání s kontrolou o 13,6 %, se statistickou pravděpodobností 99,9 % ( $p < 0,001$ , \*\*\*).

U pacienta 44 (-)- $\alpha$ -thujon vykázal statisticky významné zvýšení aktivity ve srovnání s kontrolou o 12,6 %, se statistickou pravděpodobností 99 % ( $p < 0,01$ , \*\*).



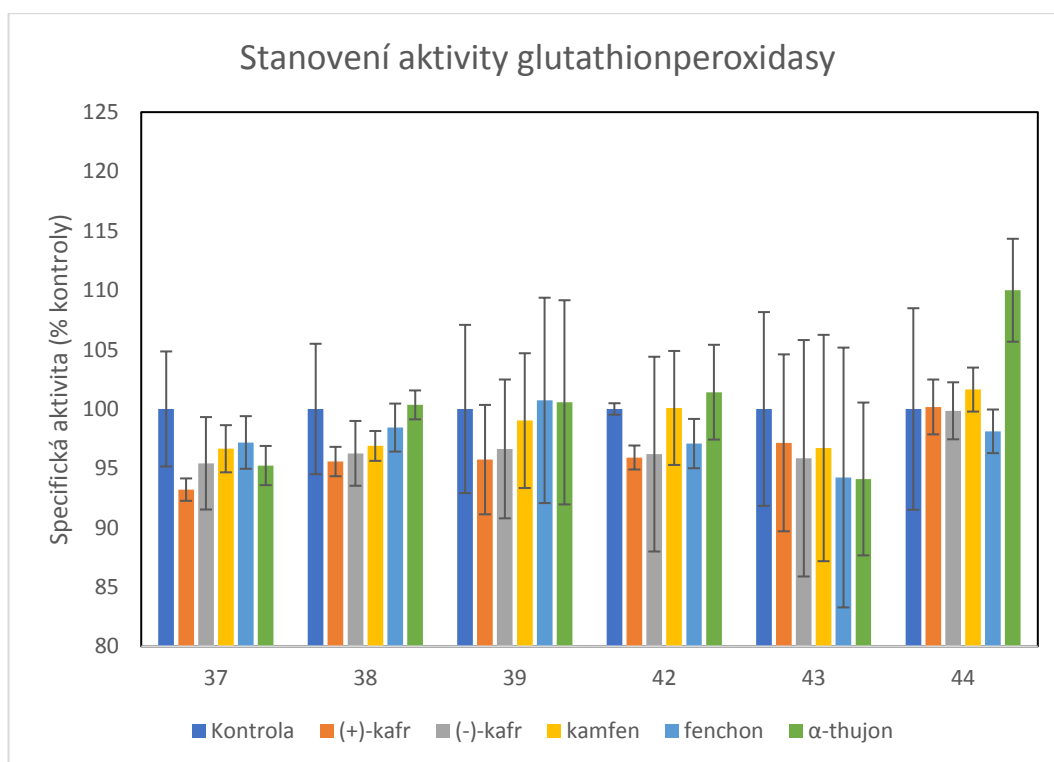
Obrázek 19.: Grafické zobrazení vlivu bicyklických monoterpenů na specifickou aktivitu GR u 6 dárců. Každý sloupec představuje průměr ze tří měření  $\pm$  SD. Skupiny označené \*\* a \*\*\* se signifikantně liší od kontroly ( $p < 0,01$  a  $p < 0,001$ ).

### 5.1.2 Vliv monoterpenů na aktivitu glutathionperoxidasy

Účinek monoterpenů na aktivitu glutathionperoxidasy (GPx) nebyl statisticky významný u žádného z pacientů, přesto ale lze ve výsledcích nalézt určité změny aktivity (Obr. 20).

U většiny pacientů bylo patrné snížení aktivity glutathionperoxidasy, které se pohybovalo v rozmezí od 5–7 % nebo nedošlo k žádné změně aktivity vůči kontrole. Zvýšení aktivity GPx bylo pozorováno pouze u jednoho pacienta, a to vlivem monoterpenů (-)- $\alpha$ -thujonu. Jednalo se o pacienta 44, u kterého toto zvýšení aktivity činilo 10 %, nicméně tato hodnota není statisticky významná.

Závěrem je možné shrnout, že v případě stanovení aktivity glutathionperoxidasy nebyla nalezena žádná statisticky významná změna aktivity vůči kontrole.



Obrázek 20.: Grafické zobrazení vlivu bicyklických monoterpenů na specifickou aktivitu GPx u 6 dárců. Každý sloupec představuje průměr ze tří měření  $\pm$  SD.

### 5.1.3 Vliv monoterpenů na aktivitu glutathion-S-transferasy

Při sledování účinku monoterpenů na aktivitu glutathion-S-transferasy (GST) bylo možné pozorovat několik případů, kdy výsledné hodnoty vykazovaly statisticky výrazné změny.

U pacienta 37 se aktivita GST mění napříč jednotlivými monoterpeny. Nejmenší změnu, která se vešla do 4 %, vykazaly (+)-kafr, (-)-kafr a kamfen. (-)-Fenchon vykázal statisticky významné zvýšení aktivity, které odpovídá 6,9 % vůči kontrole. (-)- $\alpha$ -Thujon vykázal taktéž statisticky významné zvýšení aktivity, které dosahuje navýšení o 10,1 % vůči kontrole.

U pacienta 38 pak došlo k statisticky významnému zvýšení aktivity u kamfenu, které odpovídalo 3,7 % vůči kontrole. Dále vykázal zvýšení aktivity (-)-fenchon a (-)- $\alpha$ -thujon, a to o 6,3 % respektive 8,2 %, což lze také vyhodnotit jako statisticky významné změny.

U pacienta 39 bylo sledováno významné zvýšení aktivity opět u kamfenu, které bylo o 9,1 %. Dále pak aktivitu GST zvýšil (-)-fenchon a (-)- $\alpha$ -thujon, o 14 % respektive 15,7 %. Všechny tyto změny byly považovány za statisticky významné.

U pacienta 42 došlo k statisticky významnému zvýšení aktivity o 6,3 %, a to u (-)-fenchonu a o 5 % u (-)- $\alpha$ -thujonu.

U pacienta 43 vykázal statisticky významné zvýšení aktivity rovněž (-)-fenchon o 6,2 % a (-)- $\alpha$ -thujon o 7,7 %.

U pacienta 44 bylo možné pozorovat statisticky významné zvýšení aktivity opět u (-)-fenchonu, a to o 5,6 %. Také (-)- $\alpha$ -thujon vykázal zvýšení, které bylo 12,2 %.

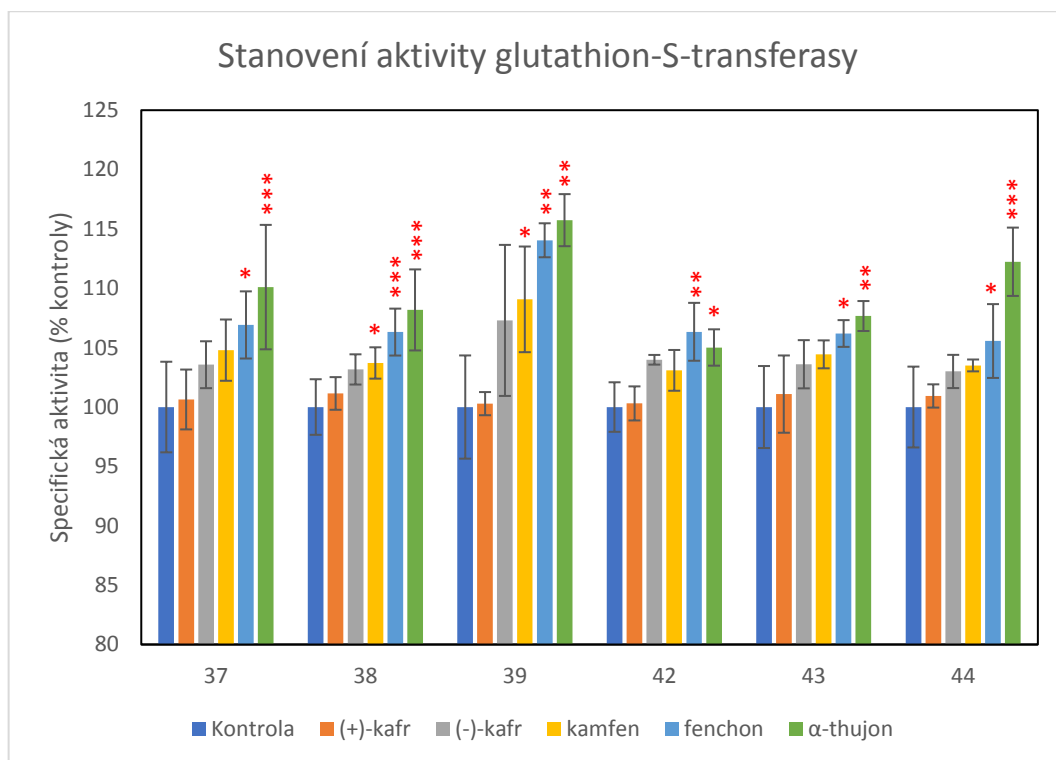
Vliv všech ostatních monoterpenů na aktivitu GST nevykazoval žádné změny vůči kontrole nebo pouze nesignifikantní zvýšení.

Významné zvýšení aktivity vlivem kamfenu je u pacientů 38 a 39 možno vyjádřit se statistickou pravděpodobností 95 % ( $p < 0,05$  \*).

Pro všechny naměřené hodnoty se změna aktivity u (-)-fenchonu jeví statisticky významná s pravděpodobností sahající v rozmezí 95 – 99,9 % ( $p < 0,05$  \* -  $p < 0,001$  \*\*\*).

Pro všechny naměřené hodnoty monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujon se taktéž jeví zvýšení aktivity statisticky významné a dominuje pravděpodobnost 99,9 % ( $p < 0,001$  \*\*\*) u třech pacientů.

Detailní znázornění signifikantních změn s je uvedeno na Obr. 21.

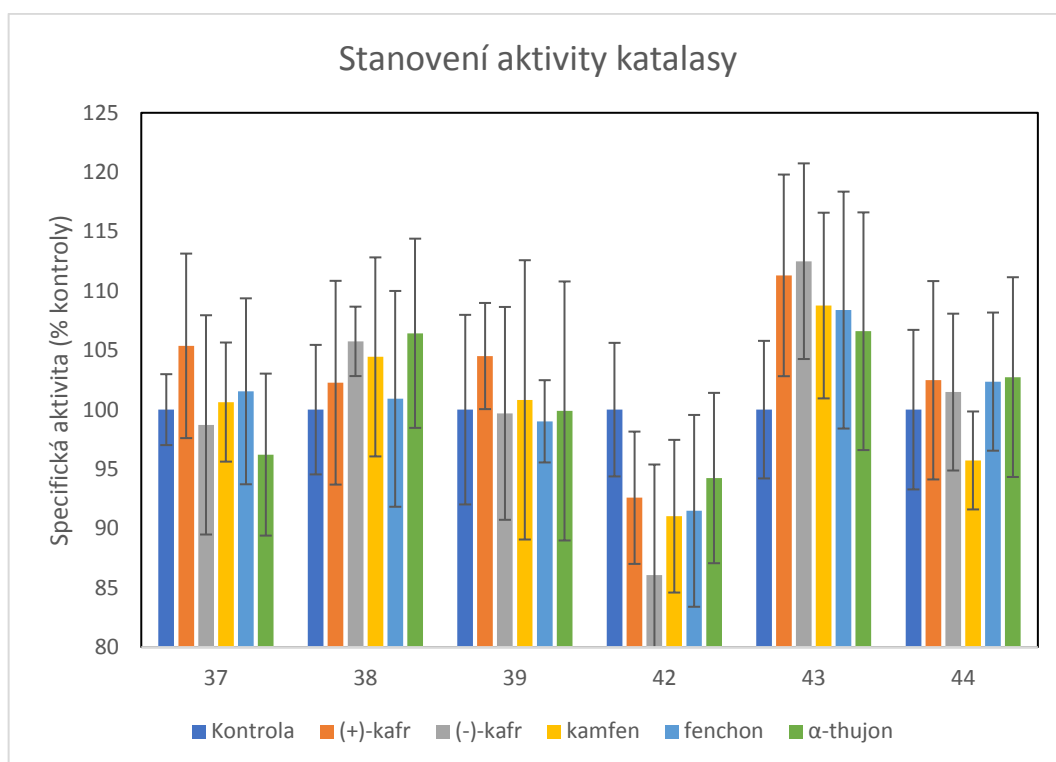


Obrázek 21.: Grafické zobrazení vlivu bicyklických monoterpenů na specifickou aktivitu GST u 6 dárců. Každý sloupec představuje průměr ze tří měření  $\pm$  SD. Skupiny označené \*/\*\*/\*\* se signifikantně liší od kontroly ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  a  $p < 0,001$ ).

### 5.1.4 Vliv monoterpenů na aktivitu katalasy

V případě stanovení aktivity katalasy (CAT) můžeme pozorovat rozdílné projevy změny aktivity, nicméně žádná není signifikantní (Obr. 22). Zatímco u pacienta 42 způsobili všechny monoterpeny pokles aktivity CAT o 5,8 – 13,9 %, tak u pacienta 43 došlo naopak vlivem všech studovaných látek ke zvýšení aktivity o 6,6 – 12,5 % ve srovnání s kontrolou. V obou případech byl neúčinnější sloučeninou (-)-kafr.

Závěrem je možné říci, že v případě stanovení aktivity katalasy nebyla nalezena žádná statisticky významná změna aktivity vůči kontrole.



Obrázek 22.: Grafické zobrazení vlivu bicyckých monoterpenů na specifickou aktivitu CAT u 6 dárců. Každý sloupec představuje průměr ze tří měření  $\pm$  SD.

### 5.1.5 Závěr

Ze zkoumaných změn aktivit vlivem jednotlivých monoterpenů vyplývá, že největší vliv na aktivitu vykazuje (-)- $\alpha$ -thujon. Z tohoto důvodu jsem se v další části experimentální práce zaměřila právě na tento bicycký monoterpen.

## **5.2 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na aktivitu GST a expresi mRNA antioxidantních enzymů v ultratenkých lidských jaterních řezech**

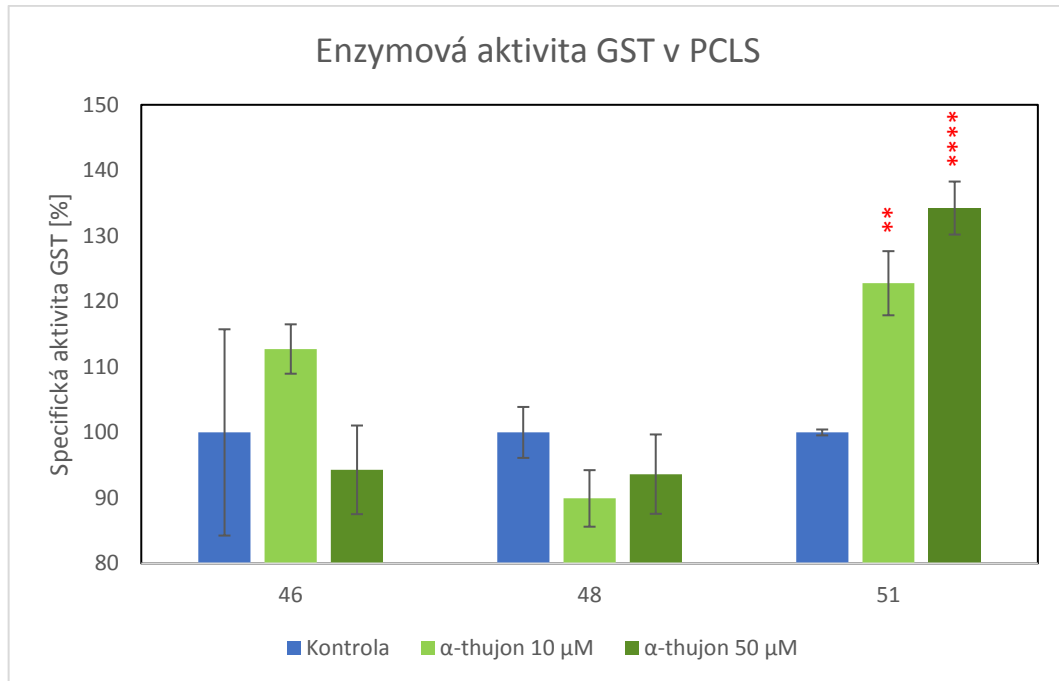
Lidské PCLS jsem inkubovala s DMSO (kontrola) nebo roztokem monoterpenů (-)- $\alpha$ -thujonu ve finálních koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M při 37 °C po dobu 24 hodin. Pro stanovení enzymové aktivity byly vzorky inkubovány v hexaplikátech. Stanovovala jsem pouze aktivitu GST, která byla působením této látky nejvíce ovlivněna v lidském jaterním cytosolu. Enzymovou aktivitu GST jsem stanovovala spektrofotometrickou metodou za použití univerzálního substrátu CDNB. Tato metoda je založena na detekci 2,4-dinitrobenzylglutathionu, což je produkt reakce katalyzované GST (Habig et al. 1974, Lněničková et al. 2017).

Vzorky pro měření exprese mRNA antioxidantních enzymů jsem inkubovala vždy v triplicátech. Sledovala jsem relativní genovou expresi následujících 8 vybraných zástupců: GSTA1, GSTP1, GPx1, GPx2, GPx4, GR, CAT a SOD. Pro stanovení relativního množství mRNA cílových genů jsem použila komparativní  $\Delta C_T$  metodu. Jako referenční gen jsem použila geometrický průměr ACTB a YWHAZ.



### 5.2.1 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na enzymovou aktivitu GST v PCLS

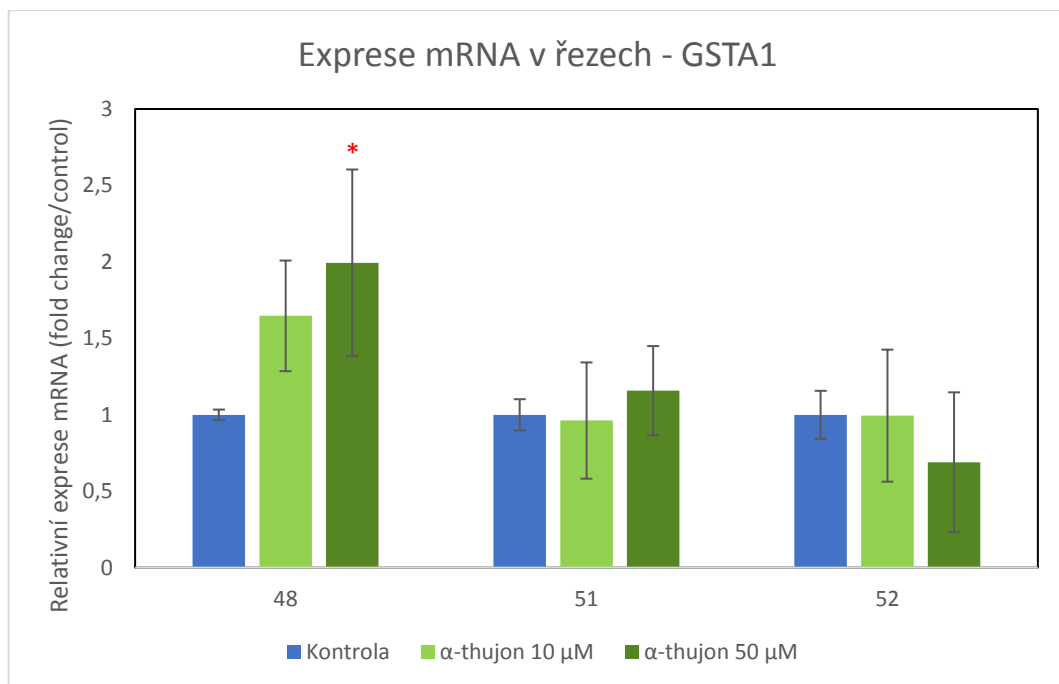
Na Obr. 23 je graf popisující enzymovou aktivitu GST v PCLS z jaterních vzorků pacientů 46, 48 a 51. Řezy ovlivněné (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M vykazovaly u pacientů interindividuální rozdíly. Jediná statisticky významná změna proběhla u pacienta 51, kde lze vidět zvýšení aktivity GST jak u 10  $\mu$ M, tak u 50  $\mu$ M koncentrace (-)- $\alpha$ -thujonu a to o 22,8 % ( $p < 0,01$  \*\*) resp. o 34,2 % ( $p < 0,0001$  \*\*\*\*).



Obrázek 23.: Specifická aktivita GST v lidských ultratenkých jaterních řezech ovlivněných (-)- $\alpha$ -thujonem. Každý sloupec představuje průměr ze tří měření  $\pm$  SD. Hvězdičky znázorňují hodnoty, které se významně liší od kontroly a jsou statisticky významné ( $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,0001$  \*\*\*\*).

### 5.2.2 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GSTA1 v PCLS

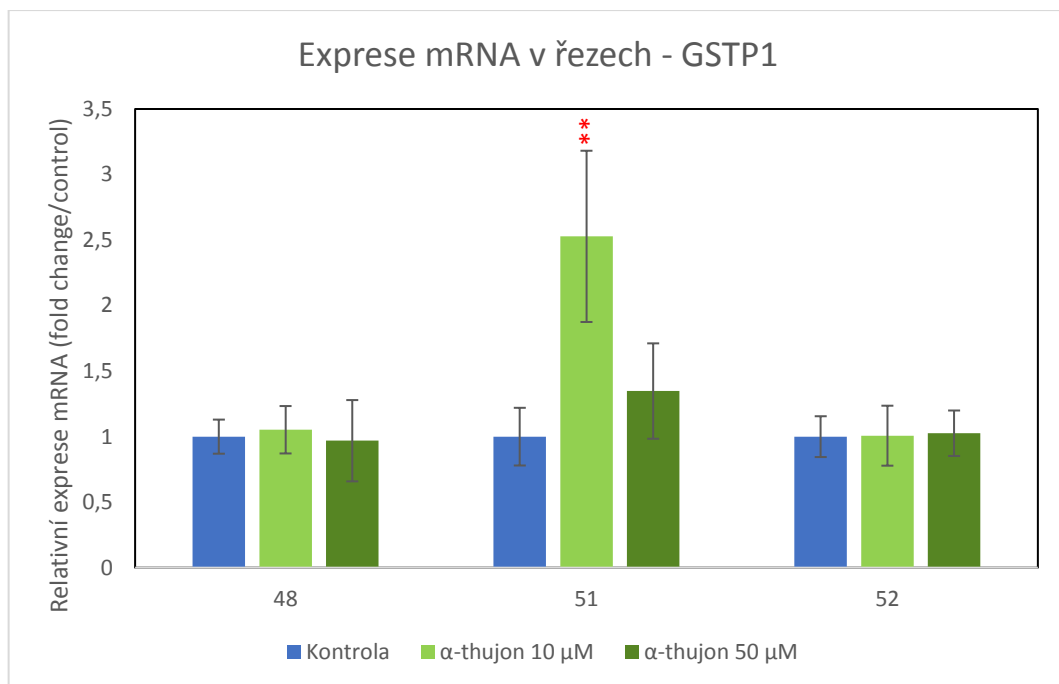
Na Obr. 24 je uveden vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GSTA1. Řezy ovlivněné (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M vykazovaly u pacienta 48 zvýšení u obou koncentrací použitého (-)- $\alpha$ -thujonu, a to 1,6x, respektive 2x. Vyšší z hodnot představovala statisticky významný vliv s pravděpodobností 95 % ( $p < 0,05$  \*). V případě ostatních pacientů došlo jen k malým změnám oproti kontrole, které však nebyly statisticky významné.



Obrázek 24.: Vliv bicyckického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GSTA1. Relativní exprese genu GSTA1 byla normalizována na geometrický průměr referenčních genů ACTB a YWHAZ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Hvězdičky znázorňují hodnoty, které se signifikantně liší od kontroly a jsou statisticky významné ( $p < 0,05$  \*).

### 5.2.3 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GSTP1 v PCLS

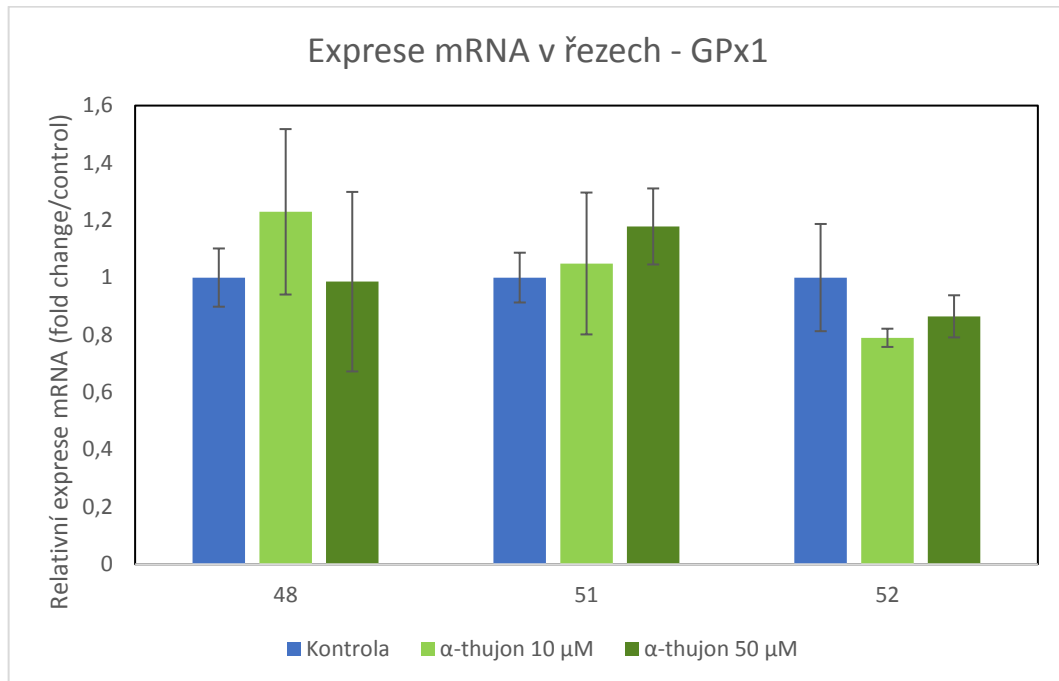
Na Obr. 25 je uveden vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GSTP1. Řezy ovlivněné (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M vykazovaly zvýšení aktivity pouze u pacienta 51. V případě 10  $\mu$ M koncentrace (-)- $\alpha$ -thujonu u pacienta 51 došlo k zvýšení 2,5x vůči kontrole, což má statistický význam s pravděpodobností 99 % ( $p < 0,01$  \*\*). U druhé měřené koncentrace bylo zvýšení exprese pouze 1,3x. U pacientů 48 a 52 nebyly pozorovány změny v expresi GSTP1.



Obrázek 25.: Vliv bicycklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GSTP1. Relativní exprese genu GSTP1 byla normalizována na geometrický průměr referenčních genů ACTB a YWHAZ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Hvězdičky znázorňují hodnoty, které se signifikantně liší od kontroly a jsou statisticky významné ( $p < 0,01$  \*\*).

#### 5.2.4 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GPx1 v PCLS

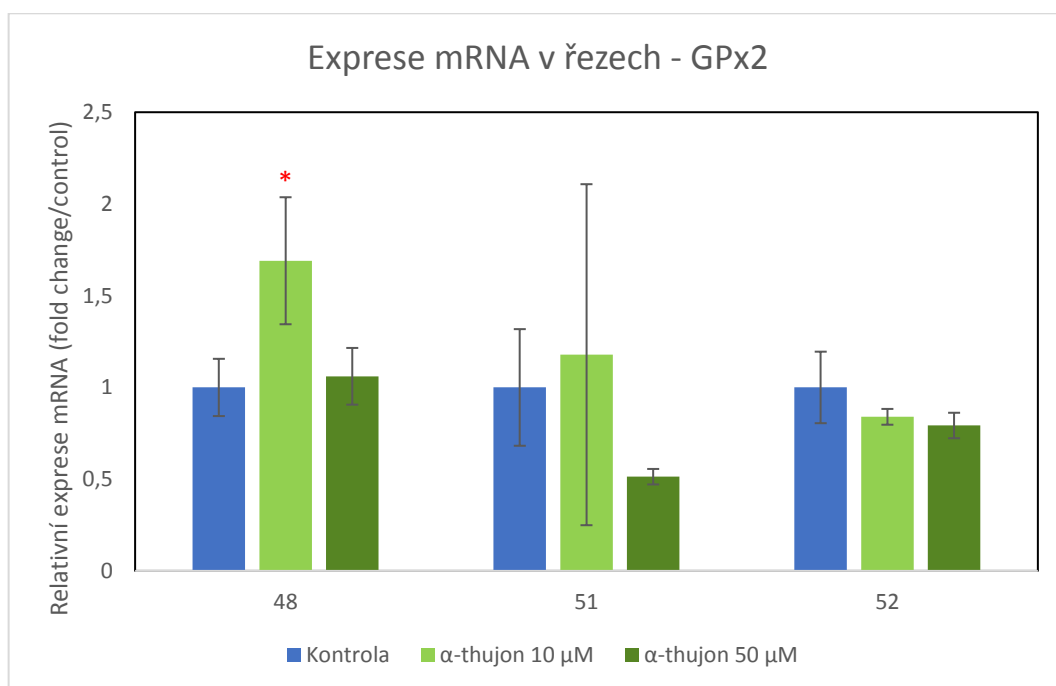
Na Obr. 26 je uveden vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx1. Řezy ovlivněné (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M vykazovaly pouze mírné zvýšení či snížení exprese (pacienti 48 a 51 vs. pacient 52). Nicméně se v ani jednom případě nejedná o statisticky významný vliv.



Obrázek 26.: Vliv bicyckického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx1. Relativní exprese genu GPx1 byla normalizována na geometrický průměr referenčních genů ACTB a YWHAZ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

### 5.2.5 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GPx2 v PCLS

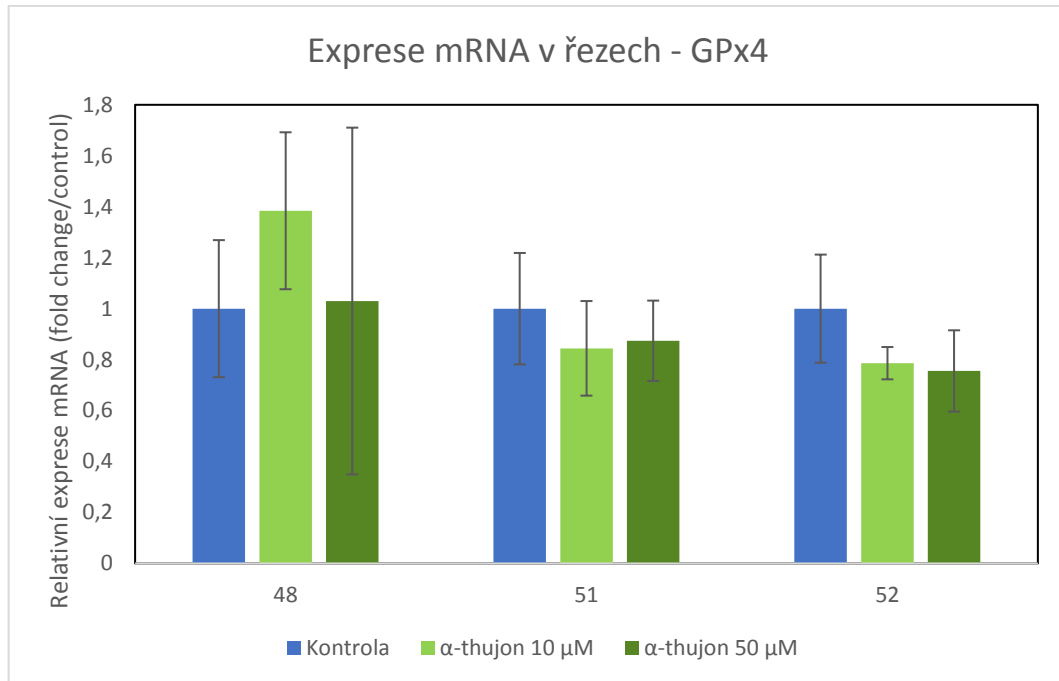
Na Obr. 27 je uveden vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx2. U pacienta 48 došlo ke zvýšení exprese mRNA 1,7x u 10  $\mu$ M koncentrace (-)- $\alpha$ -thujonu, což má statisticky významný vliv s pravděpodobností 95 % ( $p < 0,05$  \*). V případě pacienta 51 došlo k zvýšení 1,2x vlivem 10  $\mu$ M (-)- $\alpha$ -thujonu, ale díky velké variabilitě mezi jednotlivými biologickými replikáty se nejedná o statisticky významný vliv. U pacienta 51 došlo zároveň vlivem 50  $\mu$ M (-)- $\alpha$ -thujonu ke snížení exprese mRNA GPx2 o 48,6 % oproti kontrole, ale tento účinek nebyl statisticky významný.



Obrázek 27.: Vliv bicyckického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx2. Relativní exprese genu GPx2 byla normalizována na geometrický průměr referenčních genů ACTB a YWHAZ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Hvězdičky znázorňují hodnoty, které se signifikantně liší od kontroly a jsou statisticky významné ( $p < 0,05$  \*).

### 5.2.6 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GPx4 v PCLS

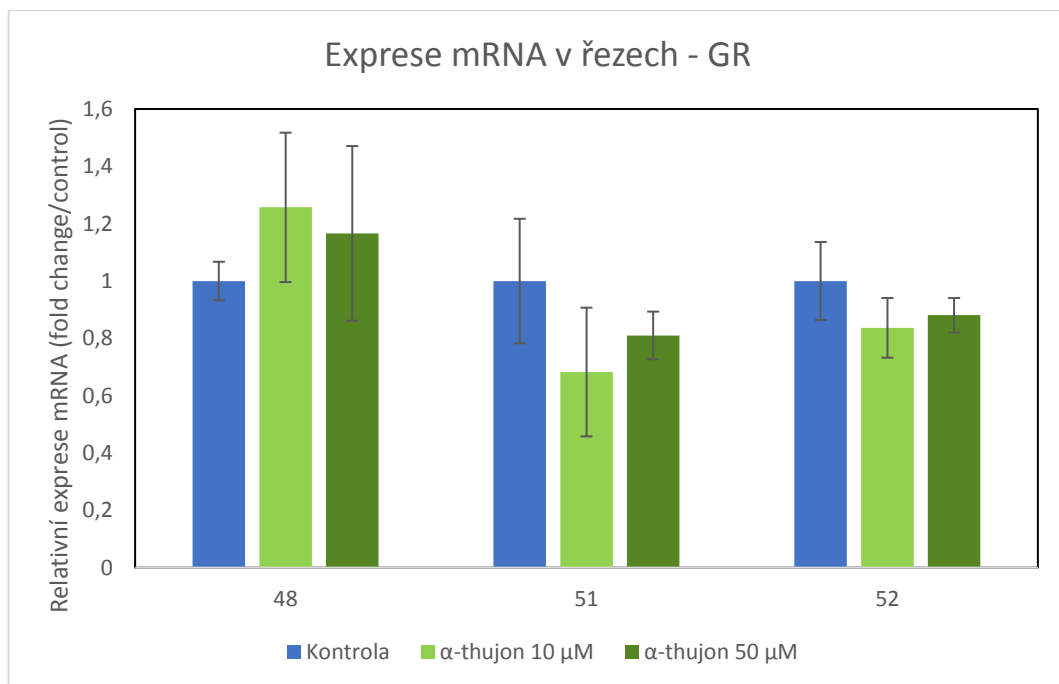
Na Obr. 28 je uveden vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx4. Řezy ovlivněné (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M nevykazovaly žádnou statisticky významnou změnu oproti kontrole. V případě pacienta 48 se zdá, že 10  $\mu$ M (-)- $\alpha$ -thujon měl na expresi GPx4 větší vliv a došlo k zvýšení 1,4x, nicméně tato hodnota byla nesignifikantní vlivem velké variability mezi biologickými replikáty.



Obrázek 28.: Vliv bicyckického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx4. Relativní exprese genu GPx4 byla normalizována na geometrický průměr referenčních genů ACTB a YWHAZ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

### 5.2.7 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi GR v PCLS

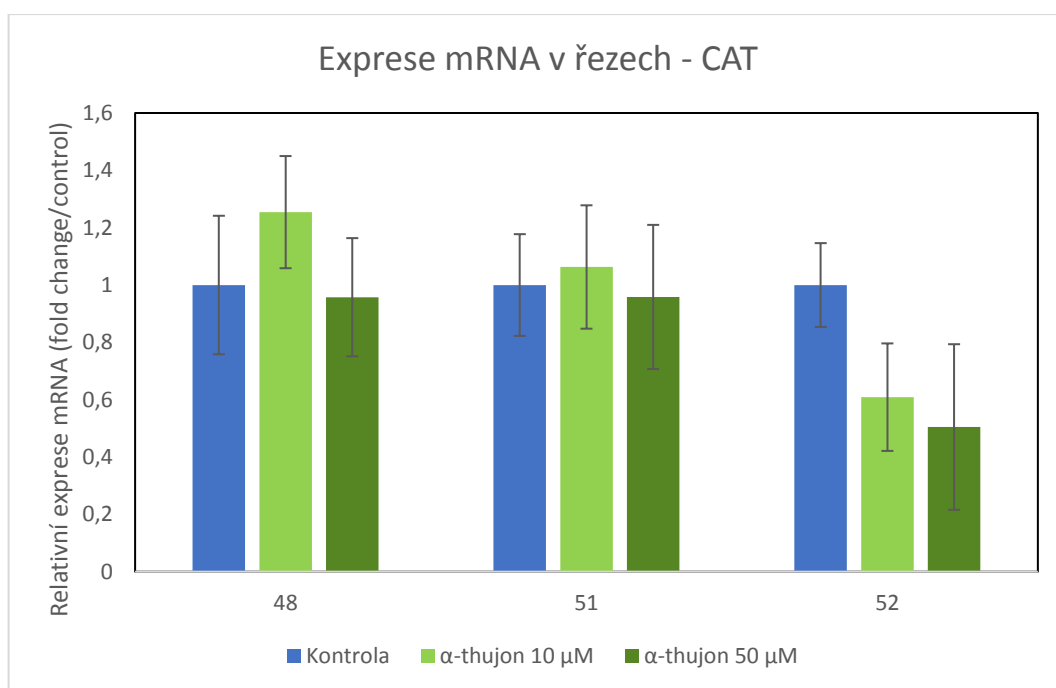
Na Obr. 29 je uveden vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GR. Řezy ovlivněné (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M nevykazovaly žádnou statisticky významnou změnu, oproti kontrole. V případě pacienta 48 došlo v obou měřených koncentracích k mírnému zvýšení exprese mRNA, a to o 1,3x respektive 1,2x, ale oba tyto výsledky nejsou statisticky významné. U pacienta 51 došlo k nevýznamnému snížení mRNA exprese.



Obrázek 29.: Vliv bicyckického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GR. Relativní exprese genu GR byla normalizována na geometrický průměr referenčních genů ACTB a YWHAZ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

### 5.2.8 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi CAT v PCLS

Na Obr. 30 je uveden vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi CAT. Řezy ovlivněné (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M nevykazovaly žádnou statisticky významnou změnu oproti kontrole. V případě pacienta 48 došlo k malému zvýšení genové exprese vlivem 10  $\mu$ M (-)- $\alpha$ -thujonu, a to 1,3x, oproti kontrole. U pacienta 52 došlo vlivem (-)- $\alpha$ -thujonu 10  $\mu$ M resp. 50  $\mu$ M k poklesu exprese CAT o 39,1 resp. 49,5 %. Ani v jednom případě se však nejednalo o statisticky významný vliv.



Obrázek 30.: Vliv bicyckického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi CAT. Relativní exprese genu CAT byla normalizována na geometrický průměr referenčních genů ACTB a YWHAZ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ( $n=3$ ).



### 5.2.9 Vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na mRNA expresi SOD v PCLS

Na Obr. 31 je uveden vliv (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi SOD. Řezy ovlivněné (-)- $\alpha$ -thujonem v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M nevykazovaly žádnou statisticky významnou změnu oproti kontrole. V případě pacienta 48 bylo možné pozorovat zvýšení exprese SOD vlivem 10  $\mu$ M (-)- $\alpha$ -thujonu, a to 1,4x, ale vzhledem k větším odchýlkám mezi replikáty se nejedná o statisticky významný vliv. I v koncentraci 50  $\mu$ M vykazoval (-)- $\alpha$ -thujon mírné zvýšení exprese SOD a stejně tak u pacienta 51. Naproti tomu u pacienta 52 došlo vlivem  $\alpha$ -thujonu k poklesu exprese SOD o 29,4 resp. 42,7 %.



Obrázek 31.: Vliv bicyckického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi SOD. Relativní exprese genu SOD byla normalizována na geometrický průměr referenčních genů ACTB a YWHAZ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

## 6. DISKUSE

Rostliny hrály významnou úlohu při udržování lidského zdraví a zlepšovaly kvalitu života po tisíce let. Sloužily lidem jako cenné složky koření, nápojů, barviv, kosmetiky a léčiv. Světová zdravotnická organizace (WHO) odhaduje, že přibližně 80 % světové populace se spoléhá na tradiční medicínu jako jejich primární zdravotní péči. Většina z těchto terapeutických režimů zahrnuje použití rostlinných extraktů nebo jejich aktivních složek, jako například terpenů (Wagner et al. 2003).

Terpeny jsou skupinou látek, které se vyskytují téměř v každé přírodní potravě. Jednou z jejich hlavních podtříd jsou monoterpeny, které jsou uváděny jako látky prospěšné pro zlepšení a hlavně udržení plného zdraví. V přírodě jsou terpeny zapojeny do téměř každé interakce mezi rostlinou a živočichem, rostlinou a rostlinou nebo rostlinou a mikroorganismy. Zastupují roli feromonů, fytoalexinů a obrany proti škůdcům. Aby bylo možné hovořit o jejich prospěšnosti, musí být prokázán významný dopad látky na lidský metabolismus nebo dobře definované biomarkery (Wagner et al. 2003).

Nicméně několik studií ukázalo, že některé monoterpeny (např. pulegon, menthofuran, kafr a limonen) vykazovaly hepatotoxicitu, která je způsobena hlavně tvorbou reaktivních metabolitů, zvýšením koncentrací reaktivních forem kyslíku a zhoršenou antioxidační obranou (Zárybnický et al. 2018).

Oxidační stres vede k narušení rovnováhy mezi produkcí intracelulárních reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejich destrukcí enzymovými a neenzymovými antioxidačními systémy. Zastává také klíčovou roli v patogenezi mnoha onemocnění, včetně neurodegenerativních, kardiovaskulárních a renálních onemocnění, rakoviny a chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN). Nekontrolovatelná nadměrná produkce ROS může poškodit buněčné struktury a vést ke ztrátě homeostázy a narušení normálních funkcí. Bylo zjištěno, že antioxidanty jsou účinné při prevenci a oddálení škodlivých účinků ROS. Byly identifikovány různé třídy přírodních produktů, které vystupují jako kandidátní antioxidanty s potenciálním terapeutickým použitím při onemocněních spojených s oxidačním stresem (Liguori et al. 2018, Porres-Martínez et al. 2016). Jednou ze skupin vykazujících tyto účinky jsou právě monoterpeny, na které jsem se zaměřila v experimentální části této diplomové práce.

V současné době existuje velký zájem o nalezení nových a bezpečných antioxidantů z přírodních zdrojů. Především kvůli jejich účinku v prevenci oxidačního poškození živých buněk. Antioxidanty lze považovat za tzv. chemické pohlcovače energie a elektronů, které jsou schopné vychytávat a eliminovat ROS, chelatovat ionty přechodných kovů a tím bránit tvorbě ROS (Aazza et al. 2011).

Jedním z cílů této diplomové práce bylo sledování účinků vybraných bicyklických monoterpenů (+)-kafru, (-)-kafru, (-)-fenchonu, kamfenu a (-)- $\alpha$ -thujonu na aktivitu antioxidantních enzymů glutathionperoxidasy, glutathionreduktasy, glutathion-S-transferasy a katalasy v lidském jaterním cytosolu. O biologické aktivitě zmíněných monoterpenů víme mnoho, ovšem o jejich vlivu na antioxidantní enzymy jsem v dostupných studiích nalezla velmi málo.

Sheweita et al. (2016) se ve své studii zabývali zkoumáním úlohy silic extrahovaných z fenyklu, kmínu a hřebíčku jako přírodních antioxidantů při zmírňování hepatotoxicity vyvolané cyklofosfamidem (CP). Aplikace CP jako protinádorového léčiva je často omezena kvůli jeho toxicitě. Údaje publikované v této studii ukázaly, že léčba myších samců cyklofosfamidem vyvolává hepatotoxicitu provázenou zvýšením aktivity jaterních enzymů v plasmě. Hlavní chemické složky zastoupené v těchto silicích byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Ve fenyklové silici byly zastoupeny převážně estragol, limonen, fenchon,  $\alpha$ -pinen a *trans*-anethol. Samotné podávání silic nevýznamně změnilo hodnoty jaterních biochemických markerů. Zatímco kombinovaným podáváním s CP se tyto hodnoty částečně normalizovaly. Bylo také zjištěno, že CP indukuje hladiny volných radikálů a inhibuje aktivity antioxidantních enzymů GST, GR, GPx, SOD, CAT a způsobuje významné snížení koncentrace GSH. Samotné podávání silic mělo za následek příznivý účinek na tyto enzymy, a to tak, že zvýšilo jejich aktivitu. Současně nedošlo ke snížení koncentrace GSH ani ke zvýšené peroxidaci lipidů. Společné podávání s CP vedlo ke snížení peroxidace lipidů a kompenzovalo vyčerpání enzymových (GST, GR, GPx, SOD, CAT) a neenzymových (GSH) antioxidantů. Silice tedy obnovily změny v aktivitách antioxidantních enzymů způsobené CP na jejich normální hladinu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Shata et al. (2014) se ve své studii zabývali studiem ochranných vlastností kafrové silice proti toxicitě způsobené atrazinem. Atrazin je široce používaný pesticid používaný na plodiny, jako je sója a kukuřice, a je nejčastěji detekovaným pesticidem v podzemních

vodách. Studie probíhala na samcích albinotických potkanů typu Swiss. Samotný kafr a překvapivě ani samotný atrazin neovlivňovali hladiny malondialdehydu (MDA, marker peroxidace lipidů) ani aktivitu SOD. Ve skupinách ošetřených kombinací atrazinu a kafru bylo pozorováno významné, 1,5násobné zvýšení aktivity SOD. Zdá se tedy, že kombinace těchto dvou sloučenin vyvolala u potkanů oxidační stres, jehož následkem byl aktivován antioxidační systém a došlo ke zvýšení aktivity SOD. Tento enzym přispívá k první linii antioxidační dráhy, regeneruje buňky a redukuje poškození způsobené superoxidem.

Již v teoretické části této diplomové práce zmíněná studie Rašković et al. (2014) se zabývala antioxidační aktivitou silice z *Rosmarinus officinalis* a jejím hepatoprotektivním potenciálem. Konkrétně zhodnocením účinků této silice na poškození jater vyvolané prooxidačním činidlem tetrachlormethanem u potkanů. Při analýze rozmarýnového oleje bylo identifikováno 29 chemických sloučenin, ze zástupců bicyklických monoterpenů se jednalo o kafr (12,53 %), kamfen (4,55 %) a  $\alpha$ -thujon (0,13 %). Pro účely studie byl využíván homogenát z jater potkanů. Oxidační stav v játrech byl hodnocen měřením hladin peroxidace lipidů, redukovaného GSH a aktivity antioxidačních enzymů CAT, GPx a GR. Podání jedné dávky tetrachlormethanu vyvolalo 3,5násobné zvýšení hladin MDA ve srovnání s kontrolní skupinou, což naznačuje oxidační poškození membrán. Také bylo zaznamenáno snížení koncentrace GSH a aktivit všech zkoumaných enzymů kromě GPx, která vykazovala zvýšenou aktivitu. Výsledky ukázaly, že podání rozmarýnové silice by mohlo částečně normalizovat změřené hodnoty. Samotné podávání této silice významně zvrátilo všechny tyto biochemické změny, zejména v dávce 10 mg/kg.

Výsledky výše zmíněných studií ukazují zvýšení aktivity antioxidačních enzymů po ovlivnění monoterpeny, konkrétně fenchemem, kafrem, thujonem a kamfenem. Nicméně se ve všech případech jednalo o výzkum na laboratorních zvířatech. Ve svých experimentech jsem se zabývala vlivem monoterpenů na aktivitu antioxidačních enzymů v lidském jaterním cytosolu. Mé výsledky vykazují zvýšení aktivity enzymů především vlivem (-)- $\alpha$ -thujonu, ale v případě GST i vlivem (-)-fenchonu a kamfenu. Což se shoduje s výsledky získanými experimenty na zvířatech.

V rámci diplomové práce jsem se zabývala také vlivem (-)- $\alpha$ -thujonu na enzymovou aktivitu GST a expresi mRNA osmi isoformů antioxidantních enzymů (GSTA1, GSTP1, GPx1, GPx2, GPx4, GR, CAT, SOD) v ultratenkých lidských jaterních řezech.

Existují rozsáhlé studie týkající se obsahových látek *Salvia fruticosa* (Lamiaceae), které uvádějí, že mimo jiné obsahuje i bicyklické monoterpeny. Dominantní postavení má 1,8-cineol, ale dále i monoterpeny kamfen, kafr a  $\alpha$ -thujon, jež byly nalezeny v množství více než 3 % a jsou považovány za hlavní složky silic z této rostliny. *Salvia fruticosa* je známá především pro svoji antioxidantní, antibakteriální a antiproliferativní aktivitu (Cvetkovikj et al. 2015, Giweli et al. 2013). Ve studii Altay a Bozoğlu (2017) byly sledovány modulační účinky obsahových látek této rostliny na aktivitu a expresi mRNA enzymů GPx4 a GSTM1 v buňkách lidského kolorektálního karcinomu HT-29. Po ošetření HT-29 buněk extrakty ze *Salvia fruticosa* se aktivita obou enzymů zvýšila, aktivita GPx 1,68násobně a aktivita GSTM 1,48násobně. Po ošetření buněk extraktem došlo ke zvýšení exprese mRNA u GPx4 i GSTM1 v porovnání s neošetřenou kontrolní skupinou.

Ve svých experimentech jsem zaznamenala zvýšení exprese mRNA GPx2 1,7násobně, GSTP1 2,5násobně a GSTA1 2násobně, vždy však pouze u jednoho jaterního vzorku ze tří použitých. V případě GPx4, jejíž mRNA exprese se ve zmíněné studii zvýšila, jsem ve svých výsledcích nepozorovala významnou změnu vlivem (-)- $\alpha$ -thujonu.

Získané výsledky ukazují na zvýšení aktivity a mRNA exprese některých antioxidantních enzymů po ovlivnění (-)- $\alpha$ -thujonem. V případě GST by to mohlo vést k ovlivnění účinnosti současně podávané farmakoterapie. GST se podílejí na aktivaci některých proléčiv. Například kanfosfamid je aktivován pomocí GSTP1-1 na analog GSH a vlastní cytotoxický metabolit s alkylačními vlastnostmi, který tvoří kovalentní vazby s DNA. Tato sloučenina je ve 3. fázi klinických studií léčby rezistentní rakoviny vaječníků (Dourado et al. 2013). GST se rovněž podílejí na inaktivaci některých léčiv. Příkladem může být inaktivace protinádorového léčiva cisplatiny katalyzovaná GSTP1-1. Zvýšená aktivita této isoformy tedy může vést k rozvoji lékové rezistence (Allocati et al. 2018).

## 7. ZÁVĚR

Výsledky mé diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

Nejprve jsem hodnotila účinek pěti bicyklických monoterpenů (+)-kafru, (-)-kafru, (-)-fenchonu, kamfenu a (-)- $\alpha$ -thujonu v koncentraci 100  $\mu$ M na aktivitu antioxidantních enzymů glutathion-S-transferasy, glutathionperoxidasy, glutathionreduktasy a katalasy v subcelulárních frakcích získaných z jater šesti dobrovolníků. Studované monoterpeny nejvíce ovlivňovaly aktivitu GST, kde jsem zaznamenala signifikantní zvýšení aktivity u (-)- $\alpha$ -thujonu, (-)-fenchonu (u šesti pacientů) a kamfenu (u dvou pacientů). (-)- $\alpha$ -Thujon rovněž signifikantně ovlivnil aktivitu GR u třech pacientů. Aktivita GPx a CAT nebyla monoterpeny ovlivněna. Pro další část experimentů na lidských ultratenkých jaterních řezech byl vybrán (-)- $\alpha$ -thujon.

V lidských ultratenkých jaterních řezech připravených ze tří dobrovolníků jsem sledovala vliv (-)- $\alpha$ -thujonu 10 a 50  $\mu$ M na aktivitu GST. U pacienta 51 jsem zaznamenala statisticky významné zvýšení aktivity GST o 22,8 % (10  $\mu$ M) resp. 34,2 % (50  $\mu$ M).

Pomocí qPCR jsem v lidských ultratenkých jaterních řezech sledovala vliv (-)- $\alpha$ -thujonu 10 a 50  $\mu$ M na expresi mRNA osmi vybraných isoformů antioxidantních enzymů (GSTA1, GSTP1, GPx1, GPx2, GPx4, GR, CAT a SOD). (-)- $\alpha$ -Thujon 50  $\mu$ M signifikantně zvyšoval expresi mRNA GSTA1 u pacienta 48 a to 2násobně. (-)- $\alpha$ -Thujon 10  $\mu$ M vyvolal indukci GSTP1 2,5násobně u pacienta 51 a GPx2 1,7násobně u pacienta 48. U ostatních enzymů nebyl pozorován žádný statisticky významný vliv této látky na expresi mRNA.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

BCA	kyselina bicinchoninová
BHA	butylhydroxyanisol
BSA	bovinní sérový albumin
CAT	katalasa
cDNA	jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina
CDNB	1-chlor-2,4-dinitrochlorobenzen
CP	cyklofosfamid
DEPC	diethylpyrokarbonát
DMADP	dimethylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidy
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FDP	farnesyldifosfát
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GDP	geranyldifosfát
GGDP	geranylgeranyldifosfát

GPx	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GS-DNB	konjugát 1-chloro-2,4-dinitrobenzen s GSH
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
GST	glutathion-S-transferasa
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IDP	isopentenylidifosfát
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
MDA	malondialdehyd
MEP	2C-methyl- <i>D</i> -erythritol-4-fosfát
MEV	kyselina mevalonová
microRNA	micro ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF-kB	nukleární faktor kappa B
NTC	no template control
PCLS	ultratenké jaterní řezy
PT	prenyltransferasa
qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku



ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptasa
SOD	superoxiddismutasa
<i>t</i> -BHP	<i>t</i> -butylhydroperoxid
<i>t</i> -buOH	<i>t</i> -butylalkohol
<i>t</i> -buOOH	<i>t</i> -butylhydroperoxid
TPS	terpenová synthasa
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
WHO	Světová zdravotnická organizace

## 10. POUŽITÁ LITERATURA

Aazza S., Lyoussi B., Miguel M.G. (2011) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*. 16(9): 7672-7690.

Alkhalidy H., Wang Y., Liu D. (2018) Dietary Flavonoids in the Prevention of T2D: An Overview. *Nutrients*. 10(4): 438.

Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., Federici L. (2018) Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*. 7(1): 8.

Altay A., Bozoğlu F. (2017) *Salvia fruticosa* Modulates mRNA Expressions and Activity Levels of Xenobiotic Metabolizing CYP1A2, CYP2E1, NQO1, GPx, and GST Enzymes in Human Colorectal Adenocarcinoma HT-29 Cells. *Nutr Cancer*. 69(61): 1-12.

Bohlmann J., Keeling Ch. (2008) Terpenoid biomaterials. *Plant J*. 54(4): 656-669.

Bonilla M., Denicola A., Novoselov S.V., Turanov A.A., Protasio A., Izmendi D., Gladyshev V.N., Salinas G. (2008) Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J Biol Chem*. 283(26): 17898-17907.

Bora K.S., Sharma A. (2011) Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharm Biol*. 49(12): 1216-1223.

Boušová I., Skálová L. (2012) Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metab Rev*. 44(4): 267-286.

Calleja M.A., Vieites J.M., Montero-Meterdez T., Torres M.I., Faus M.J., Gil A., Suárez A. (2013) The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *Br J Nutr*. 109(3): 394-401.

Carlberg I., Mannervick B. (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 113: 484-490.

Cikoš A.M., Jurin M., Čož-Rakovac R., Jokić S., Jerković I. (2019) Update on Monoterpenes from Red Macroalgae: Isolation, Analysis, and Bioactivity. *Mar Drugs*. 17(9): 537.

Couto N., Wood J., Barber J. (2016) The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 95: 27-42.

Cui J., Li G., Yin J., et al. (2020) GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (Review). *Int J Oncol*. 56(4): 867-878.

Cvetkovikj I., Stefkov G., Karapandzova M., Kulevanova S. (2015) Essential oil composition of *Salvia fruticosa* Mill. Populations from Balkan Peninsula. *Maced Pharm Bull*. 61(1): 19-26.

Dewick P.M. (2002) *Medicinal Natural Products*. 2. vydání. John Wiley, 507 stran. ISBN 9780470741689.

Dourado D.F., Fernandes P.A., Ramos M.J., Mannervik B. (2013) Mechanism of glutathione transferase P1-1-catalyzed activation of the prodrug canfosfamide (TLK286, TELCYTA). *Biochemistry*. 52(45): 8069-78.

Dusek P., Dezortova M., Wuerfel J. (2013) Imaging of iron. *Int Rev Neurobiol*. 110: 195-239.

Fagan R.L., Palfey B.A. (2010) 7.03 - Flavin-Dependent Enzymes. In: Liu HW, Mander L (eds.) *Comprehensive Natural Products II*. 1. vydání. Elsevier, str. 37-113.

Flohé L., Günzler W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 105: 114-121.

Fu J.T., Tang L., Li W.S., Wang K., Cheng D.M., Zhang Z.X. (2015) Fumigant Toxicity and Repellence Activity of Camphor Essential Oil from *Cinnamomum camphora* Siebold Against *Solenopsis invicta* Workers (Hymenoptera:Formicidae). *J Insect Sci*. 15(1): 129.

Giweli A., Dzamic A., Sokolović M., Ristic M.S., Janackovic P., Marin P. (2013) The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Salvia fruticosa* growing wild in Libya. *Archives of Biological Sciences*. 65(1): 321-329.

Góth L. (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clin Chim Acta.* 196: 143-152.

Goyal M.M., Basak A. (2010) Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell.* 1(10): 888-897.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249: 7130-7139.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine.* 5. vydání. Oxford University Press, 905 stran. ISBN: 978-0-19-871748-5.

Handy D.E., Lubos E., Yang Y., Galbraith J.D., Kelly N., Zhang Y.Y., Leopold J.A., Loscalzo J. (2009) Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J Biol Chem.* 284: 11913-11921.

Harborne J.B., Tomas-Barberan F.A. (1991) *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids.* 1. vydání. Clarendon Press, 439 stran. ISBN 0198577397.

Hermes-Lima M. (2004) *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals.* In: Storey K.B. (ed.). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.* 1. vydání. Wiley-Liss, 319-368.

Him A., Özbek H., Öner A.C. (2008) Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. *Pharmacologyonline.* 3: 363-369.

Höld K.M., Sirisoma N.S., Ikeda T., Narahashi T., Casida J.E. (2000) Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc Natl Acad Sci.* 97(8): 3826-3831.

Chen W., Vermaak I., Viljoen A. (2013) Camphor--a fumigant during the Black Death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon--a review. *Molecules.* 18(5): 5434-5454.

Ighodaro O.M., Akinloye O.A. (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med.* 54(4): 287-293.

- Kim Y., Cha S.J., Choi H.J., Kim K. (2017) Omega Class Glutathione S-Transferase: Antioxidant Enzyme in Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017: 5049532.
- Klouda P. (2005) *Základy biochemie*. 2. vydání. Nakladatelství Pavel Klouda, 144 stran. ISBN 80-86369-11-0.
- Korte C.S. (2013) Tert-Butyl Hydroperoxide Stimulates Parturition-Associated Pathways in a Human Placental Cell Line. Disertační práce. Department of Environmental Health Sciences, University of Michigan, Ann Arbor, USA, str. 12.
- Krohn R.I. (2011) The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Curr Protoc Cell Biol.* 52: A.3H.1-A.3H.28.
- Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2009) *Biochemie pro studující medicíny I. a II. díl*. 1. vydání. Nakladatelství Karolinum, 568 stran. ISBN: 978-80-246-1414-4.
- Lee J.Y., Park H., Lim W., Song G. (2021) Therapeutic potential of  $\alpha,\beta$ -thujone through metabolic reprogramming and caspase-dependent apoptosis in ovarian cancer cells. *J Cell Physiol.* 236(2): 1545-1558.
- Lee J.Y., Park H., Lim W., Song G. (2020)  $\alpha,\beta$ -Thujone suppresses human placental choriocarcinoma cells via metabolic disruption. *Reproduction.* 159(6): 745-756.
- Liguori I., Russo G., Curcio F., et al. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 13: 757-772.
- Linton S., Davies M.J., Dean R.T. (2001) Protein oxidation and ageing. *Exp Gerontol.* 36(9): 1503-1518.
- Lněničková K., Dymáková A., Szotáková B., Boušová I. (2017) Sulforaphane Alters  $\beta$ -Naphthoflavone-Induced Changes in Activity and Expression of Drug-Metabolizing Enzymes in Rat Hepatocytes. *Molecules.* 22(11): 1983.
- Lo Cantore P., Iacobellis N.S., De Marco A., Capasso F., Senatore F. (2004) Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *J Agric Food Chem.* 52(26): 7862-7866.

- Ma Q. (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 53: 401-426.
- Mahmoud S.S., Croteau R.B. (2002) Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7(8): 366-373.
- Matés J.M., Pérez-Gómez C., Núñez de Castro I. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32(8): 595-603.
- Matic M., Pekmezovic T., Djukic T., et al. (2013) GSTA1, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 polymorphisms and susceptibility to smoking-related bladder cancer: a case-control study. *Urol Oncol.* 31(7): 1184-1192.
- Miao L., St Clair DK. (2009) Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 47(4): 344-356.
- Mirończuk-Chodakowska I., Witkowska A.M., Zujko M.E. (2018) Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci.* 63(1): 68-78.
- Nosková P. (2020) Kyselina alfa-lipoová a její místo v léčbě neuropatické bolesti. *Neurol praxi.* 21(1): 50–52.
- Nozik-Grayck E., Suliman H.B., Piantadosi C.A. (2005) Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(12): 2466-2471.
- Oakley A. (2011) Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev* 43: 138–151.
- Ojopagogo Y.A., Adewale I.O., Adeyemi J.A., Afolayan A. (2015) Some novel features of glutathione transferase from juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to lindane-contaminated water. *Perspect Sci.* 4: 62-65.
- Okat Z. (2018) Clinical importance of glutathione-s-transferase enzyme polymorphisms in Cancer. *Int Phys Med Rehab J.* 3(6): 491-493.
- Palma E., Doornebal E.J., Chokshi S. (2019) Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepato Int.* 13(1): 51-57.

- Pelkonen O., Abass K., Wiesner J. (2013) Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: Toxicological assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 65(1): 100-107.
- Pessoa M.L.S., Silva L.M.O., Araruna M.E.C., et al. (2020) Antifungal activity and antidiarrheal activity via antimotility mechanisms of (-)-fenchone in experimental models. *World J Gastroenterol.* 26(43): 6795-6809.
- Porres-Martínez M., González-Burgos E., Carretero M.E., Gómez-Serranillos M.P. (2016) In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in PC12 cells. *Z Naturforsch C J Biosci.* 71(7-8): 191-199.
- Racek J. (2003) Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. 1. vydání. Galén, 90 stran. ISBN: 80-7262-231-5.
- Rašković A., Milanović I., Pavlović N., Čebović T., Vukmirović S., Mikov M. (2014) Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med.* 14-225.
- Salminen A., Lehtonen M., Suuronen T., Kaarniranta K., Huuskonen J. (2008) Terpenoids: natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci.* 65(19): 2979-2999.
- Seigler D.S. (1998) Monoterpenes. In: Siegler D.S. (ed.) *Plant Secondary Metabolism*. 1. vydání. Springer, 312-323. ISBN 978-1-4613-7228-8.
- Shahat A.A., Ibrahim A.Y., Hendawy S.F., et al. (2011) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules.* 16(2): 1366-1377.
- Shata F.Y.H., Eldebaky H., Abd A.R., Hameed E. (2014) Effects of Camphor on Hepatic Enzymes, Steroids and Antioxidant Capacity of Male Rats Intoxicated with Atrazine. *Middle-East Journal of Scientific Research.* 22(4): 553-560.
- Sheweita S.A., El-Hosseiny L.S., Nashashibi M.A. (2016) Protective Effects of Essential Oils as Natural Antioxidants against Hepatotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Mice. *PLoS One.* 11(11): e0165667.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.

Sohee K., Youngshim C., Seoyoon C., Yeji C., Taesun P. (2014) Dietary camphene attenuates hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Obesity.* 22(2): 408-417.

Srinivasan R., Aruna A., Lee J.S., Kim M., Shivakumar M.S., Natarajan D. (2020) Antioxidant and Antiproliferative Potential of Bioactive Molecules Ursolic Acid and Thujone Isolated from *Memecylon edule* and *Elaeagnus indica* and Their Inhibitory Effect on Topoisomerase II by Molecular Docking Approach. *Biomed Res Int.* 2020: 8716927.

Štípek et. al. (2000) *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví i nemoci.* 1. vydání. Grada Publishing, 320 stran. ISBN: 80-7169-704-4.

Tiwari M., Kakkar P. (2009) Plant derived antioxidants – Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro.* 23(2): 295-301.

Wagner K.H., Elmadfa I. (2003) Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Ann Nutr Metab.* 47(3-4): 95-106.

Younus H. (2018) Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci.* 12(3): 88–93.

Zárybnický T., Boušová I., Ambrož M., Skálová L. (2018) Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Arch Toxicol.* 92(1): 1-13.

Zielińska-Błajet M., Feder-Kubis J. (2020) Monoterpenes and Their Derivatives-Recent Development in Biological and Medical Applications. *Int J Mol Sci.* 21(19): 7078.

Zulak K.G., Bohlmann J. (2010) Terpenoid Biosynthesis and Specialized Vascular Cells of Conifer Defense. *Journal of Integrative Plant Biology.* 52(1): 86-97.



## Zdroje obrázků

Obr. 1: Isopren. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/isoprene68127879511?lang=en&region=CZ>

Obr. 3: Chemická struktura (+)-kafru a (-)-kafru. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Camphor#/media/File:Alcanfor-2D.svg>

Obr. 4: Chemická struktura (-)-fenchonu. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z:

[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/196436?lang=en&region=CZ&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_fenchone-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/196436?lang=en&region=CZ&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_fenchone-_-srpRecs3-1)

Obr. 5: Chemická struktura kamfenu. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w525707?lang=en&region=CZ>

Obr. 6: Chemická struktura (-)- $\alpha$ -thujonu. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z:

[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/89231?lang=en&region=CZ&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_thujone-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/89231?lang=en&region=CZ&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_thujone-_-srpRecs3-1)

Obr. 9: Kyselina močová. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z:

[https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_mo%C4%8Dov%C3%A1#/media/Soubor:Harans%C3%A4ure\\_Ketoform.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_mo%C4%8Dov%C3%A1#/media/Soubor:Harans%C3%A4ure_Ketoform.svg)

Obr. 10: Kyselina askorbová. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_C#/media/File:L-Ascorbic\\_acid.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C#/media/File:L-Ascorbic_acid.svg)

Obr. 11:  $\alpha$ -tokoferol. [cit. 2021-04-25]. Dostupné z:

[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure4/193/mfcd00006848.eps/\\_jcr\\_content/renditions/mfcd00006848-medium.png](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure4/193/mfcd00006848.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00006848-medium.png)

Obr. 13:  $\beta$ -karoten. [cit. 2021-04-25]. Dostupné z:

<https://cs.m.wikipedia.org/wiki/Soubor:Beta-Carotin.svg>

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1.: Isopren (převzato z Sigma-Aldrich 2021).	11
Obrázek 2.: Syntéza terpenoidů (převzato z Bohlmann et al. 2008).	12
Obrázek 3.: Chemická struktura (+)-kafru a (-)-kafru (převzato z Wikipedia).	15
Obrázek 4.: Chemická struktura (-)-fenchonů (převzato z Sigma-Aldrich 2021).	16
Obrázek 5.: Chemická struktura kamfenu (převzato z Sigma-Aldrich 2021).	17
Obrázek 6.: Chemická struktura (-)- $\alpha$ -thujonu (převzato z Sigma-Aldrich 2021).	18
Obrázek 7.: Mechanismus dismutace superoxidu katalyzované Cu,Zn-SOD a struktura podjednotky hovězí Cu,Zn-SOD (převzato z Younus 2018).	22
Obrázek 8.: Působení hlavních antioxidačních enzymů v ochraně buňky před působením ROS (převzato z Hermes-Lima 2004).	28
Obrázek 9.: Kyselina močová (převzato z Wikipedia 2021).	33
Obrázek 10.: Kyselina askorbová (převzato z Wikipedia 2021).	33
Obrázek 11.: $\alpha$ -tokoferol (převzato ze Sigma-Aldrich 2021).	34
Obrázek 12.: Základní struktura flavonoidů (převzato z Alkhalidy et al. 2018).	35
Obrázek 13.: $\beta$ -karoten (převzato z Wikipedia 2021).	35
Obrázek 14.: Vzájemné propojení jednotlivých složek antioxidačního systému organismu (převzato ze Štípek et al. 2000).	36
Obrázek 15.: Princip stanovení koncentrace proteinů metodou BCA (převzato z Krohn 2011).	45
Obrázek 16.: Princip stanovení aktivity GR (převzato z Fagan a Palfey 2010).	46
Obrázek 17.: Princip stanovení aktivity GPx (převzato z Korte 2013).	49
Obrázek 18.: Princip stanovení aktivity GST (převzato z Ojopagogo et al. 2015).	51
Obrázek 19.: Grafické zobrazení vlivu bicyklických monoterpenů na specifickou aktivitu GR u 6 dárců.	67
Obrázek 20.: Grafické zobrazení vlivu bicyklických monoterpenů na specifickou aktivitu GPx u 6 dárců.	68
Obrázek 21.: Grafické zobrazení vlivu bicyklických monoterpenů na specifickou aktivitu GST u 6 dárců.	70
Obrázek 22.: Grafické zobrazení vlivu bicyklických monoterpenů na specifickou aktivitu CAT u 6 dárců.	71
Obrázek 23.: Specifická aktivita GST v lidských ultratenkých jaterních řezech ovlivněných (-)- $\alpha$ -thujonem.	73

Obrázek 24.: Vliv bicyklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GSTA1.	74
Obrázek 25.: Vliv bicyklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GSTP1.	75
Obrázek 26.: Vliv bicyklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx1.	76
Obrázek 27.: Vliv bicyklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx2.	77
Obrázek 28.: Vliv bicyklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GPx4.	78
Obrázek 29.: Vliv bicyklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi GR. ..	79
Obrázek 30.: Vliv bicyklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi CAT.	80
Obrázek 31.: Vliv bicyklického monoterpenu (-)- $\alpha$ -thujonu na genovou expresi SOD.	81

Tabulka 1.: Údaje o souboru pacientů.....	41
Tabulka 2.: Kalibrační křivka. ....	45
Tabulka 3.: Stanovení aktivity katalasy. ....	54
Tabulka 4.: Příprava Krebsova-Henseleitova pufru.....	55
Tabulka 5.: Složení mastermixu RT+ a noRT. ....	61
Tabulka 6.: SYBR qPCR Master Mix.....	62
Tabulka 7.: Struktura použitých primerů. ....	64