

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Účinek isomerů kafru na expresi biotransformačních enzymů v lidských
jaterních buňkách**

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

Konzultantka: Mgr. Michaela Šadibolová

Hradec Králové, 2021

Bc. Michaela Smolíková, DiS.

Poděkování

Tímto bych chtěla moc poděkovat doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za naprosto fantastické odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady, připomínky a velkou trpělivost. Za obrovskou ochotu a pomoc s experimentální částí a za velmi laskavý přístup také moc děkuji dalším pracovníkům katedry biochemických věd, zejména Mgr. Gabriele Vávrové, ale i Mgr. Michaele Šadibolové, PharmDr. Tomášovi Zárybnickému, Ph.D., PharmDr. Martinovi Ambrožovi, Ph.D. a Ehiofomwan Ameze Omwanghe, M.Sc. Za finanční podporu děkuji grantu GAČR 18-09946S.

Poděkování si také zaslouží i společnost IMMUNIA, spol. s.r.o., která mi při studiu vyšla vstříc a velmi mě podporovala, obzvláště moje kolegyně a nadřízená Mgr. Barbora Štohanslová.

Poděkování patří i mému příteli a rodině za obrovskou morální podporu a trpělivost.

Čestné prohlášení

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

V Hradci Králové dne

.....

Bc. Michaela Smolíková, DiS.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 2.1 | Terpeny, terpenoidy | 9 |
| 2.2 | Syntéza monoterpenů | 10 |
| 2.2.1 | Mevalonátová cesta | 11 |
| 2.2.2 | Pyruvátová cesta | 12 |
| 2.3 | Monoterpeny | 13 |
| 2.4 | Kafr | 16 |
| 2.4.1 | Výroba kafru z terpentýnového oleje | 18 |
| 2.4.2 | Současné využití účinků kafru | 18 |
| 2.5 | Metabolismus | 19 |
| 2.5.1 | I. fáze biotransformace | 20 |
| 2.5.2 | II. fáze biotransformace | 22 |
| 2.6 | Exkrece | 26 |
| 2.6.1 | Ledvinná exkrece | 26 |
| 2.6.2 | Jaterní exkrece | 27 |
| 2.7 | Toxické účinky po užití bylinných produktů | 27 |
| 2.7.1 | Laboratorní stanovení jaterních enzymů a bilirubinu | 30 |
| 2.8 | Metabolismus kafru a jeho toxicita | 31 |
| 3 | CÍL PRÁCE | 34 |
| 4 | MATERIÁL A METODIKA | 35 |
| 4.1 | Biologický materiál | 35 |
| 4.2 | Chemikálie | 35 |
| 4.3 | Přístroje | 38 |
| 4.4 | Metodika | 39 |
| 4.4.1 | Příprava ultratenkých lidských jaterních řezů | 39 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.4.2 | Stanovení proteinové exprese..... | 43 |
| 4.4.3 | Stanovení genové exprese | 59 |
| 4.4.4 | Statistická analýza | 72 |
| 5 | VÝSLEDKY | 73 |
| 5.1 | Účinek isomerů kafru na proteinovou expresi biotransformačních enzymů | 73 |
| 5.1.1 | Proteinová exprese CYP3A4..... | 74 |
| 5.1.2 | Proteinová exprese CYP2C | 76 |
| 5.1.3 | Proteinová exprese AKR1C3 | 78 |
| 5.1.4 | Proteinová exprese GSTA | 80 |
| 5.2 | Účinek isomerů kafru na genovou expresi | 82 |
| 5.2.1 | Genová exprese CYP1A2..... | 83 |
| 5.2.2 | Genová exprese CYP2B6 | 84 |
| 5.2.3 | Genová exprese CYP2C | 85 |
| 5.2.4 | Genová exprese CYP3A4..... | 86 |
| 5.2.5 | Genová exprese NQO1 | 87 |
| 5.2.6 | Genová exprese AKR1C | 88 |
| 5.2.7 | Genová exprese GSTA1 | 89 |
| 5.2.8 | Genová exprese GSTP1..... | 90 |
| 5.2.9 | Genová exprese SULT1A1 | 91 |
| 5.2.10 | Genová exprese UGT1A6 | 92 |
| 6 | DISKUSE | 93 |
| 7 | ZÁVĚR..... | 98 |
| 8 | SEZNAM ZKRATEK | 99 |
| 9 | SEZNAM OBRÁZKŮ | 102 |
| 10 | SEZNAM TABULEK | 104 |
| 11 | POUŽITÁ LITERATURA | 105 |

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Michaela Smolíková, DiS.

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

Konzultant: Mgr. Michaela Šadibolová

Název diplomové práce: Účinek isomerů kafru na expresi biotransformačních enzymů v lidských jaterních buňkách

Kafr je cyklický keton ze skupiny monoterpenů. V přírodě se vyskytují dva isomery kafru. V dnešní době se kafr využívá jako antiseptikum, analgetikum, rubefaciens i jako protizánětlivý přípravek. Kafr se užívá zejména v přípravcích pro lokální užití, kde působí mírným znečitlivujícím účinkem a pocitem tepla spolu s jeho charakteristicky pronikavou svěží vůní. Většina intoxikací kafrem je vyvolána nesprávným použitím či dávkováním. Cílem diplomové práce bylo zjistit účinek isomerů (+)-kafru a (-)-kafru na expresi vybraných enzymů I. i II. fáze biotransformace. Biologickým materiálem byly ultratenké lidské jaterní řezy připravené z tkáně celkem tří pacientů, dvou mužů a jedné ženy ve věkovém rozmezí 46 - 49 let. Jaterní řezy byly inkubovány s 10 μM a 50 μM (+)-kafrem a (-)-kafrem 24 hodin při 37°C. Proteinová exprese enzymů I. fáze (cytochromu P450 (CYP) 3A4, CYP2C, aldo-ketoreduktasy (AKR) 1C3) a II. fáze (glutathion-S-transferasy (GST) A) byla stanovena metodou western blotingu. Exprese mRNA enzymů I. fáze (CYP3A4, CYP1A2, CYP2C, CYP2B6, AKR1C a NAD(P)H-chinonoxidoreduktasy (NQO1) a II. fáze (GSTA1, GSTP1, UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) 1A6 a sulfottransferasy (SULT) 1A1) byla stanovena pomocí polymerasové řetězové reakce v reálném čase. K nejvýznamnějším změnám na úrovni proteinu došlo u pacienta 48, kde byla patrná indukce CYP3A4 ((+)-kafr 10 a 50 μM) a inhibice CYP2C a AKR1C3 (+)-kafr 50 μM , ((-)-kafr 10 a 50 μM). Na úrovni mRNA byla zaznamenána indukce několika enzymů (-)-kafrem 50 μM u pacienta L48 (CYP3A4, AKR1C, GSTA a UGT1A6) a (+)-kafrem 50 μM u pacienta L49 (NQO1). Oba isomery v obou koncentracích způsobily inhibici mRNA GSTP1 (pacient L48) a SULT1A1 (pacient L49). Kafr by tedy mohl ovlivnit účinnost současně podaných léčiv.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Michaela Smolíková, DiS.

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

Advisor: Mgr. Michaela Šadibolová

Title of diploma thesis: Effect of camphor isomers on the expression of drug-metabolizing enzymes in human liver cells

Camphor is a cyclic ketone from the group of monoterpenes. Two camphor isomers occur in nature. Currently, camphor is used as an antiseptic, analgesic, rubefacients, and anti-inflammatory drug. Camphor is used mainly in preparations for topical use, where it has a mild anesthetic effect and a feeling of warmth together with its characteristically strong fresh scent. Most camphor intoxications are caused by improper use or dosing. The aim of the diploma thesis was to determine the effect of isomers (+)-camphor and (-)-camphor on the expression of selected phase I and II biotransformation enzymes. The precision-cut human liver slices prepared from a total of three patients, two men and one woman at the age range of 46 - 49 years, were used as biological material. Liver slices were incubated with 10 μ M and 50 μ M (+)-camphor and (-)-camphor for 24 hours at 37°C. Protein expression of phase I (cytochrome P450 (CYP) 3A4, CYP2C, aldo-keto reductase (AKR) 1C3), and phase II enzymes (glutathione S-transferase (GST) A) was determined using the western blot technique. The mRNA expression of phase I (CYP3A4, CYP1A2, CYP2C, CYP2B6, AKR1C, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) and phase II enzymes (GSTA1, GSTP1, UDP-glucuronosyl transferase (UGT) 1A6, and sulfotransferase (SULT) 1A1) was determined by real-time polymerase chain reaction. The most significant changes at protein levels occurred in patient L48, where induction of CYP3A4 ((+)-camphor 10 and 50 μ M) and inhibition of CYP2C and AKR1C3 ((+)-camphor 50 μ M, (-)-camphor 10 and 50 μ M) were noticeable. At the mRNA level, induction of several enzymes by (-)-camphor 50 μ M in patient L48 (CYP3A4, AKR1C, GSTA, and UGT1A6) and by (+)-camphor 50 μ M in patient L49 (NQO1) was found. Both isomers at both concentrations caused inhibition of GSTP1 (patient L48) and SULT1A1 (patient L49) mRNA. Camphor could therefore affect the efficacy of concomitantly administered drugs.

1 ÚVOD

Byliny a přírodní produkty jsou užívány lidmi již po celá staletí. Za poslední desetiletí se zájem o přírodní terapie výrazně zvýšil a znovu dosahují celosvětového uznání (Taj a kol. 2019, Stickel a kol. 2015).

Zvýšenou pozornost si zasloužily zejména v době, kdy začínala vzrůstat resistance na syntetická antibiotika (Taj a kol. 2019). Mezi lidmi jsou přírodní produkty obecně považovány za bezpečné (Zárybnický a kol. 2018a). Spotřeba nutraceutik a bylinných přípravků významně vzrostla nejen v rámci podpory zdravého životního stylu, ale i jako prevence před různými chorobami (Šadibolová a kol. 2019). Své uplatnění nacházejí po celém světě také v oblasti fitness, pro hubnutí nebo zvyšování fyzické zdatnosti (Stickel a kol. 2015).

Řada lidí hojně využívá přírodních léčivých přípravků a bylinných doplňků současně při užívání medikace na předpis jako doplňkovou či alternativní léčbu (Stickel a kol. 2015, Šadibolová a kol. 2019). U mnoha těchto přípravků byla prokázána celá řada pozitivních účinků na lidské zdraví (Šadibolová a kol. 2019). Terapeutický potenciál rostlinných léčivých přípravků je dán především přítomností důležitých bioaktivních látek nazývaných sekundární metabolity. Léčivé rostliny jsou jejich bohatým úložištěm, a tím poskytují suroviny pro výrobu rostlinných produktů farmaceutickým průmyslem (Taj a kol. 2019).

Informace týkající se interakcí mezi jednotlivými bylinami a léčivy jsou všeobecně značně omezené, a proto při jejich současném užití může dojít k vyvolání nežádoucích účinků. Nežádoucí účinky mohou vést k interakci na farmakokinetické i farmakodynamické úrovni, a tím vyvolat závažné následky. Ohroženi jsou zejména starší lidé. Tato populace velmi často trpí komorbiditami a patofyziologickými změnami souvisejícími s věkem, mnoho z nich také užívá více než jeden léčivý přípravek (Šadibolová a kol. 2019). Jedním z nejčastějších nežádoucích účinků je hepatotoxicita. Její průkaz v této souvislosti je velmi obtížný. Obzvláště tehdy, není-li lékař o užívání bylinných preparátů informován (Gordon a kol. 2014).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Terpeny, terpenoidy

Isoprenoidy jsou přírodní sloučeniny rostlinného a živočišného původu, které rozdělujeme na terpeny a steroidy (Streblová 2002). Terpeny jsou převážně rostlinného původu (Streblová 2002). Strukturně jsou si navzájem velmi podobné. Podle tzv. isoprenového pravidla lze předpokládat, že terpeny vznikly spojováním pětiuhlíkatého isoprenu (2-metylbuta-1,3-dienu) (McMurry 2007). Z chemického hlediska jsou terpeny uhlovodíky nebo kyslíkaté deriváty uhlovodíků, např. alkoholy, ketony či karboxylové kyseliny (Streblová 2002). Terpeny s navázanými funkčními skupinami se mohou řadit do obecnější skupiny terpenoidů, jelikož mají také základní strukturu složenou z uhlovodíků (Al-Taweel a kol 2018). Dosud bylo identifikováno více než 22 000 rozmanitých terpenoidů s obrovskou strukturní variabilitou. Terpenoidy mohou být sloučeniny acyklických i cyklických uhlovodíků včetně sloučenin obsahující atomy kyslíku (McMurry 2007).

Nízkomolekulární terpeny jsou těkavé látky s charakteristickou (obvykle příjemnou) vůní (Streblová 2002). Získávají se destilací rostlinných materiálů s vodní parou. Tímto procesem vznikají vonné kapalné směsi lipidového charakteru nazývané silice. Stovky let byly rostlinné silice používány v medicíně jako koření i parfémy. Po chemické stránce se skládají hlavně ze směsi terpenů (McMurry 2007).

Vysokomolekulární terpeny jsou tzv. pryskyřice. Pryskyřice jsou tuhé, za zvýšené teploty lepkavé látky nerozpustné ve vodě. Využít je můžeme k výrobě plastických nátěrových hmot (Streblová 2002).

Terpeny se dále dělí na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny a další skupiny v závislosti na počtu uhlíkových jednotek (Al-Taweel 2018). Podrobnější informace o počtu uhlíkových jednotek jsou uvedeny v Tabulka 1.

Tabulka 1 Klasifikace terpenů podle počtu isoprenových jednotek a příklady zástupců
(Streblová 2002)

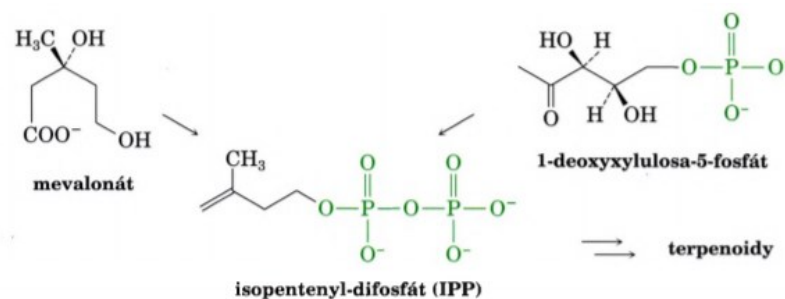
| Typ terpenu | Počet isoprenových jednotek | Počet atomů uhlíku | Příklady |
|---------------|-----------------------------|--------------------|---|
| monoterpeny | 2 | 10 | limonen, menthol, geraniol, pinen, kafr |
| seskviterpeny | 3 | 15 | — |
| diterpeny | 4 | 20 | fytol, vitamin A (retinol) |
| triterpeny | 6 | 30 | skvalen |
| tetraterpeny | 8 | 40 | karoteny, xantofyly, lykopen |
| polyterpeny | n | $5n$ | přírodní kaučuk, gutaperča |

Dle Tabulka 1 je zřejmé, že monoterpeny jsou desetiuhlíkaté sloučeniny. Monoterpeny jsou přítomné především v rostlinách, bakteriích i houbách (McMurry 2007).

Ze studií vyplývá, že isopren není skutečným biologickým prekurzorem terpenů, ale jsou jím pětiuhlíkaté molekuly isopentenylidifosfát nebo-li isopentenylpyrofosfát (IPP) a dimethylallyldifosfát (McMurry 2007).

2.2 Syntéza monoterpenů

K tvorbě isopentenylidifosfátu dochází dvěma způsoby – mevalonátovou cestou a cestou deoxyxylulosovou (pyruvátovou). Deoxyxylulosová dráha je též zvaná jako methylethritol fosfátová (MEP) (Cikoš a kol. 2019). Strukturální vzorce prekurzorů pro terpeny jsou znázorněny na Obrázek 1.



Obrázek 1 Biosyntéza isopentenylidifosfátu (McMurry 2007)

Mevalonátová cesta probíhá v cytosolu buněk a slouží spíše pro vznik prekurzorů pro syntézu seskviterpenů a triterpenů přes kyselinu mevalonovou. Pyruvátová cesta se odehrává

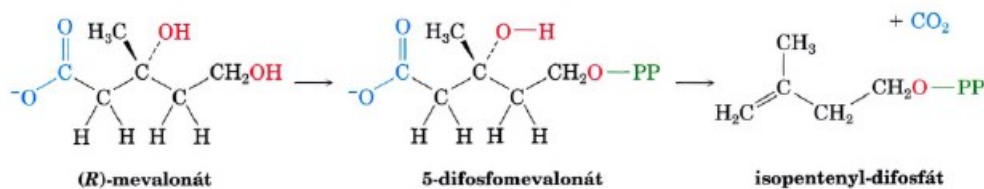
v plastidech buněk a její prekurzory jsou zde základem pro monoterpeny, diterpeny či tetraterpeny (Cikoš a kol. 2019, Dvořáková a kol. 2011).

V rostlinách může docházet k propojení obou biochemických cest, kdy prekurzory vzniklé v plastidech pyruvátovou cestou jsou poskytovány pro syntézu seskviterpenů a triterpenů v cytosolu (Dvořáková a kol. 2011).

Monoterpeny jsou syntetizovány v parenchymatických buňkách rostlin. Uloženy jsou ve vakuolách, buněčné stěně nebo ve speciálních exkretčních pletivech tzv. pryskyřičných buňkách. V jehličnanech mohou být pryskyřičné buňky izolované, tvořit puchýřky nebo vysoce složitý systém kanálků (Dvořáková a kol. 2011).

2.2.1 Mevalonátová cesta

Mevalonátová cesta je obvyklejší a začíná konverzí acetátu na acetyl-CoA, po ní následuje Claisenova kondenzace za vzniku acetoacetyl-CoA. Tento krok je katalyzován enzymem acetoacetyl-CoA-acetyltransferasou. Následuje proces aldolizace a hydrolýzy, ve kterém reaguje acetoacetyl-CoA s další molekulou acetyl-CoA za přítomnosti enzymu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthetasy a vzniká zde (3S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Produkt HMG-CoA se redukuje na mevalonát pomocí enzymu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasy a dvou NADPH. Dalšími kroky jsou konverze mevalonátu na 5-difosfomevalonát a jeho dekarboxylace, při které vzniká isopentenyl-difosfát (Cikoš a kol. 2019, McMurry 2007). Zjednodušené schéma je znázorněno na Obrázek 2.



Obrázek 2 Konverze mevalonátu na 5-difosfomevalonát a dekarboxylace na isopentenyldifosfát (McMurry 2007)

Konverze isopentenyldifosfátu (IPP) na terpenoidy začíná isomerizací na dimethylallyldifosfát. Sloučenina je též nazývána jako dimethylallylpyrofosfát (DMAPP). Reakce je katalyzována IPP-isomerasou. Sloučeniny IPP a DMAPP spolu vytvářejí

C₁₀-jednotku, zvanou geranyldifosfát (GPP). Vzniklý geraniol je voňavá terpenická sloučenina obsažená v růžovém oleji (McMurry 2007).

Spojení DMAPP s IPP na geranyldifosfát i následnou reakci GPP s další molekulou IPP za vzniku farnesyl-difosfátu katalyzuje enzym farnesyldifosfátsynthasa. Procesu se také účastní hořečnaté ionty. Typická přeměna geranyldifosfátu na monoterpeny zahrnuje vícestupňovou reakci katalyzovanou enzymem terpenocyklasou (McMurry 2007).

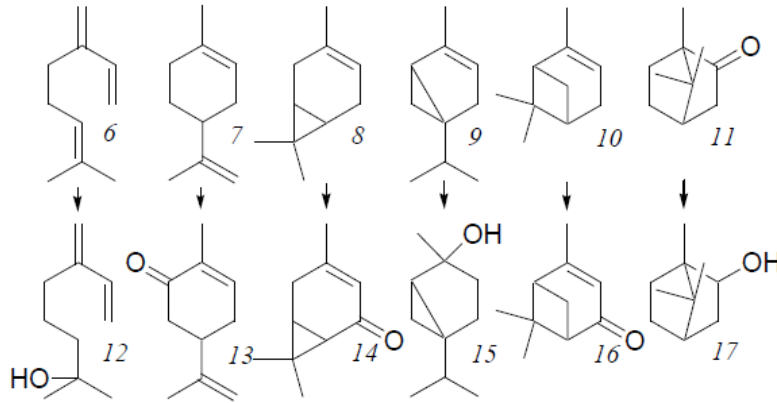
Sloučenina GPP je považována za univerzálního předchůdce monoterpenů, nicméně pro vznik monocyklických a bicyklických uhlíkatých skeletů má omezenou flexibilitu. Konkrétně *trans*-2,3 dvojná vazba v GPP brání cyklizaci, a proto k tvorbě cyklických produktů dochází přes terciární allylický isomer – linalylpyrofosfát (Cikoš a kol. 2019). Linalyldifosfát (LPP) je zde meziproduktem v enzymatické cyklizaci monoterpenů katalyzovaných terpensynthasami (Morehouse a kol. 2019). LPP dále prochází několika mechanismy, jako jsou oxidace, redukce, isomerace či konjugace, které generují řadu cyklických a bicyklických monoterpenů (Cikoš a kol. 2019).

Při mevalonátové cestě tedy vzniká DMAPP isomerací IPP, zatímco v cestě pyruvátové vznikají IPP a DMAPP odděleně (Dvořáková a kol. 2011).

2.2.2 Pyruvátová cesta

Pyruvátová cesta vzniku DMAPP a IPP začíná kondenzací dvou atomů uhlíku z pyruvátu s glyceraldehyd-3-fosfátem, a tak začíná šestistupňová syntéza IPP a DMAPP. Následnou kondenzací IPP a DMAPP vzniká GPP za přítomnosti GPP-synthasy. Tvorba základního skeletu monoterpenů vzniká transformací GPP monoterpenocyklasami (Dvořáková a kol. 2011).

Jednotlivé monoterpeny jsou tvořeny modifikací základního skeletu dané monoterpenické skupiny. Nepochlorné monoterpenické uhlovodíky jsou dále hydroxylovány (pomocí cytochromu P450), acylovány (acyltransferasou) nebo oxidovány (nespecifickými alkoholdehydrogenasami) (Dvořáková a kol. 2011). Tento proces je znázorněn na Obrázek 3.



Zástupci základních monoterpenických podskupin:
 myrcen (6), limonen (7), 3-karen (8), α -thujon (9), α -pinen (10),
 kafir (11), a z nich dalšími transformacemi vznikající deriváty:
 myrcenol (12), karvon (13), 3-karen-5-on (14), sabinen-hydrát
 (15), verbenon (16), isoborneol (17)

Obrázek 3 Monoterpeny a jejich deriváty (Dvořáková 2011)

2.3 Monoterpeny

Monoterpeny, stejně jako ostatní terpeny mohou být acyklické, monocyklické, ale i bicyklické sloučeniny. Máme více než tisíc druhů monoterpenů (Dvořáková a kol. 2011).

Jsou to přírodní produkty charakteristické vůně, jejich funkce však zůstává stále nejasná. Pravděpodobně se uplatňují v regulaci růstu, reprodukčním cyklu, přenosu signálů různých organismů a zejména v obranných mechanismech (Dvořáková a kol. 2011, Reid a kol. 2017).

Monoterpeny jsou považovány za sekundární metabolity rostlin postrádající roli v základních rostlinných procesech. Rostlina je produkuje, aniž by byly využity jako zdroj energie nebo zásobní látky. Sekundární metabolity mohou rostlině sloužit jako detoxikační faktory, atraktanty, morforegulatory nebo jako látky obranné (Dvořáková 2011). Předpokládá se, že primární funkce sekundárních metabolitů spočívá nejvíce v odpuzování patogenů a býložravců (Reid a kol. 2017). Jejich význam je důležitý zejména v zajišťování interakce mezi rostlinou a prostředím a v komunikaci mezi rostlinami. Monoterpeny také chrání rostlinu před vysycháním a napadením škůdci (Dvořáková a kol. 2011). Zároveň mohou sloužit i jako lákadlo pro opylující hmyz (Wojtunik-Kulesza a kol. 2019).

Důležitou roli hrají monoterpeny zejména ve vztahu s býložravci. Živočichové řídicí se čichem nekonzumují rostliny, které jim nevoní. Pokud jsou pro ně atraktivnější rostliny v

omezeném množství, konzumují i ty, které jim nevoní (Dvořáková a kol. 2011, Wojtunik-Kulesza a kol. 2019). Takovým příkladem jsou α -thujon či β -thujon, monoterpeny s neurotoxickým účinkem, které na vysokou zvěř působí protipožerově. Odpudivé vlastnosti vykazoval u ovcí i kafr obsažený v pelyňku (Dvořáková a kol. 2011). U býložravců je citlivost na toxicitu rostlin různá. Je dána tím, jak velkou má býložravec energetickou rezervu typicky ve formě lipidů. Velká energetická rezerva může zvýšit toleranci býložravce k sekundárním metabolitům. Důvodem může být jednak energetická náročnost detoxikace, uložení detoxikačních enzymů v lipidech nebo lipidy ředící lipofilní toxiny (Reid a kol. 2017).

Monoterpeny jsou součástí obranného systému jehličnanů ve směsi zvané oleoresin. Oleoresin je komplexní směs různých těkavých monoterpenů, netěkavých diterpenů a seskviterpenů. Tato směs vzniká zejména jako reakce na biotický stres (Chiu a kol. 2017).

Některé druhy monoterpenů emitované stromy na jejich obranu mohou být zároveň prekurzory hmyzích agregačních feromonů. Takovým příkladem může být sameček lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), jehož hostitelem je smrk ztepilý (*Picea abies*), který vylučuje pryskyřici s vysokým obsahem α -pinenu. Monoterpen α -pinen po požití lýkovcem spustí produkci agregačních feromonů. Jejich tvorba signalizuje vhodnou dobu k napadení hostitelské rostliny a řídí páření kůrovců. Zároveň lýkožrout produkuje antiagregační feromony, kterými moduluje hustotu napadení smrku a odpuzuje další hmyz (Dvořáková kol. 2011).

Agregační či odpuzující vlastnosti mají i monoterpeny různých druhů borovic. Borovice se proti škůdcům brání produkcí pryskyřice, která je až z poloviny složena z těkavých monoterpenů. Můžeme zde nalézt až 20 druhů monoterpenů. Škůdcem borovic může být kůrovec, pro něhož jsou monoterpeny borovice atraktivní i toxické zároveň. Po napadení borovice se může produkce monoterpenů zvýšit až stokrát. Přesný mechanismus akutní toxicity, kterým na kůrovce působí není znám. Pravděpodobně však monoterpeny narušují lipidové dvojvrstvy buněk. Pokud se i přes zvýšenou produkci monoterpenů začnou kůrovci množit, strom nakonec zabijí (Reid a kol. 2017).

Monoterpeny mohou také sloužit u hmyzu jako poplašný feromon nebo u obojživelníků jako pachový signál. Například u žáby druhu *Litoria ewingi* je složen z α -pinenu, limonenu a eukalyptu (Dvořáková kol. 2011).

Aromatické rostliny plné těkavých isoprenoidů přitahovaly pozornost člověka odjakživa. Lékaři z dob starověku a středověku si takových rostlin velmi vážili. V moderní době se již tolik nevyužívají. Jedním z důvodů je nedostatečné dosažení léčivého účinku při

perorálním podáváním. Monoterpeny jsou malé molekuly lipofilní povahy a z tohoto důvodu vzniká problém při jejich transportu do krevního řečiště. V klinických studiích zaměřených na léčbu rekurentního glioblastomu však bylo zjištěno, že jsou účinné při nasádním podání (Wojtunik-Kulesza a kol. 2019).

Mnoho monoterpenů má na zdraví člověka pozitivní vliv. Rostlinné silice i jednotlivé monoterpeny se mohou používat jako pomocné prostředky při léčení fyzických a psychických nemocí, ale rovněž jako preventivní prostředky proti nachlazení a chřipce. Některé mají dokonce protinádorové účinky, jiné působí proti srdečním chorobám či předchází osteoporóze (Dvořáková kol. 2011). Další druhy monoterpenů mají protiplísňové a antibakteriální účinky (Wojtunik-Kulesza a kol. 2019).

Některé druhy silic a terpenoidů mohou vykazovat příznivé účinky na patologické procesy vyvolané β -amyloidem, který hraje důležitou roli při Alzheimerově chorobě (Wojtunik-Kulesza a kol. 2019).

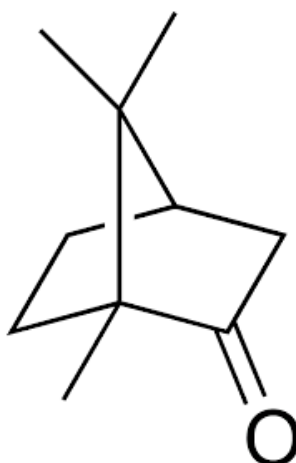
Pro některé druhy hmyzu jsou monoterpeny toxické, a proto se používají jako insekticidy. Tyto sloučeniny jsou považovány za dobrou alternativu syntetických insekticidů. Jejich výhodou je nízká toxicita vůči savcům či jiným necílovým organismům a také jejich biologická rozložitelnost v životním prostředí (Tong a kol. 2012). Toxické mohou být monoterpeny různých druhů borovic. Jejich toxicita vůči hmyzu dosahovala srovnatelných dávek jako při použití syntetických insekticidů (Chiu a kol. 2017). Mechanismem insekticidního účinku bývá inhibice růstu, rozmnožování nebo zabránění vývoje hmyzu. Běžně používanými látkami proti moskytům jsou eugenol, linalool, thymol, kafr, citronellol a citronellal (Dvořáková kol. 2011). Dalším mechanismem může být zásah na molekulární úrovni do tyraminových, GABAergních či cholinergních receptorů nervové soustavy hmyzu (Tong a kol. 2012).

Některé monoterpeny mohou být pro člověka toxické. Toxické druhy monoterpenů jsou často ketonové sloučeniny (Dvořáková kol. 2011). Silice z máty polej (*Mentha pulegium*) obsahující hepatotoxický pulegon se kdysi zneužívala jako abortivum k vyvolání potratu. V játrech pulegon způsobuje tvorbu reaktivních metabolitů, které mohou být zodpovědné za idiosynkratickou toxicitu (Zárybnický a kol. 2018b). Pro svou neurotoxicitu, která se projevuje halucinacemi a hyperaktivitou, je známý α -thujon z pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*) (Dvořáková a kol. 2011).

Historicky byla k vyvolání potratu využívána celá řada rostlin a jejich odvarů, ale proměnlivý obsah aktivních složek vedl k problematickému dávkování, a tím často k selhání organismu až smrti. Také kafr může potrat vyvolat, neboť je toxický pro nenarozený plod, který postrádá enzymy nutné k jeho degradaci (Dvořáková kol. 2011).

2.4 Kafr

V experimentální části diplomové práce jsem se zabývala účinky isomerů kafru, proto se mu v této části práce budu věnovat podrobněji. Kafr je cyklický keton ze skupiny monoterpenů. Systematický název kafru je 1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-on (Rahimi a kol.2017). Jeho chemický vzorec je na Obrázek 4.



Obrázek 4 Chemický vzorec kafru (Zdroj:< <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kafr>>)

Název kafr byl odvozen od starého malajského „Kapuru“ a arabského „Kafuru“, což znamená křída z Barusu. Barus byl starobylý přístav na západě Sumatry. Právě s kafrem mezi Sumatrou a arabskými ostrovy docházelo k velkému mezinárodnímu obchodování (Rahimi a kol. 2017).

Kafr se kdysi získával z kůry stromu kafrovník lékařský, latinsky zvaného *Cinnamomum camphora* (Obrázek 5) (Rahimi a kol. 2017). Je obsažen ve všech siličných buňkách stromu. Ve formě silice se zde nevyskytuje pouze kafr, ale také acetaldehyd, terpineol, eugenol, borneol, pinen, felandren, dipenten či kadinen. Během stárnutí stromu se obsah kafru zvyšuje na úkor snižování obsahu jiných látek, zejména množství borneolu (Spilková a kol. 2016).



Obrázek 5 *Cinnamomum camphora* (Zdroj: < <https://nurserylive.com/products/cinnamomum-camphora-camphor-tree-seeds>>)

Kafrovník je domácím stromem ve východní Asii, Japonsku či jižní Číně, pěstovat ho lze také v Jižní Africe, Brazílii nebo na ostrově Cejlon (Spilková a kol. 2016). Kafr je složkou různých potravin a bylin (bazalka, koriandr, majoránka, rozmarýn nebo šalvěj) (Aquilar a kol. 2008).

V předislámské době byl samotný kafr velmi známý a hojně využívaný jako příchuť do nápojů. Už tehdy íránský lékař a filozof Avicenna v encyklopedii zmiňoval, že kafr působí jako inhibitor libida. Jeho účinky však byly využívány zejména pro zvýšení dechové kapacity, otevírání smyslů, čištění mysli a také ke snížení hysterie (Rahimi a kol. 2017).

V 19. století byl využíván jako lék proti bolesti, expektorans nebo proti zánětu. Zároveň se mohl využít jako stimulační prostředek pro vyvolání potratu. Muslimové využívali antiseptických účinků kafru ke koupání mrtvých těl. Za účelem snížení sexuální touhy byl kafr přidáván do jídla vojákům a studentům (Rahimi a kol. 2017).

Kafr spolu s 1,8-cineolem, borneolem, pinenem, limonenem, kamfenem a myrcenem můžeme nalézt v silici rozmarýnu, latinsky zvaného *Rosmarinus officinalis* nebo synonymicky známého *Salvia rosmarinus*. Jedná se o celosvětově pěstovanou rostlinu, která se proslavila v medicíně, obzvláště v medicíně tradiční. Mezi hlavní složky silice patří 1,8-cineol, kafr a α -pinen. Kafru jsou zde přičítány nejen antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, ale i antialergické či antimutagenní (Borges a kol. 2019). V silici z pelyňku judského (*Artemisia Judaica*) je kafr hlavní složkou vykazující protizánětlivou aktivitu. V oleji ze Sandarakovníku článkovaného (*Tetraclinis articulata*) se vyznačuje významnou antioxidační aktivitou. Účinky vyplývají ze

studií, při kterých se používaly modely akutní zánětlivé reakce edému tlapky a edému ucha u potkanů nebo myši (Borges a kol. 2019).

V přírodě se vyskytují oba enantiomery kafru. Syntetický kafr je opticky neaktivní sloučenina (Zuccarini 2009). V silici ze stromu *Cinnamomum Camphora* je až 84 % D-kafru. Silice z bylin jsou charakterizovány typickým poměrem enantiomerů. Například silice z koriandru setého (*Coriandrum sativum*) obsahuje nadbytek L-kafru (72-75 %), zatímco pro silice ze šalvěže lékařské (*Salvia officinalis*) v 50-70 %, šalvěže muškátové (*Salvia sclarea*) 90 % a bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) až 94 % je typický nadbytek D-kafru (Aquilar a kol. 2008).

V dnešní době je syntetizován z α -pinenu (hydrokarbonový derivát) obsaženého v terpentýnovém oleji (Rahimi a kol. 2017).

2.4.1 Výroba kafru z terpentýnového oleje

Kafr lze vyrábět procesem, ve kterém reaguje terpentýn spolu s kyselinou šťavelovou. Kyselina šťavelová poskytuje karboxylovou skupinu, díky níž vznikají éterické soli. Tyto soli jsou oxidačními procesy přeměňovány na kafr. Směs terpentýnu a kyseliny šťavelové se zahřívá v rozmezí 120–130 °C, přičemž vzniká směs borneolu, borneol-oxalátu, borneolformiátu, kafru a odpadních polymeračních produktů. Tato směs se smíchá spolu s žíravými alkáliemi, pomocí nichž se rozloží éterické soli borneolu, a vznikne směs kafru a borneolu s jeho nečistotami. Výsledný produkt je destilován s vodní párou, čímž se oddělí směs éterických látek od nečistot. Směs obsahuje pinyloformiát, pinyloxalát, borneol a kafr s trochou olejovité hmoty. Borneol a kafr se od směsi dále oddělují mražením, odstředěním, drcením nebo promýváním. Poté směs zoxiduje pomocí dvojchromanu draselného a kyseliny sírové, díky čemuž se borneol přemění na kafr (Thurlow 1902).

2.4.2 Současné využití účinků kafru

V současné době se kafr využívá zejména pro své protizánětlivé a mírně analgetické účinky (Zuccarini 2009). Své místo má v přípravcích při léčbě neuralgických či revmatologických bolestí (Spilková a kol. 2016). Proto se z něho vyrábí masti pro zevní užití, které se používají pro úlevu od bolesti pohybového aparátu, včetně bolesti u fibrositid

(Zuccarini 2009). Obsah kafru v přípravcích pro zevní užití může být maximálně 25 % (Spilková a kol. 2016).

Účinků kafru lze využít jako rubefaciens, pro dilataci kapilár a zvýšení krevního oběhu v místě aplikace (Zuccarini 2009). Tímto účinkem způsobí začervenání pokožky a pocit tepla. Absorpce kafru probíhá přes kůži do cév v podkoží, až poté navozuje systémové účinky (Martínková a kol. 2018). Výhodou je snadná aplikace a snížené riziko systémových nežádoucích účinků (Švihovec a kol. 2018).

Můžeme jej využít i jako repelent, ale jeho nevýhodou je krátké působení, silná vůně a také může dráždit pokožku (Spilková a kol. 2016).

Kafrový olej lze využít jako expektorans, který má při požití dráždivé a karminativní účinky (snižující plynatost). Své využití může mít jako centrální analeptikum, tedy léčivo způsobující vazokonstrikci v CNS, což má za následek povzbuzující účinek. Pro tento účinek se podává v olejové formě injekčním způsobem, a to intramuskulárním nebo subkutánním podáním v množství 0,1-0,2 g kafru (Spilková a kol. 2016).

Intramuskulárním podáním léčivo proniká filtrací a difuzí velkými póry mezi endotelovými buňkami krevních a lymfatických vlásečnic. Nejvhodnější místo aplikace je horní zevní kvadrant velkého hýžděového svalu. Účinek nastupuje za 10-15 minut. Vzhledem k olejovitému charakteru se v místě aplikace vytvoří zásobní místo zvané depo, ze kterého se kafr pomalu uvolňuje (Švihovec a kol. 2018).

Subkutánním podáním látka prochází podobnými mechanismy absorpce jako při intramuskulárním podání, jen je absorpce pomalejší. Nástup účinku je zde zhruba za 15-20 minut. Záleží na místě aplikace a prokrvení dané oblasti (Švihovec a kol. 2018).

Nicméně jeho vnitřní užívání není považováno za bezpečné, a proto se pro tento účel užití nedoporučuje (Zuccarini 2009).

2.5 Metabolismus

Metabolismem procházejí látky jak endogenního, tak exogenního původu. Látky exogenního původu jsou látky tělu cizí a nazývají se xenobiotika. Do této skupiny patří právě zmiňované monoterpeny včetně kafru.

Metabolismus, též označovaný jako biotransformace či biodegradace, je sled biochemických reakcí (Martínková a kol. 2018). Biotransformace hraje zásadní roli v eliminaci potenciálně toxických exogenních chemikálií, odstranění toxických vedlejších produktů endogenního metabolismu a kontrole hladin a distribuci endogenních signálních molekul (Meech a kol. 2019). Probíhá primárně v játrech, většinou v endoplasmatickém retikulu buněk hepatocytů. V menší míře se odehrává také v plicích, ledvinách, střevní stěně, svalech či slezině (Hirt a kol. 2016).

Pro většinu metabolických reakcí potřebujeme účast enzymů, energie a spolupůsobení kofaktorů (Croom a kol. 2012). Při biotransformaci se mění chemická struktura látek včetně jejich vlastností (Hirt a kol. 2016). Látky jsou přeměňovány na metabolity, které získávají vyšší rozpustnost ve vodě. Díky větší hydrofilitě jsou metabolity snáze vyloučeny žlučí nebo močí z těla ven (Martínková a kol. 2018). Kafr i další druhy monoterpenů jsou lipofilního charakteru, takže v organismu procházejí metabolismem tak, aby se zvýšil jejich hydrofilní charakter.

Biotransformace má dvě fáze. V I. fázi dochází k oxidačním, redukčním či hydrolytickým procesům. Ve II. fázi interaguje metabolit z I. fáze s konjugačním činidlem, což je látka tělu vlastní (Hirt a kol. 2016).

2.5.1 I. fáze biotransformace

V I. fázi biotransformace dochází k oxidačním reakcím, jako jsou oxidace alkoholů, oxidace nenasycených vazeb (epoxidace), *O*-dealkylace, *N*-dealkylace, *N*-oxidace, *S*-oxidace, oxidační deaminace či hydroxylace. Z redukčních reakcí zde probíhá redukce aldehydů, ketonů, a také nitroskupin. Z hydrolytického typu reakcí dochází k hydrolýze esterů, amidů nebo k hydrolytickému štěpení (Hirtl a kol. 2016). Oxidační reakce však v četnosti v reakci s nejrůznějšími substráty naprosto převládají (Švihovec a kol. 2018).

V průběhu I. fáze dochází zpravidla k zavedení polární funkční skupiny do základní molekuly. Jedná se především o hydroxylové (-OH), aminoskupiny (-NH₂), thiolové (-SH), karbonylové (=CO) a karboxylové (-COOH) skupiny. Vznikají tak polárnější produkty, snadněji vylučitelné močí. Některé látky již v sobě tyto skupiny mají, a proto lze tuto fázi u některých xenobiotik přeskočit a pokračovat rovnou II. fází, tedy konjugací (Dostálek a kol. 2006).

2.5.1.1 Cytochrom P450

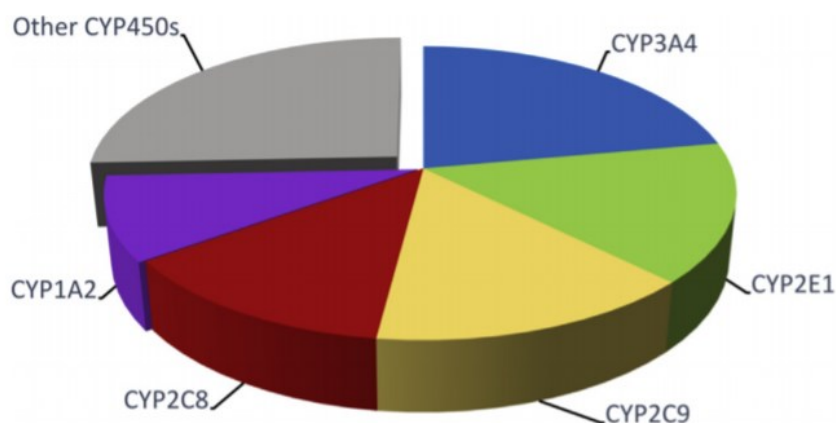
Oxidační reakce v I. fázi probíhají zejména v enzymatickém systému cytochromu P450 (CYP). Cytochrom P450 představuje nadrodinu monooxygenas, které obsahují hem (Foti a kol. 2016). Systém je u eukaryot pevně vázán na membránu endoplasmatického retikula, mitochondrií nebo jádra (Dostálek a kol. 2006). Tyto enzymy se vyskytují především v lidských jaterních mikrosomech, což jsou váčky, které vznikají rozbitím endoplasmatického retikula a následným spojením vzniklých fragmentů při homogenizaci tkáně. Ke studiu metabolismu cizorodých látek *in vitro* se často používají jaterní mikrosomy i celé jaterní buňky, tedy izolované hepatocyty (Švihovec a kol. 2018). Enzymy této skupiny jsou exprimovány v mnoha dalších tkáních včetně střevní sliznice, mozku, ledvin, plic a kůže (Waring a kol. 2019). Enzymy systému cytochromu P450 se podílejí na detoxikaci cizorodých chemických látek a metabolismu léčiv. Jsou nezbytné pro produkci cholesterolu, steroidů, prostacyklinu či tromboxanu A₂ (Lynch a kol. 2007). Dodnes bylo popsáno více než 7000 různých genů cytochromu P450. U člověka je známo 57 různých isoform CYP (Dostálek a kol. 2006).

Jednotlivé isoformy se od sebe liší strukturou i substrátovou specifitou. Název CYP je určen pro každý enzym, spadající do tzv. nadrodiny cytochromu P450. Dle podobnosti aminokyselinové struktury se dále enzymy rozdělují do rodin a podrodin, a proto pak získávají značení velkými písmeny a arabskými číslicemi (Dostálek a kol. 2006).

Na biotransformaci xenobiotik a léčiv, které byly doposud popsány, se CYPy odhadem podílí až ze tří čtvrtin (Dostálek a kol. 2006, Švihovec a kol. 2018). Mezi CYPy, které se významnou měrou podílejí na biotransformaci xenobiotik, patří CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 a CYP3A5 (Foti a kol. 2016). Nejdůležitější enzymy přítomné v lidských játrech jsou graficky znázorněné na Obrázek 6. CYP3A4 je nejrozšířenější formou všech cytochromů P450 a podílí se na většině známých přeměn léčiv, které probíhají za účasti CYPů (Kousalová a kol. 2003).

Oxidace je nejčastější reakcí, kterou se cytochrom P450 do metabolismu zapojuje. Princip reakce spočívá v přidání jednoho nebo více atomů kyslíku k původní molekule. Nicméně existuje mnoho dalších procesů, do kterých se enzymy zapojují, což jsou například aromatická hydroxylace, alifatická hydroxylace, *N*-dealkylace, *O*-dealkylace či deaminace (Almazroo a kol. 2017).

Vlivem genetického polymorfismu může být biotransformační cesta ovlivněna, a tím je změněna odpověď pacienta na podané léčivo. Tyto enzymy pak mohou být indukovány nebo inhibovány léky, což může klinicky významně ovlivnit lékové interakce a způsobit nežádoucí účinky léčiv či selhání léčby (Lynch a kol. 2007).



Obrázek 6 Graf ukazující expresi různých isoformů cytochromu P450 v játrech člověka (Almazroo a kol. 2017).

2.5.2 II. fáze biotransformace

V naprosté většině případů II. fáze navazuje na I. fázi (Švihovec a kol. 2018). V II. fázi biotransformace dochází k interakci vzniklého biotransformačního meziprojektu z první fáze nebo parentní látky s konjugacími činidly. Proto se tato fáze nazývá konjugací nebo syntetická. Mezi konjugacími činidly patří glutamin, glycin, glutathion, kyselina glukuronová, S-adenosylmethionin, sulfát či acetát (Dostálek a kol. 2006).

Vzniklý konjugát je látka velmi polární, která je schopna disociace. V tomto stupni je látka v konečné formě následně vyloučena z organismu. Není schopna reabsorpce (Dostálek a kol. 2006).

Z enzymů II. fáze biotransformace se zde zúčastňuje odhadem z 15 % UDP-glukuronosyltransferasa (UGT). Dalšími 5 % se na metabolismu rovnoměrně podílí také sulfotransferasa (SULT), glutathion-S-transferasa (GST) a N-acetyltransferasa (NAT) (Švihovec a kol. 2018).

2.5.2.1 UDP-glukuronosyltransferasa

UGT jsou nejvýznamnějšími enzymy této fáze biotransformace. Jsou to enzymy vyskytující se v membránách hepatálních buněk, ale i v různých extrahepatálních tkáních (Sundararaghavan a kol. 2017, Švihovec a kol. 2018).

Mezi endogenní substráty UGT patří žlučové kyseliny, hormony štítné žlázy, steroidy a bilirubin. Exogenními substráty jsou tisíce xenobiotik včetně karcinogenů, léčiv a látek znečišťujících životní prostředí (Sundararaghavan a kol. 2017). UGT jsou zodpovědné za glykosylaci těchto látek. Enzym přidává cukerný zbytek z nukleotidového kofaktoru k malým exogenním či endogenním lipofilním sloučeninám (Hu a kol. 2016). Úkolem UGT je katalyzovat konjugaci polárního zbytku glukuronové kyseliny s xenobiotikem za spotřeby energie v podobě uridindifosfátu (UDP) (Švihovec a kol. 2018). Polaritu vzniklého konjugátu zajišťuje funkční karboxylová skupina kyseliny glukuronové, která je zde volná (Švihovec a kol. 2018). Vzniklé glukuronidy jsou neaktivní a rozpustné ve vodě, a tak se následně vylučují z těla močí nebo stolicí (Meech a kol. 2019). Glukuronidace hraje důležitou roli v metabolismu a clearance karcinogenů.

Enzymy UGT se na základě aminokyselinové sekvence dělí celkem do čtyř rodin - UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8 (Hu a kol. 2016). U člověka jsou exprimovány pouze rodiny UGT1 a UGT2 (Sundararaghavan a kol. 2017). Na metabolismu léčiv se podílí enzymy z podrodin UGT1A a UGT2B (Hu a kol. 2016). V játrech bylo objeveno celkem šest isoenzymů, jedná se o UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6 a UGT1A9 (Švihovec a kol. 2018).

U enzymu UGT byla popsána přítomnost různých genetických variant. Genetické variace v UGT mohou změnit metabolismus a dispozici léčiva, čímž se zvyšuje náchylnost k chorobám (Meech a kol. 2019). Genetický polymorfismus genu pro UGT1 souvisí s Crigler-Najjarovým i Gilbertovým syndromem. U těchto syndromů dochází k poklesu konjugace bilirubinu, a tím se zvyšuje hladina volného bilirubinu v séru. U Crigler-Najjarova syndromu se vyskytují extrémně vysoké hladiny nekonjugovaného bilirubinu, které mohou vést bez včasné diagnostiky a transplantace jater ke smrti. Pacienti s Gilbertovým syndromem mají hladinu bilirubinu jen mírně zvýšenou (Sundararaghavan a kol. 2017).

V případě výskytu genetického polymorfismu, který vede ke snížení exprese, je tento stav spojován se zvýšeným rizikem vzniku různých druhů rakoviny. Například alely

UGT1A7*2 a UGT1A7*3 jsou asociovány se zvýšeným rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu, protože UGT1A7 se významnou měrou podílí na biotransformaci potravinových a environmentálních karcinogenů, jako jsou heterocyklické aminy a deriváty benzo[a]pyrenu (Hu a kol. 2019).

2.5.2.2 Sulfotransferasy

Sulfotransferasy (SULT) katalyzují přenos sulfátu z molekuly 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na molekulu léčiva nebo jeho derivátu schopného sulfát akceptovat (Švihovec a kol. 2018).

Enzymy SULT u člověka jsou členy čtyř rodin – SULT1, SULT2, SULT4 a SULT6. Jsou exprimovány v cytosolu nebo vázány na membráně endoplasmatického retikula či Golgiho aparátu. Nejčastěji se vyskytují v játrech, ale mohou být i v ledvinách, plicích, mozku, ve střevech a krevních destičkách (Švihovec a kol. 2018). Cytosolická SULT katalyzuje sulfokonjugaci malých lipofilních xenobiotik, ale i látek tělu vlastních (Nagata a kol. 2000).

Nejvýznamnější formou u člověka je jaterní cytosolická SULT1A1. Enzym je známý jako enzym přenášející sulfát na fenolické látky (Švihovec a kol. 2018). Obecně jsou považovány za hlavní enzymy podílející se na detoxikaci xenobiotik. V játrech představuje až 70 % všech SULT právě SULT1A1 spolu s přítomnou SULT1B1. Enzym SULT1B1 je hojně zastoupen i v tenkém střevě. Oba typy enzymů jsou schopny sulfatovat velké množství různých druhů substrátů (Coughtrie a kol. 2016). Každá cytosolická SULT má extrémně širokou substrátovou specifitu. Sulfátová konjugace je katalyzována právě cytosolickými sulfotransferasami. V xenobiotickém i endobiotickém metabolismu je to velmi důležitý proces. Ve většině případů sulfatace deaktivuje oba typy metabolických cest za účelem zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě a urychlení vylučování (Kodama a kol. 2013).

Exprese genů SULT je primárně regulována jadernými receptory, zejména prostřednictvím PXR (pregnanový X receptor) a CAR (konstitutivní androstanový receptor) (Kodama a kol. 2013). Genetické polymorfismy sulfotransferas mohou ovlivnit jejich funkci, a tím vyvolat terapeutické a nežádoucí účinky na podané léčivo. U lidí jsou tyto genetické změny spojovány s různými chorobami, včetně rakoviny. Farmakokinetika léčiv metabolizovaných SULT může hrát roli při vývoji rakoviny prsu, endometria, kolorektálního karcinomu a

rakoviny prostaty. U steatózy, cirhózy jater nebo diabetu mellitu je exprese a aktivita SULT významně snížena (Chen a kol.2015).

2.5.2.3 Glutathion-S-transferasy

Proteiny rodiny glutathion-S-transferasy (GST) detoxikují širokou škálu nebezpečných látek, jakými jsou reaktivní kyslík nebo různé druhy xenobiotik. Podílejí se na detoxikaci aromatických látek a rozpouštědel, a proto mají významnou roli zejména v toxikologii (Švihovec a kol. 2018).

Chrání organismus před následky oxidačního stresu, jelikož chrání před poškozením životně důležité buněčné složky (proteiny, nukleové kyseliny). V důsledku poškození DNA by mohlo dojít ke vzniku mutací, což by podporovalo případný proces karcinogeneze (Rashidi a kol. 2019). GST se také podílí na detoxikaci endogenních sloučenin a znečišťujících látek, jako jsou pesticidy a herbicidy (Zhou a kol. 2020). GST jsou přítomny typicky v buněčném cytosolu buněk jater, střev, plic, ledvin, nadledvin a varlat (Švihovec a kol. 2018).

GST rozlišujeme na formy rozpustné a formy vázané na membránu mitochondrií nebo mikrosomů. Cytosolické GST se na základě své struktury dělí do 13 tříd, které jsou označovány jako alfa, beta, delta, epsilon, zéta, théta, mí, ný, pí, sigma, tau, fi a omega. Mitochondriální GST jsou tvořeny třídou kapa a mikrosomální GST se dělí do čtyř podskupin, které se označují jako MAPEG I-IV (*Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*) (Boušová a Skálová 2012).

Funkce GST spočívá v katalýze konjugace chemických sloučenin exogenního a endogenního původu s glutathionem (Klusek a kol. 2014). GST konjugují molekulu glutathionu (γ -glutamylcysteinylglycinu) přes atom síry cysteinu s molekulou xenobiotika (Švihovec a kol. 2018). Na reakcích tohoto typu pracují spolu s glutathionperoxidasami (GPx), zabraňují tak poškození reaktivními formami kyslíku jako jsou volné radikály a peroxidy (Mansour a kol. 2015). Tímto detoxikačním mechanismem prochází například produkty peroxidace lipidů, různé druhy chemoterapeutik či environmentální karcinogeny (Rashidi a kol. 2019). GST se také podílí jako isomerasa při tvorbě stabilnějších produktů prostaglandinů (Rashidi a kol. 2019). U GST je vysoká frekvence polymorfismů (Klusek a kol. 2014). Ty mohou vést ke snížení genové exprese GST, což následně může nepříznivě ovlivnit její biologické funkce (Hongling a kol. 2020).

Polymorfismus genu GSTM1 zahrnuje dědičnou delecii tohoto genu, která podmiňuje nulovou alelu GSTM1*0 či GSTT1*0. U homozygotů je pak nulový genotyp GSTM1*0/*0 příčinou úplné absence funkčního proteinu, a tím i výrazně pomalejší eliminace karcinogenů (Beránek a kol. 2016). U nulových genetických polymorfismů GSTM1*0, GSTP1*0 a GSTT1*0 dochází k nadměrnému oxidačnímu stresu. Tento stav zvyšuje riziko vzniku koronárního poškození (arteriální stenózy), což může vést následně k infarktu myokardu (Hongling a kol. 2020). Genotyp GSTT1*0 může vést ke zvýšení ROS ve střevech, které následně zvyšují riziko rozvoje ulcerózní kolitidy (Broekman a kol. 2014).

Deficit aktivity GSTM1 je pozorován až u 30-50 % populace. Nulový genotyp GSTM1 souvisí s nízkou kapacitou pro detoxikaci některých xenobiotik. Také je snížena regulace oxidačního stresu, což vede k poškození buňky způsobené aktivitou volných radikálů (Klusek a kol. 2014).

2.6 Exkrece

Exkrece je proces, který ukončuje přítomnost xenobiotik a jejich metabolitů v organismu. Orgány, které se vylučování účastní nejvíce, jsou ledviny a játra (Švihovec a kol. 2018).

2.6.1 Ledvinná exkrece

Ledviny jsou hlavním exkrečním orgánem pro léčiva rozpustná ve vodě, polární či ve vodě rozpustné metabolity lipofilních léčiv (Švihovec a kol. 2018). Látky polární se vylučují poměrně rychle oproti látkám lipofilního charakteru (Dostálek a kol. 2006).

Molekuly xenobiotik procházejí glomerulární membránou jako volné, s ničím nevázané molekuly. Prostoupit totiž mohou pouze látky s molekulovou hmotností méně než 65 000 Da. Látky se dostanou do ultrafiltrátu, který složením odpovídá plazmě, jen neobsahuje bílkoviny. Při reabsorpci vody v ledvinných tubulech tyto molekuly nepodléhají pasivní difuzi. V tomto důsledku koncentrace vylučované látky narůstá. Jestliže dosáhne vysokých koncentrací, je opětovně vstřebávána do krve. Molekuly vázané s bílkovinou, které neprošly přes glomeruly se do moči dostanou přes proximální tubuly kde dochází k aktivnímu transportu pomocí

specifických přenašečových systémů. Prostoupí tak opět pouze volné molekuly (Dostálek a kol. 2006).

2.6.2 Jaterní exkrece

Játry jsou vylučovány primárně konjugáty s kyselinou glukuronovou. Nekonjugovaná léčiva jsou vylučována velmi zřídka (Dostálek a kol. 2006). Vylučování játry spočívá v přestupu látky z krve přes sinusoidální i luminální membránu hepatocytu (krevní a žlučový pól hepatocytu) a následném transportu žlučí do střeva (Švihovec a kol. 2018). Přestup lipofilních látek z krve v sinusoidách do hepatocytu se děje pomocí pasivní difuze, fungující na principu ustanovení koncentračního gradientu mezi dvěma membránami hepatocytu, a to krevním a žlučovým pólem (Dostálek a kol. 2006, Švihovec a kol. 2018). Sekundárně aktivním transportem pomocí přenašečů SLC (*solute carrier*) přechází zejména větší polární molekuly. Metabolity xenobiotik do krve vstupují přes bazolaterální membránu hepatocytů pomocí membránových transportérů či difuzí. Následně projdou hepatickými cévami, dolní dutou žílou až do ledvin, ze kterých jsou posléze vyloučeny (Švihovec a kol. 2018).

Hepatobiliární exkrece nastává při velmi vysoké koncentraci xenobiotik či jejich metabolitů. Na žlučovém pólu hepatocytu se molekuly do žlučových cest dostávají jednosměrným aktivním transportem pomocí přenašečů. Zároveň látky, co se dostanou do žluči, nesmějí pasivní difuzí přecházet ze žlučových cest či žlučnicku zpět do krve, přestože je zde koncentrace sto i vícenásobně vyšší (Švihovec a kol. 2018).

V duodenu a tenkém střevě mohou být konjugáty resorbovány zpět do krve, tím se prodlouží účinek podané látky, hovoříme o tzv. enterohepatálním oběhu (Dostálek a kol. 2006, Švihovec a kol. 2018).

2.7 Toxické účinky po užití bylinných produktů

Rostlinné přípravky různých značek jsou od sebe složením odlišné, jelikož pro ně nejsou uloženy žádné standardy kvality (Zárybnický a kol. 2018a). Jako doplněk stravy mnohdy nemusí ani prokazovat žádné příznivé účinky, ač některé přípravky je vykazovat mohou. Ve spoustě případů také chybí vědecké důkazy o jejich použití. Jejich používání je proto převážně založeno na víře a naději (Stickel a kol. 2015).

Od bylinných přípravků společnost očekává podporu zdraví, prevenci chorob, zlepšení zdravotního stavu, imunity, kvality života, také emoční podporu, dobrý terapeutický vztah k léčivům a neposlední řadě i podporu hojení (Stickel a kol. 2015). Tím, že se jedná o přírodní produkt, jsou přípravky považovány za „bezpečné“ (Zárybnický a kol. 2018a). Negativní účinky se při jeho užívání neočekávají, jsou vnímány jako neškodné alternativy konvenční medicíny (Stickel a kol. 2015). Nicméně se každý rok setkáváme s případy jaterního poškození způsobeného užíváním bylinných přípravků (Zárybnický a kol. 2018a). Jaterní toxicitu mohou vyvolat i přidané složky v přípravku (Stickel a kol. 2015).

Až 65 různých druhů bylin a bylinných doplňků bylo identifikováno jako příčina onemocnění jater. Odhaleno bylo dalších 100 bylin či bylinných směsí tradiční čínské medicíny (Zárybnický 2018a). Hepatotoxické účinky bylinných přípravků je ale velmi obtížné prokázat. Neexistují žádné testy, které by prokázaly hepatotoxicitu způsobenou bylinnými produkty. A proto je zde nejdůležitější získat podrobnou proaktivní anamnézu pacienta o všech užívaných lécích a doplncích, pečlivé vyloučení ostatních příčin a hledání dostupných zpráv o podobných událostech spojených s přípravkem nebo složkami v něm obsažených (Stickel a kol. 2015).

Monoterpeny používané v kosmetice, farmaceutickém průmyslu či léčitelství mohou jaterní toxicitu také vyvolat. Principem toxicity jsou reaktivní metabolity, zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku a zhoršené schopnosti antioxidantních mechanismů (Zárybnický a kol. 2018a). Proto by měla být přírodním produktům, zejména s obsahem terpenů, věnována větší pozornost, zda i další druhy terpenů nemohou vykazovat hepatotoxické účinky pro lidský organismus (Zárybnický a kol. 2018a).

Játra jsou orgán, který je pro toxické účinky cílovou tkání. Ke xenobiotikům predisponují svou funkcí a strukturou vysokou citlivostí. Hepatocyty jsou často vystavovány perorálně podaných xenobiotikům bez jakékoliv systémové modifikace či ředění látky, jelikož se do jater dostávají přímo venózní krví z portálního oběhu (Zárybnický a kol. 2018a).

Jaterní toxicita může být způsobena přímým působením nebo prostřednictvím sekundárních účinků. Přímý mechanismus spočívá v poškození mitochondrií, endoplasmatického retikula, cytoskeletu, mikrotubulů i jádra buněk. Tím dojde k narušení jejich aktivity, narušení různých metabolických drah a buněčného dýchání. Výsledkem je intracelulární stres, který může vést k apoptóze nebo nekróze buněk (Singh a kol. 2011). Velmi náchylnými buňkami k toxickým účinkům se stávají ty, které se podílí na anabolických

pochodech. Toxické látky zde mohou působit jako antimetabolity nebo ovlivnit pochody související s produkcí mitochondriální energie (Zárybnický a kol. 2018a).

Častější jsou negativní účinky způsobené sekundárními mechanismy poškozování. Jedná se například o reaktivní metabolity kovalentně navázané na klíčové buněčné makromolekuly, čímž je deaktivují. Glutathion poskytuje svou detoxikační funkci pro navázání těchto látek, ale při velké koncentraci toxických produktů mohou být jeho kapacity vyčerpány (Singh a kol. 2011). Dále to může vést ke kolapsu syntézy ATP, špatné regulaci iontových gradientů a také oxidačnímu poškození jater, což způsobuje změnu signálních transdukčních drah (Zárybnický a kol. 2018a). Tím dochází k aktivaci či inhibici signálních kinas, transkripčních faktorů nebo genové exprese (Singh a kol. 2011).

Vlivem enzymatického odbourávání xenobiotik se mohou tvořit lokálně reaktivní toxické metabolity nebo se zvyšuje produkce kyslíkových meziproduktů, a tím dojde k překročení antioxidačních kapacit organismu (Zárybnický a kol. 2018a).

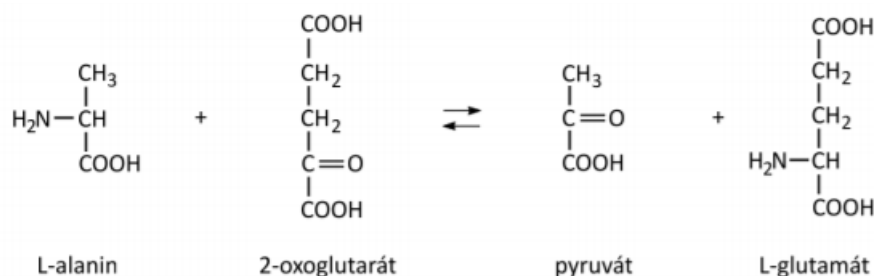
Každý hepatotoxický přípravek vyvolává různé jaterní změny. Buď jsou to změny funkční nebo morfologické. Dle těchto změn se liší i klinické projevy (Zárybnický a kol. 2018a). Bylinné přípravky jsou schopné vyvolat velké patologické jaterní změny. Jedná se například o zonální nekrózy, hepatitidu, cholestázu, steatózu, granulom, cévní léze nebo novotvary (Singh a kol. 2011). Mezi nejčastější příznaky hepatotoxicity patří únava, horečka, nauzea, anorexie, bolesti břicha, může se objevit vyrážka a zvracení (Teschke a kol. 2015). Za typické příznaky poškození jater jsou považovány ikterus a žloutenka, tmavá moč a světlá stolice (Singh a kol. 2011). Kvůli vysoké hladině bilirubinu také svědění kůže (Singh a kol. 2011). Někteří pacienti mohou vlivem nadměrné hepatotoxicity vykazovat až stav akutního selhávání jater, které bez transplantace může vést ke smrti (Teschke a kol. 2015).

Jedním z kritérií pro určení hepatotoxicity bylinných preparátů je využití stanovení laboratorních biochemických markerů, stanovení bilirubinu, aspartátaminotransferasy (AST), alaninaminotransferasy (ALT) a alkalické fosfatasy (ALP) (Teschke a kol. 2015). Markery hepatotoxicity jsou považovány zvýšené hladiny transaminas ve spojení s dvojnásobným zvýšením bilirubinu. Její potvrzení by mělo být doplněno o histopatologické vyšetření (Singh a kol. 2011). Výsledkem stanovení enzymů je jejich aktivita, včetně určení poměru ALT/AST. Jedná se o časná markery jaterních onemocnění. Při strukturním poškození jater bývá katalytická aktivita enzymů ALT a AST vyšší. Mitochondriální AST je vyplavována z hepatocytů až při nekróze, poměr katalytických aktivit AST/ALT je zde vyšší než 1,0. U

mírných forem onemocnění bývá poměr menší než 1,0 (Beránek 2013). Tyto enzymy pomáhají detekovat poškození hepatocytů. Po ukončení expozice danému hepatotoxickému přípravku se u pacientů se zvýšenými jaterními enzymy jejich hladiny obvykle vrátí na normální úroveň, a to během několika týdnů nebo měsíců (Teschko a kol. 2015, Singh a kol. 2011).

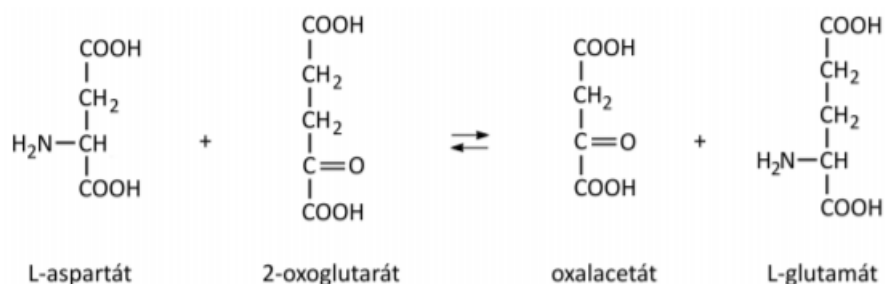
2.7.1 Laboratorní stanovení jaterních enzymů a bilirubinu

Pro stanovení katalytické aktivity enzymů se nejčastěji využívá fotometrická metoda, dnes již v běžné rutinní laboratoři plně automatizovaná (Beránek 2013). Při stanovení ALT katalyzuje transaminační reakci mezi alaninem a 2-oxoglutarátem. Tím vzniká pyruvát a glutamát. Pyruvát se pomocí laktátdehydrogenasy redukuje na laktát a zároveň se koenzym NADH oxiduje na NAD⁺. Pokles absorbance NADH je fotometricky monitorován (Beránek 2013). Začátek reakce je ve vzorcích znázorněn na Obrázek 7.



Obrázek 7 Stanovení ALT (Zdroj: <
<http://kolweb.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/aminotransferazy.pdf>>)

AST se stanovuje úplně stejně, jen katalyzuje reakci aspartátu a 2-oxoglutarátu na oxalacetát a glutamát. Tato reakce je znázorněna na Obrázek 8. Oxalacetát je dále redukován malátdehydrogenasou na malát. Opět se zde oxiduje NADH na NAD⁺ (Beránek 2013).



Obrázek 8 Stanovení AST (Zdroj: <
<http://kolweb.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/aminotransferazy.pdf>>)

U obou enzymů měříme pokles absorbance při 340 nm, který je přímo úměrný katalytické aktivitě enzymu (Beránek 2013).

U stanovení ALP je substrátem 4-nitrofenylfosfát, při hydrolýze v zásaditém prostředí vzniká jeho defosforylovaný produkt, který absorbuje při 405 nm. Absorbance je opět přímo úměrná katalytické aktivitě ALP (Beránek 2013).

Vyšší koncentrace celkového bilirubinu se vyskytují při poškození hepatocytů při onemocnění jater a žlučových cest. Zvýšená koncentrace může být jak z konjugovaného, tak z nekonjugovaného bilirubinu, ale samozřejmě i zvýšenou koncentrací obou frakcí (Beránek 2013).

Bilirubin je stanovován také fotometricky van den Berghovou diazoreakcí. Stanovení je založeno na kopulaci bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou. Následně zde vzniká azobarvivo, které absorbuje v rozmezí 520–550 nm. Reakce se odehrává v kyselém prostředí. Pro stanovení celkového bilirubinu je nezbytná přítomnost akcelerátoru, kterým je zde kofein spolu s benzoanem sodným nebo methanolem. Pokud akcelerátory do reakce nejsou přidány, vzniklé azobarvivo je vytvořeno pouze z přímého konjugovaného bilirubinu (Beránek 2013).

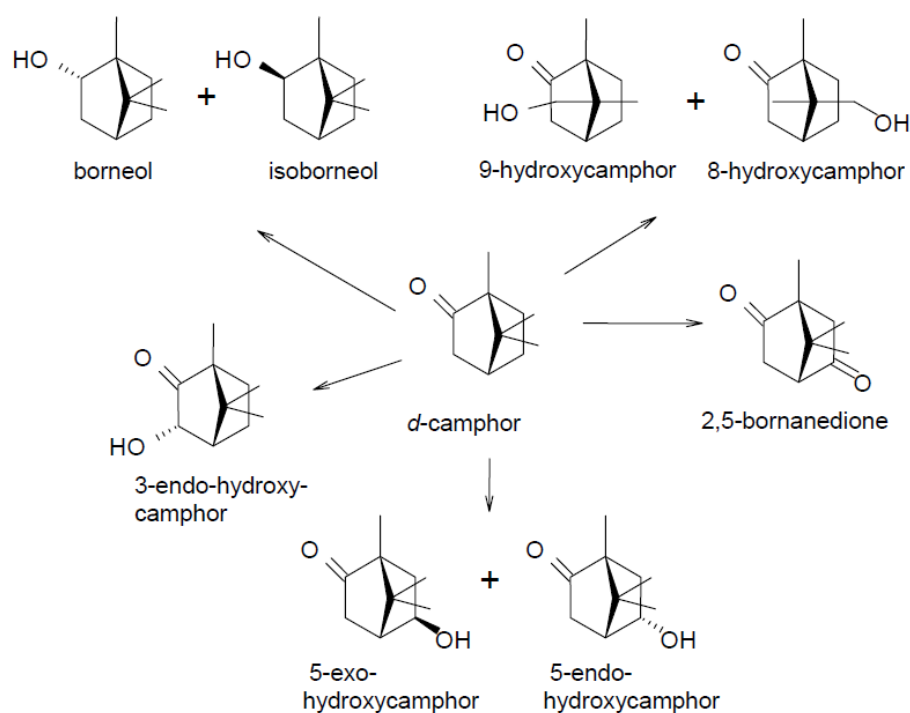
2.8 Metabolismus kofeinu a jeho toxicita

Do organismu je kofein velmi snadno absorbován po jakémkoliv druhu podání, ať inhalací, dermálně či perorálně. Denní terapeutická dávka kofeinu pro člověka je $1,43 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Po požití dosahuje jeho koncentrace maxima zhruba za 3 hodiny. Při dermálním podání je koncentrace kofeinu téměř nedetekovatelná (Zuccarini 2009).

Kofein je distribuován po celém těle. Z tohoto důvodu by jej neměly užívat těhotné a kojící ženy. Jeho vazba na plazmatické proteiny se odhaduje na 61 %. Biologický poločas při požití 200 mg samotného kofeinu byl určen na 167 minut, při požití s rozpouštědlem na 93 minut (Zuccarini 2009).

U zvířat podléhá jaternímu metabolismu, zejména procesu hydroxylace. Na reakcích se podílí zejména CYPy. V moči zvířat byly prokázány různé druhy hydroxylovaných forem kofeinu. Hydroxylované metabolity se do moče dostávají konjugované spolu s glukuronovou kyselinou (Zuccarini 2009).

U lidí se kafr hydroxyluje v pozicích 3, 5, 8 nebo 9 na hydroxyderiváty, které jsou hlavními metabolity identifikovanými v moči. 5-hydroxy-, 8-hydroxy- a 9-hydroxykafr byly dále oxidovány alkohol- a aldehyddehydrogenasou na odpovídající ketony a karboxylované kyseliny a poté konjugovány s kyselinou glukuronovou (Aquilar a kol. 2008, Santos a kol. 2015). Na metabolismu se podílejí CYPy, obzvláště CYP2A6. Enzym CYP2A6 hydroxyluje L-kafr na 5-exo-hydroxykafr. U jiných živočišných druhů (např. králíků a psů), kterým byl podán L-kafr a D-kafr, byly nalezeny metabolity 3-hydroxykafr, 5-exo-hydroxykafr, 5-endo-hydroxykafr a borneol, který vzniká redukcí kafru. Identifikované metabolity vytvořené z D-kafru jsou na Obrázek 9 (Aquilar a kol. 2008).



Obrázek 9 Metabolity D-kafru (Zdroj: Aquilar a kol. 2008)

Použití kafru je mezi lidmi všeobecně známo, je obsažen v řadě bylinných produktů. Nicméně je mezi lidmi malé povědomí o tom, že by kafr mohl způsobit případnou intoxikaci. Největší hrozba intoxikace je u dětí a kojenců. Historicky se většinou jednalo o náhodné užití, ale také byly zaznamenány případy intoxikace kojenců, jež se intoxikovaly aplikací do nosu. V letech 1990–2003 bylo zaznamenáno až 100 000 případů otrav výrobky obsahujícími kafr (Zuccarini 2009). Příznaky intoxikace kafrem zahrnují centrální nervovou stimulaci, orální a žaludeční podráždění, nevolnost, zvracení, halucinace, delirium, svalovou vzrušivost, třes, křeče a retenci moči. Lokálně může způsobit podráždění kůže, očí a sliznic dýchacích cest (Aquilar a kol. 2008).

Letální dávka kafru u dospělých se pohybuje od 50-500 mg/kg. Smrt je obvykle způsobena respiračním selháním nebo stavem *status epilepticus*. U dospělých je toxická dávka 2 g, 4 g jsou potenciálně smrtelné. Smrtící perorální dávka se u dětí odhaduje na 0,5–1 g, u kojenců 70 mg/kg. Přesný mechanismus toxických účinků kafru zůstává stále neznámý (Santos a kol. 2015).

Před použitím produktu s kafrem je třeba mít na paměti, že ne pro každého je vhodný. Pokud je člověk predisponován ke křečím, není jeho užití vhodné. Také není doporučen pro těhotné, jelikož prostupuje placentou a mohl by ohrozit plod (Zuccarini 2009). Plod postrádá enzymy, které kafr hydroxylují a konjugují, což může vést ke spontánnímu potratu. Z tohoto důvodu jej ženy dříve zneužívaly jako abortivum. Teratogenita na zvířecích modelech prokázána nebyla (Santos a kol. 2015).

Otravy kafrem byly také způsobeny nesprávným použitím. Proto je klíčové kafrové přípravky podávat v souladu se správným dávkováním, způsobem užití a anamnézou. Pak je jeho podání bezpečné (Zuccarini 2009).

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit účinek dvou isomerů kofeinu na proteinovou a mRNA expresi hlavních biotransformačních enzymů v lidských jaterních řezech. Pro dosažení cíle této diplomové práce bylo třeba:

- Připravit ultratenké jaterní řezy z tkání pacientů a inkubovat je s (-)-kofeinem a (+)-kofeinem
- Stanovit proteinovou expresi CYP3A4, CYP2C, AKR1C3 a GSTA pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy za denaturujících podmínek s následným western blotem
- Stanovit expresi mRNA AKR1C, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4, NQO1, SULT1A1, UGT1A6, GSTA1 a GSTP1 pomocí kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase v kombinaci s reverzní transkripcí

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Vzorky lidské jaterní tkáně pocházely z Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové a byly získány od pacientů, kterým byla v rámci léčby nádorového onemocnění odstraněna část jater. Etická komise Fakultní nemocnice Hradec Králové schválila odběr tkáně k experimentálním účelům (povolení č. 201703 S14P). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s tímto odběrem. Dostupné informace jsou uvedeny v Tabulka 2.

Tabulka 2 Informace o pacientech

| Pacient | Pohlaví | Věk (roky) | Diagnóza | Komorbidity | Medikace | Chemoterapie |
|---------|---------|------------|-------------------------------------|--|---|---------------------------------------|
| 46 | ♂ | 53 | metastáze CRC | hypertenze | indapamid, perindopril | FUFA, pak FOLFIRI + panitumumab |
| 48 | ♀ | 72 | metastáze endokrinního tumoru | DM2, hypertenze | metformin, glimepirid, ramipril | Ø |
| 49 | ♂ | 72 | ChCC | hypertenze, polyneuropatie po chemoterapii | furosemid, amlodipin, metoprolol, perindopril, pregabalin | FOLFOX + bevacizumab |

CRC, kolorektální karcinom, ChCC, cholangiocelulární karcinom, DM2, diabetes mellitus 2. typu

4.2 Chemikálie

(-)-kafr

EXTRASYNTHESE

(+)-kafr

EXTRASYNTHESE

(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES)

CARL ROTH

Akrylamid/bis-akrylamid 40% (AA+bis AA)

SERVA

| | |
|---|---------------------|
| BCA Protein Assay kit | THERMO SCIENTIFIC |
| Bromfenolová modř | SIGMA-ALDRICH |
| Diethylpyrokarbonát (DEPC) | BIOGEN |
| Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄) | PENTA |
| Dihydrogenuhličitan sodný | PENTA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | SIGMA-ALDRICH |
| Dithiotreitol (DTT) | SIGMA-ALDRICH |
| DNAsa a DNAsa buffer | NEW ENGLAND BIOLABS |
| Dodecylsíran sodný (SDS) | SIGMA-ALDRICH |
| ECL Prime Western Blotting detection reagent | GE HEALTHCARE |
| Ethanol absolutní | PENTA |
| Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) | SIGMA-ALDRICH |
| Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová kyselina (EGTA) | SIGMA-ALDRICH |
| Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | SIGMA-ALDRICH |
| Fluorid sodný (NaF) | SIGMA-ALDRICH |
| Gentamycin | SIGMA-ALDRICH |
| Glukosa | SIGMA-ALDRICH |
| Glycerol | DR. KULICH PHARMA |
| Glycin | SIGMA-ALDRICH |
| Hovězí sérový albumin (BSA) | SIGMA-ALDRICH |
| Hovězí protilátka proti kozímu IgG konjugovaná s HRP | SANTA CRUZ BIOTECH. |
| Hovězí protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s HRP | SANTA CRUZ BIOTECH. |
| Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO ₃) | PENTA |
| Hydroxid sodný (NaOH) | PENTA |

| | |
|--|---------------------|
| Chlorid draselný (KCl) | PENTA |
| Chlorid sodný (NaCl) | PENTA |
| Chlorid vápenatý (CaCl ₂) | PENTA |
| Chloroform | PENTA |
| Chlorovodíková kyselina 36% (HCl) | PENTA |
| Inhibitory proteas | SIGMA-ALDRICH |
| Isobutanol | SIGMA-ALDRICH |
| Kozí protilátka proti AKR1C3 | ABCAM |
| Králičí protilátka proti CYP3A4 | ABCAM |
| Králičí protilátka proti CYP2C | ABCAM |
| Králičí protilátka proti GSTA | ABCAM |
| Králičí protilátka proti kalnexinu | ABCAM |
| Lihomethanol | PENTA |
| Methanol | PENTA |
| Molekulový standard Precision Plus Protein™ All Blue | BIO-RAD |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | SIGMA-ALDRICH |
| Náhodné hexamery – N6 | GENERI BIOTECH |
| Persíran amonný (APS) | SIGMA-ALDRICH |
| Pyrofosfát sodný | SIGMA-ALDRICH |
| Reakční pufr pro RT | NEW ENGLAND BIOLABS |
| Reverzní transkriptáza (RT) –ProtoScript II | NEW ENGLAND BIOLABS |
| Síran hořečnatý (MgSO ₄ · 7 H ₂ O) | SIGMA-ALDRICH |
| Směs deoxynukleotidů (dNTPs) | GENERI BIOTECH |
| Směs inhibitorů proteas | SIGMA-ALDRICH |

| | |
|---|---------------|
| β-glycerolfosfát | SIGMA-ALDRICH |
| Sušené odtučněné mléko | SIGMA-ALDRICH |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | SIGMA-ALDRICH |
| Triton X-100 | SIGMA-ALDRICH |
| TRizol | MRC |
| Tween 20 | SIGMA-ALDRICH |
| Vanadičnan sodný (Na ₃ VO ₄) | CARL ROTH |
| xCEED SG qPCR mix | BIOTECH |

4.3 Přístroje

| | |
|---|---------------------|
| Analytické váhy | SARTORIUS |
| Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos | THERMO SCIENTIFIC |
| Centrifuga na destičky | HERMLE |
| CO ₂ inkubátor s regulací kyslíku CB-170-O | BINDER |
| DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR | BIOSAN |
| Chemiluminiscenční detektor Alliance Q9 Advanced | UVITEC |
| Krumdieck Tissue Slicer MD4000 | TSE SYSTEMS |
| Laboratorní kývačka | HEIDOLPH |
| Laboratorní váhy | SARTORIUS |
| Laminární box bioair AURA 2000 M.A.C. | BIOAIR |
| Magnetická míchačka | IKA |
| Mini centrifuga Sprout | HEATHROW SCIENTIFIC |
| Mini-PROTEAN tetra | BIO-RAD |
| Mixer Vortex Shaker Model MS 2 | IKA |

| | |
|--|--------------------|
| Nanodrop 2000 | THERMO SCIENTIFIC |
| Napájecí zdroj pro elektroforézu | BIO-RAD |
| PCR cyklér MJ mini | BIO-RAD |
| pH metr Inolab | WTW |
| Real-time PCR systém Quant Studio 6 | APPLIED BIOSYSTEMS |
| Spektrofotometr Infinite M200 | TECAN |
| Termoblok Thermomixer Comfort | EPPENDORF |
| Trans-Blot Turbo Transfer System | BIO-RAD |
| Vodní lázeň | THERMO HAAKE |
| Zařízení na úpravu vody Milli-Q RG MILLIPORE | MILLIPORE |

4.4 Metodika

4.4.1 Příprava ultratenkých lidských jaterních řezů

Pro studie metabolismu a toxicity xenobiotik je k dispozici široká škála jaterních *in vitro* modelů. Běžně používané *in vitro* modely představují perfundovaná játra, hepatocyty, subcelulární frakce, rekonstituované purifikované enzymové frakce nebo jaterní řezy, které stabilně exprimují vybrané jaterní enzymy. Výhodou hepatocytů a jaterních řezů je obsah celé řady enzymů I. a II. fáze biotransformace (Price a kol. 1998). Řezy z jaterní tkáně obsahují všechny typy buněk včetně mezibuněčné hmoty. Všechny interakce mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou mají zachovalé. Jaterní řezy se ukázaly jako velmi užitečný model pro studium biochemických funkcí, jimiž jsou například endogenní metabolismus, biotransformace a její indukce či transport léčiv a jiných xenobiotik využívaných pro toxikologické studie nebo pro hodnocení účinnosti léků (Graaf a kol. 2010). Proto jsem ve své diplomové práci použila jako modelový systém právě ultratenké lidské jaterní řezy.

Vzorky lidských jater jsem až do samotné přípravy jaterních řezů uchovávala s chladným roztokem Euro-Collins v nádobě s ledem. Roztok Euro-Collins je hyperosmolární roztok, který se používá zejména pro konzervování tkáně. Roztok snižuje buněčný

metabolismus včetně požadavků na kyslík, a tím chrání tkáň před ischemickým poškozením (Taylor a kol. 2001). Nezbytnou součástí celého procesu bylo játra udržovat neustále na ledu. Před samotným procesem krájení jsem játra opláchla Krebs-Henseleitovým pufrem, aby se z jater vyplavila přebytečná krev.

Pro krájení ultratenkých jaterních řezů jsem použila Krumdieckův kráječ. Všechny části kráječe jsem si den předem vydezinfikovala 70% lihem. Zároveň jsem si přichystala zásobní roztok Krebs-Henseleitova pufru i kultivační médium.

Zásobní roztoky:

Zásobní roztok Krebs-Henseleitova pufru a Williamsovo medium E suplementované glutaMAXem jsem připravovala podle Tabulka 3 a Tabulka 5.

Dle Tabulka 3 jsem si jednotlivé složky navážila a rozpustila v redestilované vodě. Chlorid vápenatý jsem přidávala až jako poslední složku, jelikož hrozilo vykrytalizování uhličitanů z roztoku. V den použití jsem 10x koncentrovaný Krebs-Henseleitův pufr finálně naředila (Tabulka 4) a nechala hodinu probublávat pneumoxidem (95 % O₂/5 % CO₂). Následně jsem upravila pH na 7,4 pomocí pH-metru a 4 M HCl. Na jedna játra jsem potřebovala přibližně 1 litr Krebsova-Henseleitova pufru.

Tabulka 3 Složení 10x koncentrovaného Krebs-Henseleitova pufru

| Zásobní roztok Krebs-Henseleitova pufru | | |
|--|--------------------|-------------------|
| | Navážka (g) | Objem (ml) |
| Chlorid draselný (KCl) | 1,87 | |
| Chlorid sodný (NaCl) | 34,5 | |
| Síran hořečnatý (MgSO₄.7H₂O) | 1,36 | |
| Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) | 0,82 | |
| Chlorid vápenatý (CaCl₂) | 1,39 | |
| Redestilovaná H₂O | | 500 ml |

Tabulka 4 Finální roztok Krebs-Henseleitova pufru

| Finální roztok Krebs-Henseleitova pufru | | |
|---|-------------------------|--------------------|
| | Navážka (g) | Objem (ml) |
| Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO ₃) | 2,1 | |
| Glukóza monohydrát/anhydrid | 4,95g/(4,5 g anhydridu) | |
| HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) | 2,38 g | |
| Zásobní roztok (10x koncentrát) | | 100 ml |
| Redestilovaná H ₂ O | | doplnit do 1000 ml |

Williamsovo médium E suplementované glutaMAXem (WME) je komerčně dostupné médium obohacené o glutaMax, což je stabilní forma glutaminu – L-alanyl-L-glutamin. Před použitím jsem k WME přidala glukózu a gentamycin (Tabulka 5). Finální koncentrace glukózy byla 36 mM. Následně jsem roztok sterilně přefiltrovala přes filtr s póry velkými 0,22 µm.

Tabulka 5 Kultivační Williamsovo médium E suplementované glutaMaxem

| Williamsovo E médium | |
|----------------------|--|
| | Objem Williamsova E media s glutaMAXem |
| | 500 ml |
| 50 µg/ml gentamycin | 500 µl |
| Glukosa (anhydrid) | 2,24 g |

Skladování zásobních roztoků i připraveného kráječe:

Vyčištěný a do alobalu zabalený Krumdieckův kráječ včetně připravených zásobních roztoků jsem uchovávala při teplotě 4°C do dalšího dne.

4.4.1.1 Vlastní krájení řezů

Pro přípravu lidských ultratenkých jaterních řezů jsem dále potřebovala: Petriho misky, táč, filtrační papír, líh, chlazený termostát, laminární box, pinzetu, 12-jamkové destičky a led.

Všechny části Krumdieckova kráječe jsem sestavila a napojila k lázni s termostatem. Teplotu v termostatu jsem nastavila na 4°C. Do kráječe jsem opatrně nalila okysličený Krebs-Henseleitův pufr. Ujistila jsem se, že pufr neprotéká, a pak jsem kráječ nechala 20 minut chladit.

Játra jsem nakrájela horizontálně na zhruba 1 cm tlusté plátky. Z plátků jsem krouživým pohybem kolmo vůči ploše řezu vykrajovala souměrné a nedeformované válečky o průměru 8 mm. Při tvorbě válečků jsem se snažila vyhnout vazivu a cévám. Z vykrojených válečků jsem dále pomocí kráječe získala řezy o tloušťce 150-180 μm . Plátky jater, válečky i výsledné řezy jsem měla neustále v okysličeném Krebs-Henseleitově pufru uložené na ledu. S játry jsem manipulovala velmi opatrně a pouze pinzetou.

Známkou kvalitního řezu byl okrouhlý tvar, hladké okraje a správné tloušťka. Na kvalitu řezu jsou obecně kladeny vyšší nároky zejména při stanovování toxicity a genové exprese.

4.4.1.2 Preinkubace a inkubace řezů

V laminárním boxu jsem připravené řezy entomologickou pinzetou přendala do 12-jamkové destičky naplněné WME puftrem. Každá jamka obsahovala 1 ml roztoku WME bez testované látky a jeden řez. Preinkubaci i inkubaci jaterních řezů jsem prováděla v inkubátoru předehřátém na 37°C. Během vkládání destiček jsem hladinu plynů měla nastavenou na 70 % O_2 /5 % CO_2 a po naplnění byla zvednuta na 85 % O_2 /5 % CO_2 . V inkubátoru jsem destičky během inkubací nechala třepat při 90 rpm. Destičku jsem nechala preinkubovat 1 hodinu. Během této fáze docházelo k odstranění poškozených a nekrotických buněk.

Po proběhlé preinkubaci jsem řezy přendala do nové 12-jamkové destičky, která tentokrát obsahovala 1,3 ml WME a testovanou látku. Kontrolní řezy jsem inkubovala pouze s 0,1% dimethylsulfoxidem (DMSO). Výsledná koncentrace (-)-kafru a (+)-kafru rozpuštěného v DMSO u jaterních řezů byla 10 μM a 50 μM . Inkubace probíhala 24 hodin a každý vzorek včetně kontrol byl připraven v triplikátu. Kultivace řezů by neměla přesáhnout 24 hodin, jelikož může dojít k poklesu exprese enzymů, aktivity CYPů nebo fibróze tkáně.

Po proběhlé inkubaci jsem jaterní řezy na stanovení genové exprese vložila po jednom do 2 ml mikrokumavky, přidala 500 μl TRIzolu a dala na led. Vzorky jaterních řezů pro western blotting jsem vložila po jednom do 1,5 ml mikrokumavky, přidala 250 μl lyzačního pufru (příprava lyzačního pufru v kapitole Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blot), a také uložila na led. Následně jsem vzorky zamrazila při teplotě -80°C.

4.4.2 Stanovení proteinové exprese

Pro stanovení proteinové exprese sledovaných enzymů AKR1C3, CYP3A4, CYP2C a GSTA jsem provedla několik na sebe navazujících procesů. Jednalo se o homogenizaci vzorků, stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích, poté jejich ředění. Také jsem provedla separaci proteinů pomocí SDS-PAGE a jejich blotting s následnou chemiluminiscenční detekcí.

Přenos bílkovin s imunodetekcí našel ve vědě široké uplatnění. Metodou lze detekovat a charakterizovat velké množství proteinů včetně proteinů exprimovaných v organismu v malém množství (Kurien a kol. 2015).

4.4.2.1 Příprava vzorků pro elektroforézu a Western blot

Před analýzou proteinové exprese jsem si musela vzorky správně naředit. Z hlediska výsledků byla příprava vzorků velmi důležitou částí práce, která by v případě chybného ředění či výpočtu vedla k významnému ovlivnění výsledku.

Zásobní roztoky:

Složení zásobních roztoků vzorkového a lyzačního pufru pro přípravu vzorků na analýzu proteinové exprese máme uvedené v Tabulka 6 a Tabulka 7.

Tabulka 6 Složení 4x SDS vzorkového pufru

| 4x SDS vzorkový pufr | | | |
|----------------------|-------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Složka | Koncentrace zásobního roztoku | Konečná koncentrace | Pipetované/navážené množství |
| Tris/HCl pH 6,8 | 1 M | 200 mM | 4 ml |
| glycerol | 85% | 40% | 9,41 ml |
| SDS | | 6 % | 1,2 g |
| DTT | | 0,2 M | 0,617 g |
| Bromfenolová modř | | 0,3% | 0,1 g |
| Redestilovaná voda | | | 20 ml |

Tabulka 7 Složení lyzačního pufru

| Lyzační pufr | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Složka | Koncentrace zásobního roztoku | Konečná koncentrace | Pipetované/navážené množství |
| Tris/HCl pH 7,4 | 1 M | 50 mM | 50 ml |
| NaCl | | 150 mM | 8,766 g |
| glycerol | 85% | 10% | 117,65 ml |
| Triton X-100 | 100% | 1% | 10 ml |
| EDTA | | 2 mM | 0,58 g |
| EGTA | | 2 mM | 0,76 g |
| β-glycerolfosfát | | 40 mM | 8,52 g |
| NaF | | 50 mM | 2,09 g |
| pyrofosfát sodný | | 10 mM | 4,46 g |
| DTT | | 2 mM | 0,3085 g |
| Na ₃ VO ₄ | | 200 μM | 0,03678 g |
| Redestilovaná voda | | | doplnit do 1 l |

Skladování zásobních roztoků:

Připravený zásobní vzorkový i lyzační pufr jsem skladovala v mrazáku při -20°C. Lyzační pufr jsem rozpipetovala po 13 ml a zamrazila. Před použitím jsem ho doplnila o směs inhibitorů proteas a PMSF (inhibitor serinových proteas) tak, že jsem ke 13 ml zásobního lyzačního pufru přidávala 130 μl směsi inhibitorů proteas a 130 μl 100 mM PMSF. PMSF 100 mM jsem připravila rozpouštěním navážky 17,42 mg v 1 ml ethanolu. Upravený lyzační pufr s inhibitory, PMSF a 100 mM roztok PMSF jsem skladovala v lednici.

Na přípravu vzorků jsme dále potřebovali: Homogenizační tyčinky, mikrozkuřavky 1,5 ml a 0,5 ml, led.

Vzorky jsem měla nachystané v 1,5 ml mikrozkuřavkách s lyzačním puffrem a zamražené při -80 °C. Nejprve jsem je nechala na ledu rozmraznout. Pomocí tyčinkového homogenizátoru jsem provedla homogenizaci tkáně. Na jaterní řezy jsem několikrát tyčinkou krouživými pohyby zatlačila, abych zajistila rozpad buněk, a tím došlo k uvolnění buněčného obsahu. Homogenizované vzorky jsem nechala 20 minut odpočívat na ledu.

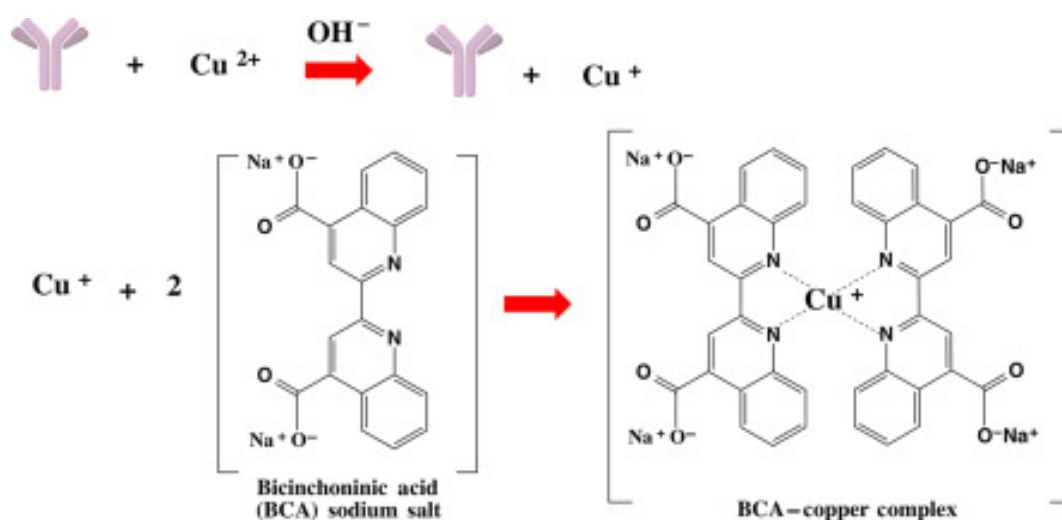
Následně jsem je centrifugovala 10 minut, při 13 000 rpm a 4°C. Po proběhlé centrifugaci jsem odsála všechnu supernatant a napipetovala do 1,5 ml mikrozkuřavek.

Z takto zhomogenizovaných řezů jsem připravila směsný vzorek smícháním stejného objemu ze všech tří řezů, které byly pro jednotlivé vzorky připraveny. Z každého řezu jsem do

0,5 ml mikrozkušavky pipetovala 100 μ l. Pro jakoukoliv manipulaci se vzorky jsem je měla vždy na ledu. Směsné vzorky i supernatanty jsem uchovávala při -80°C . Ve směsných vzorcích jsem stanovila koncentraci bílkoviny pomocí metody s bicinchoninovou kyselinou.

4.4.2.1.1 BCA stanovení bílkoviny

V alkalickém prostředí proteiny reagují s Cu^{2+} , čímž se měďnaté ionty redukuje na Cu^{1+} . V prostředí kolem pH 10 Cu^{1+} vytvářejí modrofialový stabilní komplex s BCA a intenzita jeho zabarvení je přímo úměrná množství bílkoviny ve vzorku (Otieno a kol 2016, Smith a kol. 1985). Zjednodušený postup můžeme vidět na Obrázek 10.



Obrázek 10 Princip stanovení bílkoviny metodou s BCA (Otieno a kol. 2016)

Zásobní roztoky:

- **Roztok A** – Byl čirý roztok připravený od výrobce. Obsahoval NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH.
- **Roztok B** – Byl modrý roztok připravený od výrobce. Obsahoval 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.
- **Pracovní roztok C** – Poměrem 50:1 jsem smíchala roztok A spolu s roztokem B. Tím vznikl roztok C, který měl zelenou barvu. Na moje vzorky stačilo přichystat celkem 16 ml, přičemž jsem smíchala 15,7 ml roztoku A a 300 μ l roztoku B.
- **hovězí sérový albumin 0,1% (BSA)** – Pipetovala jsem 5 μ l výchozího roztoku 20% BSA do 1 ml redistilované vody, tím vznikl 0,1% roztok BSA.

Pro BCA stanovení bílkoviny jsem dále potřebovala: mikrozkuřavky, 96-jamkovou destičku GAMA a termoblok.

Nejprve jsem si připravila jednotlivé koncentrace BSA pro vytvoření kalibrační křivky. Postupovala jsem podle Tabulka 8.

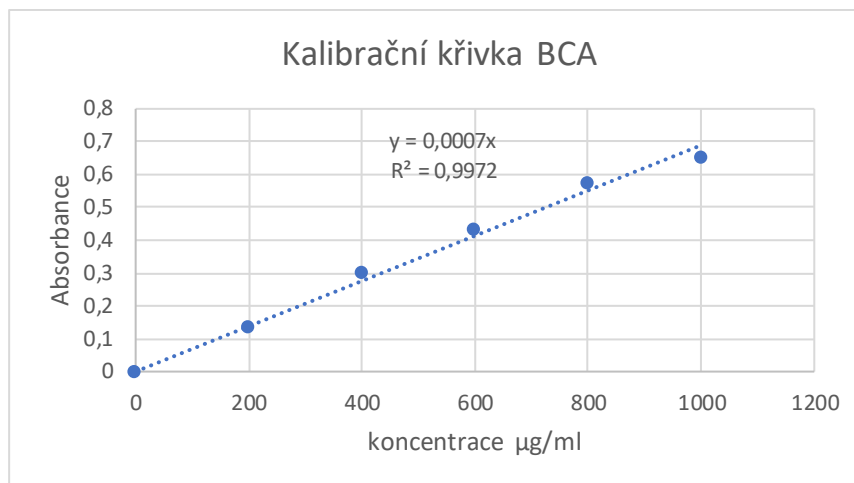
Tabulka 8 Příprava roztoků pro sestavení kalibrační přímky

| Příprava kalibrátorů | | | |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Kalibrátor | Koncentrace (μg/ml) | 0,1% roztok BSA (μl) | Redestilovaná voda (μl) |
| 1 | 0 | 0 | 50 |
| 2 | 200 | 10 | 40 |
| 3 | 400 | 20 | 30 |
| 4 | 600 | 30 | 20 |
| 5 | 800 | 40 | 10 |
| 6 | 1000 | 50 | 0 |

Vzorky jsem ředila 5x (1:4). Každého vzorku jsem měla 50 μl, 40 μl jsem pipetovala redestilované vody a koncentrovaného vzorku 10 μl.

Do destičky jsem pipetovala 10 μl vzorků i kalibrátorů. Do každé jamky jsem přidala 200 μl pracovního roztoku C. Každý kalibrátor měl 4 paralelní měření. Vzorky jsem stanovovala v triplicátu. Napipetovanou destičku jsem protřepala a nechala inkubovat při 37°C po dobu 30 minut.

Po inkubaci jsem změřila absorbanci na spektrofotometru TECAN. Naměřené absorbance kalibračních bodů (Obrázek 11) i vzorků jsem zprůměrovala, a poté spočítala koncentraci. Její hodnotu jsem dále použila ve výpočtu pro naředění vzorků na elektroforézu. Vzorky jsem ředila pomocí pufru, který jsem připravila smícháním 500 μl 4xSDS a 1500 μl lyzačního pufru obsahujícího inhibitory proteas, tak, aby cílová koncentrace proteinů ve vzorcích byla 1 μg/μl a SDS tvořilo ve vzorku ¼ celkového objemu.



Obrázek 11 Kalibrační křivka stanovení BCA

4.4.2.2 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Pro analýzu proteinů je gelová elektroforéza velmi důležitou a hojně využívanou metodikou, konkrétně i v mé diplomové práci použitá elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) (Kurien a kol. 2012). SDS-PAGE je velmi užitečným nástrojem k rozdělení proteinových molekul podle velikosti. Přítomný SDS denaturuje sekundární i terciární struktury proteinů. SDS pokrývá molekuly konstantním negativním nábojem, který koreluje s jejich délkou, a tím umožňuje jejich separaci dle jejich molekulární hmotnosti (Brunelle a kol. 2014). Při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu proteiny migrují v elektrickém poli póry v gelové matici. Velikost pórů klesá se zvyšující se koncentrací akrylamidu. Kombinace velikosti pórů, proteinového náboje, velikosti a tvaru proteinu určuje rychlost migrace molekul. Pomocí elektrického pole proteiny potažené SDS v gelu putují směrem od negativně nabitě elektrody (katody) ke kladně nabitě anodě (Galler 2007).

4.4.2.2.1 Příprava polyakrylamidového gelu

Zásobní roztoky:

- **4 M HCl** – Do 150 ml redestilované vody jsem přidala 88 ml koncentrované HCl. Roztok jsem doplnila redestilovanou vodou v odměrné baňce do 250 ml.

- **1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8** – Navážila jsem 18,5 g Trisu, přidala jsem 75 ml redestilované vody a vše jsem nechala mícháním rozpustit. Následně jsem upravila pH na 8,8 pomocí pH-metru a 4 M HCl. Roztok jsem doplnila redestilovanou vodou v odměrné baňce do 100 ml.

- **0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8** – Navážila jsem 6 g Trisu, přidala jsem 75 ml redestilované vody a vše jsem nechala mícháním rozpustit. Následně jsem upravila pH na 6,8 pomocí pH-metru a 4 M HCl. Roztok jsem doplnila redestilovanou vodou v odměrné baňce do 100 ml.

- **zásobní roztok AA+bis AA** – Připraven k použití jako 40% roztok.

- **isobutanol nasycený vodou** – Čistý isobutanol jsem smíchala s redestilovanou vodou v poměru 1:1. Tím jsem získala v horní vrstvě isobutanol nasycený vodou.

- **10% SDS** – Navážila jsem 10 g SDS, přidala jsem 80 ml redestilované vody a vše jsem nechala mícháním rozpustit. Roztok jsem doplnila redestilovanou vodou v odměrné baňce do 100 ml.

- **koncentrovaný elektrodový pufr** – Navážila jsme 72 g glycinu, 15 g Trisu, 5 g SDS, přidala jsem 900 ml redestilované vody a vše jsem nechala mícháním rozpustit. Následně jsem upravila pH na 8,3 pomocí pH-metru a 4 M HCl. Roztok jsem doplnila v odměrné baňce do 1000 ml. Zásobní roztok koncentrovaného elektrodového pufru jsem rozlila po 200 ml do plastových nádobek. Pro použití jsem 200 ml zásobního elektrodového pufru ředila s 800 ml redestilované vody.

- **10% APS** – Navážila jsem 50 mg persíranu amonného a rozpustila ve 250 μ l redestilované vody. Roztok jsem připravovala vždy čerstvý.

Skladování zásobních roztoků:

Roztoky 4 M HCl, AA+bis AA, isobutanol nasycený vodou, roztoky pufrů 1,5 M Tris-HCl a 0,5 M Tris-HCl jsem uchovávala v lednici. Roztok 10% SDS jsem uchovávala při laboratorní teplotě. Nepoužitý koncentrovaný elektrodový pufr byl zamražen a naředěný elektrodový pufr jsem uchovávala při laboratorní teplotě. APS jsem rozpouštěla těsně před použitím.

Na výrobu 4 gelů jsem potřebovala: 4x sklo se spacerem 1,5 mm, 4x krátké sklo, 2x nalévací stojánek, 4x hřebínek 1,5 mm, parafilm, 4x gumové podložky a 4x spona, houbička, mycí prostředek, lihomethanol, papírové čtverečky a magnetickou míchačku.

Všechna skla a gumičky jsem pečlivě umyla houbičkou a mycím prostředkem na laboratorní nádobí a omyla redestilovanou vodou. Závěrečný oplach jsem provedla lihomethanolem a nechala oschnout. Po oschnutí pomůcek jsem skládala skla, vždy šlo k sobě jedno sklo se spacerem a jedno krátké. Zespodu a ze stran jsem skla utěsnila zabalením do parafilmu. Parafilmem jsem zajistila, že gel nevytekl, ale musel být pečlivě natažený a vytvářet rovný hladký povrch. Takto složená skla jsem vložila do spon, zacvakla a pevně připnula vrchním kolíkem do nalévacího stojánku a zespodu skla pevně přitiskla na gumovou podložku.

Nalévání gelů jsem prováděla v digestoři, zejména kvůli použití TEMEDu. První jsem nalévala separační (spodní) gel. Ředění separačního gelu jsem připravovala podle Tabulka 9. Nejprve jsem v kádince smíchala redestilovanou vodu, 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8 a roztok AA+bis AA a 10% SDS. Tyto reagenty jsem míchala na magnetické míchačce, v digestoři jsem přidala 200 μ l naředěného 10% APS a 16 μ l TEMEDu. Vše jsem krátce zamíchala a namíchaný roztok pipetovala mezi skla do výšky 4,5 cm od spodního okraje a opatrně jsem ho převrstvila cca 400 μ l isobutanolu nasyceného vodou. Isobutanol tvořící se gel zarovnáva, jeho množství jsem dávala takové, aby pokryl celý povrch (Obrázek 12). Gel jsem poté nechala 60 minut polymerovat.

Tabulka 9 Příprava separačního gelu

| Separační gel - 2 gely; 1,5 mm | | |
|------------------------------------|-------------|-------------|
| | 10% | 12,5% |
| Redestilovaná voda | 9,8 ml | 8,55 ml |
| Pufir 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 | 5 ml | 5 ml |
| 40% roztok AA+bis AA | 5 | 6,25 ml |
| 10% SDS | 0,2 ml | 0,2 ml |
| iniciace polymerace | | |
| Roztok APS | 200 μ l | 200 μ l |
| TEMED | 16 μ l | 16 μ l |



Obrázek 12 Polymerace separačního gelu převrstveného isobutanolem (Autor)

Po polymeraci gelu jsem isobutanol slila a opatrně osušila papírovými čtverečky, aniž bych se dotkla gelu. Následně jsem si naředila reagentie na zaostřovací gel dle Tabulka 10. Nejprve jsem opět v kádince smíchala redestilovanou vodu, 0,5 M Tris-HCl pufir pH 6,8 a roztok AA+bis AA a 10% SDS. Tyto reagentie jsem míchala na magnetické míchačce, v digestoři jsem přidávala 200 μ l naředěného 10% APS a 16 μ l TEMEDu. Vše jsem krátce zamíchala a pipetovala mezi skla až po horní okraj kratšího skla. Hned po nalití gelu jsem opatrně zasunula hřebínky. Zaostřovací gel jsem nechala polymerovat 30 minut.

Tabulka 10 Příprava zaostřovacího gelu

| Zaostřovací gel - 2 gely; 1,5 mm | |
|---|-------------|
| Redestilovaná voda | 6,42 ml |
| Pufir 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 | 2,5 ml |
| 40% roztok AA+bis AA | 1,3 ml |
| 10% SDS | 0,1 ml |
| iniciace polymerace | |
| Roztok APS | 200 μ l |
| TEMED | 16 μ l |

Takto byly gely připraveny k použití. Dalo se s nimi pracovat i druhý den, jen jsem je zabalila do folie a uložila do lednice.

4.4.2.2 Postup elektroforézy

Na zhotovení elektroforézy jsem potřebovala: termoblok, stojánek na elektroforézu, skla s gely, vazelínu, vaničku na elektroforézu, víko s elektrodami, napájecí zdroj, vortex, nanášecí blok, klínek, led a 1x ředěný SDS.

Dala jsem si předehřát termoblok na 95°C. Vzorky jsem si vyndala z mrazáku a nechala je na ledu rozmraznout. Před každou separací jsem vzorky denaturovala 5 minut při 95°C. Vzorky jsem před pipetováním do gelu ještě promíchala na vortexu.

Gely jsem umyla pod tekoucí vodou a opatrně z nich vyndala hřeben tak, abych si nepoškodila vytvořené jamky. Jamky jsem propláchla redestilovanou vodou a nechala vodu z jamek volně vytéct.

Gumové části stojánku na elektroforézu jsem namazala vazelínou. Skla s gely jsem do stojánku pevně vložila kratšími skly dovnitř a přitáhla sponami. Takto složený stojánek jsem vložila do vaničky a naplnila čerstvým elektrodovým pufrem tak, aby gel byl zcela ponořený. Chvilku jsem stojánek pozorovala, zda je dobře složen a pufir neprotéká. Po úspěšném sestavení gelů do stojánků jsem nalila elektrodový pufir i do vnější části vaničky. Dle počtu gelů k separaci jsem ryskou na vaničce měla označené kam až hladina vnějšího pufiru má dosahovat.

Záleželo, zda jsem měla 2 nebo 4 gely. Také jsem se ujistila, že hladina pufru vždy byla nad drátkem. Vnější elektrodový pufr jsem používala opakovaně.

Pomocí nanášecího bloku jsem do gelů pipetovala 20 μ l vzorku a 1,5 μ l molekulového standardu. Pokud jsem měla v gelu volné pozice, pipetovala jsme do nich 20 μ l 1x ředěného SDS.

Po napipetování všech vzorků, standardu i 1x ředěného SDS jsem vaničku přiklopila víčkem a připojila ke zdroji. Na zdroji jsem nastavila konstantní napětí 90 V. Vaničku jsem zasypala ledem a nechala separaci probíhat (Obrázek 13).

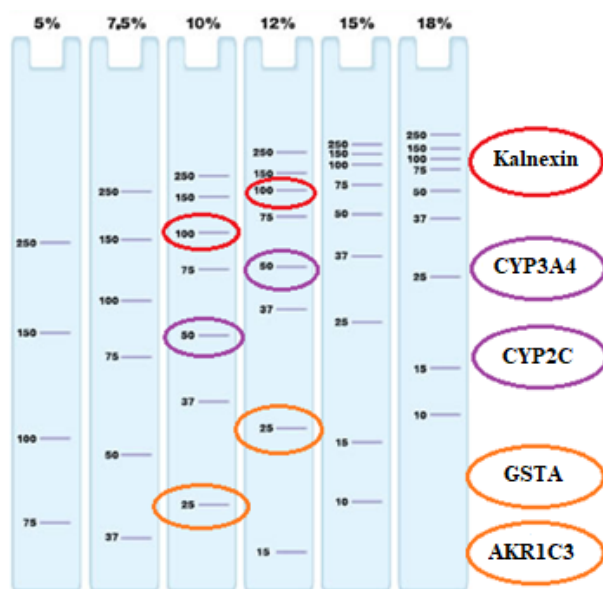


Obrázek 13 Probíhající elektroforéza zasypaná ledem (Autor)

Poté co separace překonala hranici zaostřovacího gelu, jsem napětí zvýšila až na 150 V. Elektroforézu jsem zastavila, když čelo dosahovalo zeleného okraje ve spodní části stojánku. Elektrodový pufr jsem z vnější části vaničky uschovala, z vnitřní části jsem ho vylila. Všechny pomůcky jsem řádně umyla a opláchla redestilovanou vodou a nechala volně uschnout.

Pro stanovení CYP3A4, CYP2C a AKR1C3 jsem použila 10% separační gel. Pro snadnější detekci GSTA jsem použila 12,5% gel, jelikož na 10% gelu se mi jí nepodařilo zachytit. Dle Obrázek 14 je patrné, že separace GSTA na 10% gelu probíhá ve spodní části gelu, téměř na jeho konci, a proto se mi pro její stanovení osvědčila separace na 12,5%, ve kterém její separace probíhala ve vyšší poloze. Tím se podařilo GSTA dobře rozdělit a následně detekovat. Na Obrázek 14 jsem barevně zvýraznila v 10% a 12% gelech oblasti, ve kterých jsem detekovala kalnexin (červený), CYP2C a CYP3A4 (fialový) a GSTA a AKR1C3 (oranžový).

Důležité bylo si také uvědomit, jaké máme pořadí vzorků v gelu. Pomocí nanášecího bloku jsem pipetovala vzorky vždy zleva doprava. Kratší sklo bylo během pipetování a celé elektroforetické separace uvnitř stojánku, spacer zvenku. Takže poté, co jsem skla vyndala a sejmula kratší sklo, tak mi v dlani zůstal spacer s gelem, na kterém bylo pořadí vzorků obráceně, tedy zprava doleva. Proto jsem si označovala stranu pipetování prvního vzorku tím, že jsem si ořízla roh gelu. V tomto případě to byl pravý horní roh. Pro další manipulaci a uchování pořadí vzorků bylo klíčové gel zrcadlově otočit, aby oříznutý roh byl na levé straně nahoře. Tím jsem docílila pořadí jako při nanášení vzorků pomocí bloku.



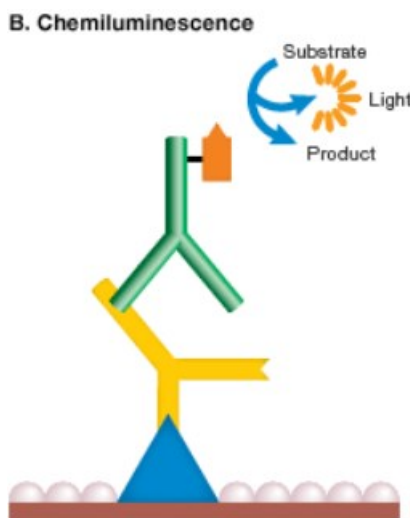
Obrázek 14 Účinnost separace v gelech o různé porozitě
 (<<https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/imunochemie/imunochemie-izolace-a-purifikace-ig-ii.pdf>>)

4.4.2.3 Western blot

Western blot je metoda, která je využívána zejména pro imunodetekci proteinů. Přenos proteinů na mikroporézní membrány se označuje jako „blotting.“ Proteiny, které jsou separovány při SDS-PAGE, se obvykle přenášejí na membrány vlivem elektrického proudu v postupu známém jako western blot (WB) nebo blotování proteinů. Pokud bychom na membránu nanášeli proteiny bez předchozí separace elektroforézou, jednalo by se o metodu dot blot (Kurien a kol. 2015).

Obecný princip imunodetekce spočívá v reakci mezi antigenem a protilátkou. Na blotu máme antigen, na který se během první inkubace naváže primární protilátka, která je specifická

proti danému antigenu. Tím vznikne komplex antigen-protilátka. Přebytek nenavázaných složek odmyjeme a následně přidáme protilátku sekundární, která je konjugována s enzymem. Sekundární protilátka je téměř vždy zvířecí protilátka a je namířená proti primární protilátce, na kterou se váže. Přebytek sekundární protilátky opět po inkubaci odmyjeme. Posledním krokem je vizualizace vytvořeného komplexu přidáním substrátu. Substrát je štěpen enzymem navázaným na sekundární protilátce (Bartůňková a kol. 2011). Schéma imunodetekce můžeme vidět na Obrázek 16.



Obrázek 15 Schéma imunodetekce (<<https://blog.benchsci.com/western-blot-detection-methods>>)

4.4.2.3.1 Postup provedení Western blotu

Zásobní roztok:

- **blotovací pufr** – Navážila jsem 6,06 g Trisu, 28,8 g glycinu a rozpustila mícháním v cca 500 ml redestilované vody. Přidala jsem methanol a doplnila v odměrné baňce do 2000 ml.

Skladování zásobního roztoku:

Roztok byl uchováván v lednici.

Na blotování čtyř gelů jsem potřebovala: klínek, propisku, silný filtrační papír, nůžky, nitrocelulózovou membránu, váleček, vaničky a přístroj Trans Blot Turbo (Bio-Rad).

Pomocí klíčku jsem povolila kratší sklo, odřízla zaostřovací gel a spodní část gelu s barvivem. Tím jsem měla gel připravený na imunoblotting. Pro veškerou manipulaci s gely se mi osvědčilo si klínek namáčet v blotovacím roztoku, gely se mi lépe uvolňovaly ze spacerů,

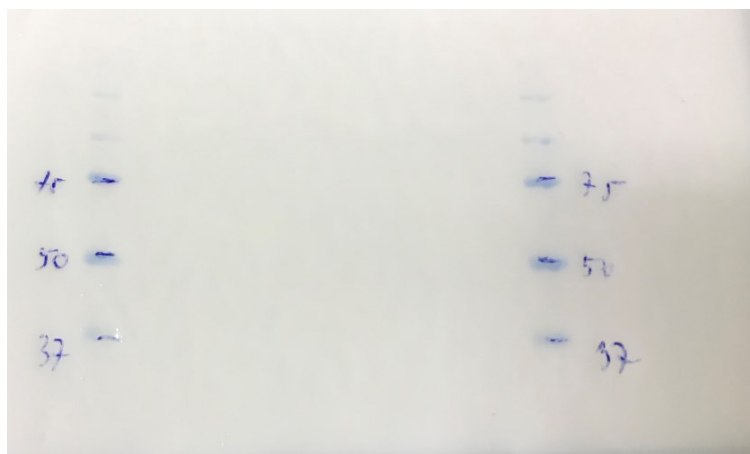
aniž by došlo k jejich poškození. Filtrační papíry a membrány jsem nastříhala dle velikosti gelů. Všechny nastříhané pomůcky, včetně gelů jsem nechala ve vaničkách 20 minut namáčet v blotovacím pufru.

Poté jsem mohla začít skládat blotovací sendvič. Skládala jsme ho rovnou v kazetě, ve které blotování probíhalo. Každá kazeta může blotovat naráz celkem dva minigely, kazety jsem měla dvě, takže jsem mohla udělat všechny čtyři gely najednou. Blotovací sendvič jsem začínala skládat odspodu, první jsem dala filtrační papír, membránu a na ní gel. Opět pro zachování pořadí vzorků zleva doprava jsem gel dala tak, aby oříznutý roh byl stále vlevo nahoře. Pro odstranění bublin mezi gelem a membránou jsem vzala váleček a bubliny jím opatrně vytlačila. Jako poslední vrstvu jsem položila další filtrační papír, válečkem uhladila a polila troškou blotovacího pufru. Toto jsme provedla u všech čtyř gelů. Kazety jsme pevně uzavřela, otočením zamkla a vložila do přístroje.

Pokračovala jsem ovládáním „přístroje Trans Blot Turbo:

Přístroj jsem zapnula a klikla na *Select protocol* → *List* → *Biorad defined* → pro dva gely v jedné kazetě jsem zvolila *2 MINI*. Momentálně stroj nabízel několik možností gelů, pro svoje gely jsem vybrala *1,5 mm gel – 10 min* a klikla na *Edit*, kde jsem si přenastavila čas blotování na 20 minut. Následně jsem zvolila *Run* a vybrala A: *Run* i B. *Run*, a tím zahájila blotování. Písmenko A zde značilo horní kazetu a B dolní kazetu.

Po skončení blotování jsem kazety opláchla destilovanou vodou a nechala uschnout. Z vytvořených sendvičů jsem opatrně sejmula vrchní filtrační papír, otočila blot a dle přeneseného molekulového standardu jsem se ujistila, že se přenos zdařil. Na membrány jsem si propisovací tužkou dle separace molekulového standardu popsala jednotlivé molekulové hmotnosti nejčastěji 75, 50 a 25 kDa. Při popisu jsem se vždy orientovala dle 75 kDa, od něho se odvíjel popis dalších hmotností. Na Obrázek 16 máme jeden blot na ukázkou popsany.



Obrázek 16 Vyroběný blot pro stanovení GSTA z 12,5% gelu (Autor)

4.4.2.3.2 Chemiluminiscenční detekce proteinů

Zásobní roztoky:

- **0,1 M Tris pufr, pH 8,0** - Navážila jsem 12,1 g Trisu, přidala jsem 800 ml redestilované vody a nechala mícháním rozpustit. Následně jsem upravila pH na 8,0 pomocí pH-metru a 4 M HCl. Roztok jsem doplnila redestilovanou vodou v odměrné baňce do 1000 ml.
- **TBST** - Navážila jsem 8,77 g NaCl, přidala jsem zhruba 300 ml redestilované vody a nechala mícháním rozpustit. Následně jsem přidala 500 μ l Tween 20 a 100 ml Tris pufru, pH 8,0. Redestilovanou vodou jsem roztok doplnila v odměrné baňce do 1000 ml.
- **TBS** - Navážila jsem 8,77 g NaCl, přidala jsem zhruba 300 ml redestilované vody a nechala mícháním rozpustit. Následně jsem přidala 100 ml Tris pufru, pH 8,0. Redestilovanou vodou jsem roztok doplnila v odměrné baňce do 1000 ml.
- **5% mléko** – Navážila jsem 7,5 g sušeného mléka a mícháním rozpustila ve 150 ml TBST.
- **primární protilátka** – Navážila jsem 400 mg BSA a rozpustila v 40 ml TBST. Následně jsem pipetovala 2 μ l králičí protilátky proti CYP3A4, CYP2C, GSTA či kalnexinu nebo 2 μ l kozi protilátky proti AKR1C3. Tím jsem získala protilátku ředěnou 1:20 000.
- **sekundární protilátka** - Navážila jsem 400 mg BSA a rozpustila v 40 ml TBST. Následně jsem pipetovala 2 μ l sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou. Tím jsem získala protilátku ředěnou 1:20 000.

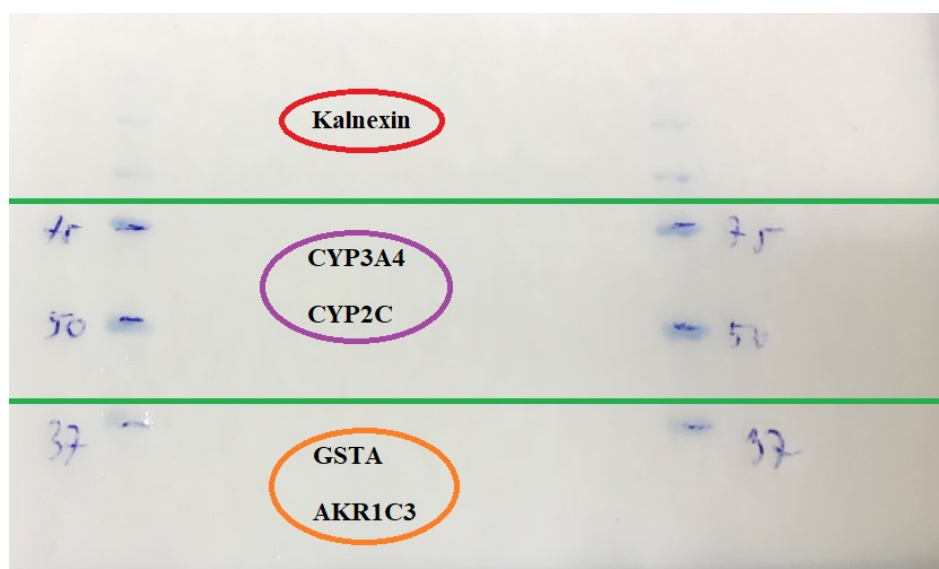
- **substrát** – ECL Prime Western Blotting detection reagent. Roztok A (roztok luminolu) jsem smíchala v poměru 1:1 s roztokem B (roztok peroxidu). Záleželo na velikosti blotů a počtu gelů. Na čtyři gely stačilo celkem 9 ml.

Skladování zásobních roztoků:

Zásobní roztoky byly uchovávány v lednici. Primární a sekundární protilátky se používaly opakovaně, a byly skladovány v mrazáku. Substrát i mléko jsem chystala vždy před použitím čerstvé.

Na detekci proteinů jsem potřebovala: krabičky, nůžky, euroobal, váleček, alobal a kývačku.

Membránu po přeblotování jsem si nastříhala dle toho, jaký enzym jsem detekovala. Na Obrázek 17 máme stříhy znázorněné zelenou přímkou. Kalnexin má molekulovou hmotnost cca 90 kDa, takže jsem membránu pro jeho detekci ustříhla těsně nad 75 kDa. Molekulová hmotnost CYP3A4/CYP2C je zhruba 57 kDa, proto jsem membránu stříhala v místě kolem 37 kDa, GSTA/AKR1C3 má velikost kolem 25 kDa, tudíž pro ni byla určena poslední část blotu.



Obrázek 17 Ukázka stříhání blotů

Jednotlivé části membrány jsem uložila do popsaných krabiček. Ke každému blotu jsem napipetovala alespoň 5 ml 5% mléka. Množství mléka se odvíjelo od velikosti blotů, hlavně aby byly úplně ponořené. Inkubace probíhala na kývačce. Bloty jsem nechala blokovat nejméně 2 hodiny. V tomto kroku jsem zamezila navázání protilátek na všechna nespecifická vazebná místa.

Po blokování jsem bloty omyla redestilovanou vodou, odsála veškerou tekutinu a přidala jednotlivé druhy primárních protilátek. Ke každému blotu jsem napipetovala asi 20 ml. Tato inkubace probíhala na kývačce přes noc v chladicí místnosti. Primární protilátka se zde cíleně vázala na svůj antigen, a to dle specifity buď ke kalnexinu, CYP3A4, CYP2C, AKR1C3 či GSTA.

Druhý den jsem z krabiček odpipetovala veškerou primární protilátku. Za pomoci kývačky jsem pufrem TBST provedla promytí blotů, 6x 5 minut. Poté jsem přidala sekundární protilátku. Ke každému blotu jsem napipetovala asi 20 ml. Jelikož se jedná o protilátku proti primární králičí/kozí protilátce, vázala pouze na protilátku primární. Inkubace trvala při neustálém kývání 1 hodinu a 30 minut.

Po inkubaci se sekundární protilátkou jsem bloty 6x po 5 minutách promývala. Během promytí jsem si naředila do zkumavky substrát a zabalila ho do alobalu, aby byl ve tmě. Po závěrečném promytí jsem bloty dala do roztoku TBS. Ke každému jsem dala alespoň 5 ml, aby byly zcela ponořené.

Před chemiluminiscenční detekcí jsem blot vyndala a pipetovala jsem substrát po celém povrchu membrány. Takto jsem ho nechala inkubovat 5 minut. Poté jsem přebytečný substrát nechala okapat a bloty vložila do euroobalu. Bubliny jsem vytlačila ven válečkem. Tento postup jsem postupně provedla u všech blotů.

Následně jsem vyhodnocovala chemiluminiscenčně denzitu proužků v detektoru Alliance Q9 Advanced (Uvitec). Snímání probíhalo velmi rychle. Před snímáním jsem si v programu *NiceAlliance* zvolila *Chemi* a ponechala předem navolené *Auto*. Jeden snímek jsem vždy vytvořila tzv. *preview*, abych se podívala, jak budou bloty snímány. Pak jsem vždy navolila tlačítkem *Start* skenování. Program sám doporučil, kolik sekund má snímání probíhat. Bloty jsem snímala v různých časech, vždy však maximálně po dobu 20 s. Na snímcích jsem také kontrolovala tlačítkem *Saturation* sytost, pokud sken vyhodnotil přílišné nasycení, červeně ho zvýraznil. Pokud ukázal přesycení částí nebo celých bandů, zvolila jsem kratší čas měření. Snímky jednotlivých blotů jsem si průběžně ukládala.

Snímky s bandy jsem vyhodnocovala v programu *UVIBand*. Rozklikla jsme si program a zvolila *Molecular weight*. Otevřela jsme si fotku, kterou jsem chtěla vyhodnotit, a v záložce *Edit Lane* dále vybrala typ gelu, zda byl horizontální či vertikální. Já pracovala s vertikálním. V záložce *Lane name* jsem popsala a určila pořadí vzorků. Jednotlivé bandy jsem vložila do programem definovaných rámečků. Rámečky jsem si mohla velikostně i různými úhly měnit,

ale každý band musel mít svůj vlastní. V záložce *Edit band* jsem zkontrolovala, jaké bandy program automaticky vyhodnotí. Každým bandem procházela zelená přímka. Červeně znázorněné přímky program vyznačoval jako nehodnotitelné artefakty. Občas se objevily mimo naše bandy, a tak jsem je kliknutím odstranila. Kliknutím na *Select all lanes* jsem si nastavila vyhodnocení všech bandů. V záložce *Analyse-Quantification* jsem kontrolovala pozadí bandů. Červenou přímku v grafu jsem posunula na nulu, a poté zvolila *Apply to all lanes*. Kliknutím na *Next* jsem se dostala do záložky *spot separation*, a zde jsem zkontrolovala a upravila ohraničení jednotlivých píků vzorků. Kliknutím na *Next* jsem se dostala do záložky *Quantity of reference*. V tomto okně jsem opět zvolila *Select all lanes*, a tím mi program poskytl data všech vzorků najednou. Pro vyhodnocení jsem zde zaklikla *Volume* a zvolila otevření v programu Excel. S daty jsem dále pracovala, abych vyjádřila relativní hodnotu proteinové exprese. Intenzitu bandu CYP3A4, CYP2C, AKR1C3 a GSTA jsem vztáhla k intenzitě bandu kalnexinu, který sloužil jako kontrola nanášení. Jedná se o chaperon endoplasmatického retikula, který je v buňkách konstitutivně exprimovaný.

4.4.3 Stanovení genové exprese

Pro stanovení genové exprese jsem provedla několik na sebe navazujících procesů. Jednalo se o přípravu vzorků formou izolace RNA s TRIzolem a měření koncentrace RNA v izolovaných vzorcích. Následovalo ředění vzorků doplněné ošetřením DNAsou. Poté jsem vzorkovou RNA reverzní transkripcí přepsala do cDNA, kterou jsem analyzovala kvantitativním stanovením pomocí real-time qPCR.

Technologie kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR) způsobila v oblasti molekulární biologie obrovskou revoluci. Základ této technologie se od jejího vývoje téměř nezměnil, avšak různými úpravami se zvýšila jeho účinnost. Vylepšení se pohybovala od změn v jednotlivých složkách enzymatické reakce až po samotný detekční systém. V současné době technologie RT-qPCR je citlivější, rychlejší a dostupnější než na samotném začátku jejího objevení (Bachman 2013).

4.4.3.1 Izolace RNA

V molekulární biologii je izolace RNA důležitým předpokladem pro řadu používaných technik. Úspěšná extrakce vysoce kvalitní RNA je stále velmi náročná kvůli všudypřítomné přítomnosti enzymů degradujících RNA (RNasy).

RNA extrakční postupy obvykle zahrnují narušení buněk nebo tkání nejčastěji pomocí mechanické síly či chemickým činidlem. Během extrakce RNA se snažíme o rychlou a čistou separaci RNA od DNA a proteinů, a také obzvláště o inhibici RNas, které jsou aktivní i v buněčném lyzátu. Proto se pro extrakci RNA hojně využívá TRIzol. TRIzol je patentovaná směs guanidiniothiokyanátu a fenolu, kterou lze použít jako pufr pro počáteční homogenizaci tkáně. Guanidiniothiokyanát a fenol rychle denaturují všechny proteiny včetně RNas a zároveň rozbíjejí buňky. Následným přidáním chloroformu do kyselého lyzátu dojde k oddělení biochemických složek do tří fází. V horní vodné fázi máme RNA, protein se nachází v nižší organické fázi a DNA se vyskytuje na rozhraní těchto dvou fází. Obsah RNA ve vodné fázi následně vysrážíme isopropanolem, a poté čistou RNA rozpustíme ve vodném roztoku bez obsahu nukleas. Takto opracovanou RNA jsem použila pro syntézu cDNA, která následně sloužila jako templát pro kvantifikaci exprese mRNA pomocí qPCR (Liu a kol. 2018).

Zásobní roztoky/reagencie:

- **DEPC voda** – Do 1000 ml redestilované vody jsem přidala 1 ml diethylpyrokarbonátu (DEPC). Důkladně jsem roztok protřepala a nechala přes noc stát na stole. Druhý den jsem roztok sterilizovala 20 minut při 120°C v autoklávu.
- **Chloroform** – Byl připraven k použití.
- **Isopropanol** – Byl připraven k použití.
- **75% Ethanol** – Pro přípravu 75% ethanolu jsem smíchala 7,5 ml absolutního ethanolu a 2,5 ml DEPC vody.

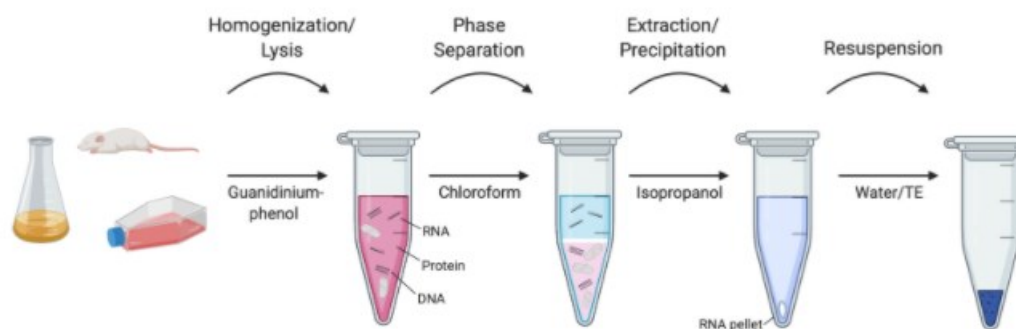
Skladování roztoků:

DEPC jsem skladovala v ledničce. DEPC vodu, isopropanol a chloroform jsem ponechala při laboratorní teplotě v PCR boxu. Roztok 75% ethanolu jsem si připravovala vždy před použitím čerstvý.

Další pomůcky pro izolaci RNA: mikrozkušavky 1,5 ml a 0,5 ml, kuličky pro homogenizaci, centrifuga, homogenizátor Tissue Lyser LT, vortex a laminární box.

Vzorky jaterní tkáně jsem měla pro stanovení genové exprese v mikrozkušavkách spolu s 500 μ l TRIzolu zamražené při -80°C . Před jakoukoliv manipulací jsem vzorky vždy nechala rozmrznout na ledu. Se vzorky jsem se snažila pracovat rychle a čistě, jelikož RNasy mohly vzorky znehodnotit.

Před izolací RNA jsem si do PCR boxu přichystala všechny pomůcky včetně reagensií. Poté jsme si laminární box vysvětila UV světlem po dobu 30 minut a předem si nechala chladit centrifugu Heraeus na 4°C . Zjednodušený postup izolace RNA je znázorněn na Obrázek 19.

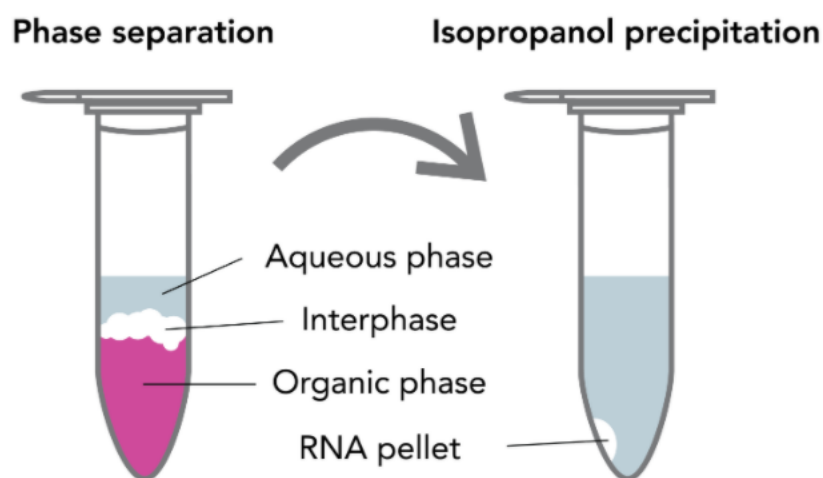


Obrázek 18 Zjednodušené schéma izolace RNA s Trizolem
(<https://www.protocols.io/view/rna-extraction-without-a-kit-beabjaan.html>)

Po rozmrznutí vzorků jsem jaterní tkáň nejprve zhomogenizovala. V PCR boxu jsem ke vzorkům přidala jednu odměrku keramických kuliček. Homogenizaci jsem prováděla na přístroji *Tissue Lyser LT*, na kterém jsem ponechala oscilaci 50 m/s, do hlavy homogenizátoru jsem vyvážíla vzorky, nastavila 2 minuty homogenizace a klikla na *Start*. Po uběhnutí 2 minut jsem se ujistila, že je tkáň rozmělněná, případně jsem postup znovu opakovala. Po úspěšné homogenizaci jsem vzorky přendala do PCR boxu a nechala stát 5 minut při laboratorní teplotě.

Ke vzorkům jsem přidala 100 μ l chloroformu a 15 s jsem stojánkem se vzorky v ruce třepala. Následně jsme vzorky s chloroformem nechala stát 2 minuty při laboratorní teplotě. Po proběhlé inkubaci jsem vzorky stočila 15 minut, při 12 000 g a 4°C . Po stočení se RNA nacházela v horní vodné fázi. Opatrně jsem horní fázi přepipetovala do nové 1,5 ml mikrozkušavky tak, abych se nedotkla jiné fáze. Předešla jsem tím případné kontaminaci DNA nacházející se těsně pod horní fází. Přepipetovat se mi podařilo kolem 250 μ l. K RNA jsem přidala 250 μ l isopropanolu, vše jsem zvortexovala a následně nechala 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsem vzorky opět stočila tentokrát na 10 minut, 12 000 g a při

4°C. Na Obrázek 19 můžeme vidět, jak to v této fázi izolace v mikroskopické vialce vypadalo. Při stočení nám vzniká na dně peletka s RNA, tudíž jsem mikroskopické vialky dávala do centrifugy otvářením ke středu, abych měla v každé mikroskopické vialce peletku na stejném místě a věděla, kde ji mám hledat.



Obrázek 19 Přepipetování horní fáze s RNA do nové mikroskopické vialky, pipetování isopropanolu a následná centrifugace (<<https://www.zymoresearch.com/pages/what-is-trizol>>

Po centrifugaci jsem odstranila supernatant tak, abych peletku neodsála a přidala ke každému vzorku 1 ml 75% ethanolu. Roztok 75% ethanolu jsem použila k opláchnutí peletky. Následně jsem vše zvortexovala a dala centrifugovat na 5 minut, 7 500 g při 4°C. Po stočení jsem opatrně supernatant odstranila a nechala peletku RNA usušit na vzduchu. Sušení trvá různě dlouho, doba se liší dle její velikosti. Peletky jsem hlídala a jakmile začaly zprůhledňovat, ihned jsme k nim pipetovala 20-25 μ l DEPC vody. Po rozpuštění jsem vzorky vortexovala a ukládala zpátky na led. Pokud jsem s dalšími kroky pokračovala jiný den, vzorky jsem zamrazila při -80°C.

4.4.3.2 Měření koncentrace RNA

Měření koncentrace RNA jsem prováděla na přístroji *NanoDrop 2000*. Zde jsem si také zkontrolovala i čistotu RNA.

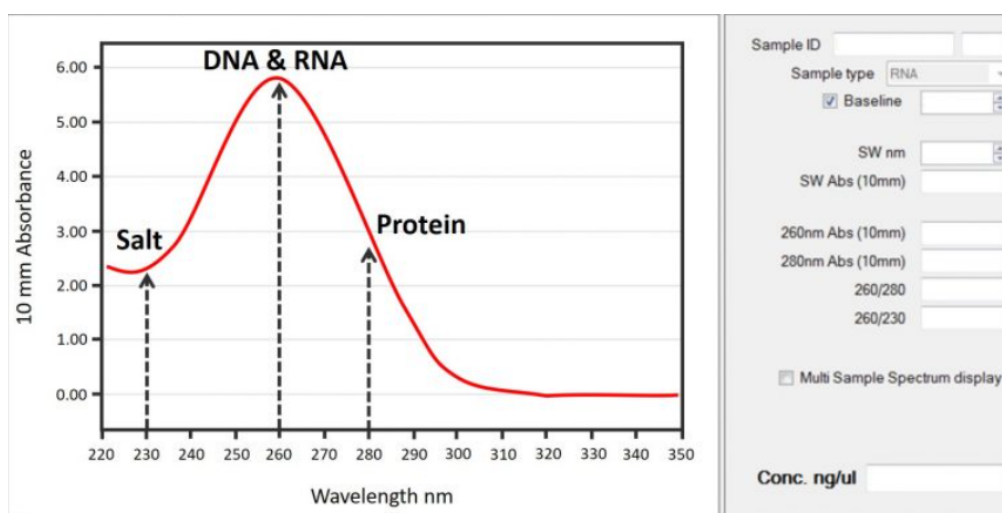
Vlnová délka kolem 260 nm je absorpční maximum pro DNA i RNA. Aromatické aminokyseliny mají maximum absorpce kolem 280 nm. Poměr 260/280 nm umožňuje určit případnou kontaminaci vzorku proteiny. Čistá RNA má hodnotu poměru kolem 2,0. Poměr 260/230 nm je určený pro zjišťování balastních látek v extraktu, jímž mohl být fenol či

guanidiniové soli. Pokud měl poměr absorbancí při 260/230 nm hodnotu kolem 2,0, pak byl vzorek čistý. Pokud by byla hodnota poměru nižší než 1,8 jednalo by se o vzorek kontaminovaný organickou příměsí (Beránek 2016).

K měření koncentrace a čistoty RNA jsem potřebovala: vzorky na ledu, redestilovanou vodu a čtverečky buničiny.

Pro měření jsem si v programu pro vyhodnocení zaklikla měření *Nucleic Acid*. Na obrazovce se objevila ikona, která požadovala inicializaci přístroje s kapkou vody. Na dolní hrot analyzátoru jsem pipetovala 1 μ l redestilované vody, přiklopila horní hrot a odklikla jsem v ikoně *Ok*. Mezitím se přístroj inicializoval. Po každém měření jsem dolní hrot očistila redestilovanou vodou a osušila čtverečkem buničiny. Pokračovala jsem měřením blanku. Jako blank jsem aplikovala 1 μ l redestilované vody a v programu pro jeho měření jsme klikla na ikonu *Blank*. Poté byl přístroj připraven na měření. Nejprve jsem vždy pipetovala 1 μ l vzorku, přiklopila horní hrot a v *sample type* zvolila *RNA-40*. V *Sample ID* jsem vzorek pojmenovala a jako poslední jsem zvolila tlačítko *Measure*. Takto jsem změřila všechny vzorky.

Analyzátor měřil celkem při třech vlnových délkách při 260, 280 a 230 nm. Z analyzátoru jsem získala poměry 260/280 nm, 260/230 nm a koncentraci RNA v ng/ μ l. Při vyhodnocení vzorku jsem s hodnotami získala i křivku měření (ukázka křivky na Obrázek 20). Po měření jsem přístroj omyla redestilovanou vodou a osušila čtverečky buničiny. Data jsem kliknutím na *Report* exportovala do Excelu, následně jsem vypočítala objem vzorku, který obsahoval 4 μ g RNA a objem DEPC vody tak, aby byl celkový objem 26 μ l.



Obrázek 20 Ukázková křivka při měření analyzátozem Nanodrop (<<https://toptipbio.com/the-nanodrop-results-explained/>>

4.4.3.3 Ošetření DNAsou

DNAsa je enzym, který selektivně štěpí pouze DNA. Ošetření vzorků RNA DNAsou je v tomto případě velmi výhodné, jelikož odstraní případnou kontaminaci vzorku genomovou DNA. Přítomnost významného množství kontaminující DNA ve vzorku RNA by mohla testy RT-qPCR narušit. Například může vést k podcenění množství vstupní RNA a vyčerpat tím primery a dNTPs, které použijeme při reverzní transkripci v kombinaci s použitím náhodných hexamerů (Paska a kol. 2019).

Zásobní roztoky/reagencie:

- **0,5 M EDTA pH 8,0** – Navážila jsem 18,61 g EDTA a přidala cca 80 ml DEPC vody. Do roztoku jsme přidala cca 2 g NaOH a nechala mícháním rozpustit. Následně jsme upravila pH na 8,0 pomocí pH-metru a dalšího přidaného NaOH. EDTA se rozpustila až když se pH blížilo hodnotě 8,0. Roztok jsem doplnila DEPC vodou v odměrné baňce do 100 ml.

- **0,1 M EDTA pH 8,0** – 0,1 M roztok EDTA pH 8,0 jsem ředila ze zásobního roztoku 0,5 M EDTA o pH 8,0 v poměru 1:4. Pipetovala jsem 100 μ l zásobního roztoku EDTA do 400 μ l DEPC vody.

- **DNAsa a pufr pro DNAsu** – Tyto reagencie jsem měla od výrobce připraveny k použití. DNAsa se ředila pufrem pro DNAsu v poměru 1:3.

- **DEPC H₂O** – Popis přípravy a uchovávání roztoku viz. Izolace RNA.

Skladování zásobních roztoků:

Skladování 0,5 M i 0,1 M EDTA pH 8,0 bylo při laboratorní teplotě. DNAsa a pufr pro DNAsu jsem skladovala v mrazáku při -20°C. DNAsu jsem ředila těsně před použitím.

Na ošetření DNAsou jsem dále potřebovala: 0,5 ml mikrozkušavky, termoblok, led, vortex, minicentrifugu a PCR box.

Po celou dobu jsem pracovala v PCR boxu. Před použitím jsem si ho vysvětila UV světlem po dobu 30 minut. DNAsu jsem ředila vždy v množství o 1-2 vzorky větším kvůli případné chybě v pipetování. Ředění pro 15 vzorků + 1 navíc odpovídalo pipetování 16 μ l DNAsy k 48 μ l pufru pro DNAsu. V jedné sadě vzorků jsem měla celkem 12 vzorků, takže jsem pipetovala 14 μ l DNAsy do 42 μ l pufru pro DNAsu.

Před pipetováním jsem vzorky a ředěnou DNAsu zvortexovala a stočila v minicentrifuze. Následně jsme do 0,5 ml mikrozkušavek pipetovala DEPC vodu, do ní vzorky a promíchala na vortexu. Pipetované množství obou složek vycházelo z výpočtu naměřené koncentrace RNA. Ke směsi jsem přidala 4 μl naředěné DNAsy. Výsledný objem vzorku byl 30 μl . DNAsu jsem pipetovala na stěnu, aby byla smíchána u všech vzorků najednou. Celou směs jsem promíchala a stočila. Poté jsem reakční směs nechala inkubovat v termobloku 25 minut při 37°C. Během inkubace jsem mikrozkušavky nechávala jemně protřepávat při 500 rpm. V tomto kroku docházelo k aktivaci DNAsy.

Po proběhlé inkubaci jsem ke směsi přidala 1,5 μl 0,1 M EDTA a nechala 5 minut inkubovat při 75°C. Při této inkubaci se DNAsa inaktivovala. Po inkubaci jsem vzorky uložila na led a nechala vychladnout. Poté jsem pipetovala 8,5 μl DEPC H₂O. Celkový objem vzorků činil 40 μl a výsledná koncentrace ošetřené RNA byla 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Takto ošetřené vzorky byly připraveny k reverzní transkripci nebo jsem je zamrazila na -80°C.

4.4.3.4 Reverzní transkripce

Reverzní transkripci (RT) zprostředkovávají RNA-dependentní DNA-polymerasy, tzv. *reverzní transkriptasy*. Enzymy přepisují primární sekvence nukleotidů RNA do struktury DNA, čímž vzniká jednovláknový řetězec cDNA. Výhodou získané molekuly cDNA je znemožnění rychlé degradace, což je pro molekuly RNA typické. Nezbytnou podmínkou pro zahájení katalytické aktivity reverzních transkriptas je přítomnost primerů komplementárních k RNA, které vytvoří krátký dvouřetezec. RT probíhá standardně při teplotách 37°C nebo 42°C a reakce trvá několik desítek minut. Pro mou RT jsem použila náhodné hexamery. Při jejich použití vznikají stovky nekompletních cDNA molekul různých délek. Jejich použití je vhodné pro stanovování genové exprese pomocí PCR. Mezi další komponenty pro RT patří Tris pufr (pH kolem 7,5), deoxynukleotidy, inhibitor RNaseIN proti degradaci RNA (přidává se u větších koncentracích RNA) a DTT udržující thiolové skupiny enzymů v redukovaném stavu. Před samotným procesem RT probíhá degradace sekundárních struktur RNA a nasednutí primerů při zahřátí na teplotu 65-70°C po dobu 10-15 minut. Použití vyšších teplot v tomto kroku umožňuje specifitější nasednutí primerů na určená místa. Po ochlazení na 0°C se do stejných reakčních zkumavek přidá připravený mastermix pro syntézu cDNA. Po skončení syntézy cDNA se původní řetězce RNA degradují většinou tepelným způsobem degradace (Beránek 2016).

Reagencie:

- **Reverzní transkriptasa (RT)** – ProtoScript II (NEB)
- **Reakční pufr pro RT** – Je součástí balení s reverzní transkriptasou.
- **DTT** – Dodávaný 10x koncentrovaný.
- **Směs dNTPs** – Koncentrace každého dNTP byla ve směsi 5 mM.
- **Náhodné hexamery** – N6
- **DEPC H₂O** - Popis přípravy a uchovávání roztoku viz. Izolace RNA.

Všechny reagencie kromě DEPC vody byly výrobcem připraveny k použití a skladovány v mrazáku při -20°C.

Pro reverzní transkripci jsem dále potřebovala: 0,2 ml a 0,5 ml mikrozkušavky, vortex, minicentrifugu, PCR cyklér, PCR box a mrazicí stojánek.

Po celou dobu jsem pracovala v PCR boxu. Před prací jsem si pracovní plochu vysvětila UV světlem po dobu 30 minut. Všechny reagencie jsem si mezitím nechala rozmrazit. Před pipetováním jsme vzorky zvortexovala a na minicentrifuze stočila. Totéž jsem provedla i s reagensy.

Pro ředění mastermixu určenému k reverzní transkripci jsem postupovala podle Tabulka 11. Naředěný mastermix jsem měla v 0,5 ml mikrozkušavce. Před použitím jsem ho zvortexovala a stočila. Pro přípravu jsem vždy počítala s pipetovací chybou, takže jsem počítala o 1-2 vzorky navíc.

Tabulka 11 Příprava mastermixu pro reversní transkripci

| Příprava mastermixu pro reverzní transkripci | | | |
|---|-----------------|------------------|------------------|
| | 1 vzorek | 16 vzorků | 14 vzorků |
| Pufr | 4 µl | 64 µl | 56 µl |
| DTT | 2 µl | 32 µl | 28 µl |
| dNTPs | 4 µl | 64 µl | 56 µl |
| RT | 0,5 µl | 8 µl | 7 µl |
| DEPC H₂O | 0,5 µl | 8 µl | 7 µl |
| celkem | 11 µl | 176 µl | 154 µl |

Do 0,2 ml mikrozkušavek jsem pipetovala 8 µl RNA. Na stěnu mikrozkušavky jsem přidala 1 µl náhodných hexamerů. Reakční směs jsem zamíchala a stočila. Následně jsem

vzorky měla přichystané do PCR cykléru. Vzorky jsme do něj vložila, zavřela víko, pevně dotáhla zelené kolečko a tlačítkem *Run* zahájila výběr analýzy. Šipkami jsme zvolila metodu *PMcDNA*, pro *Sample volume 20 μl* jsem zmáčkla tlačítko *Enter*. V tomto momentě se vzorky začaly zahřívat celkem 5 minut při 65°C. Po uběhlé době zahřívání jsem klikla na tlačítko *PAUSE*, povolila zelené kolečko a vzorky jsem uložila do mrazícího stojánku, který vzorky ochladil.

Poté jsem ke vzorkům pipetovala na stěnu 11 μl připraveného mastermixu. Následně jsem reakční směs zamíchala a stočila. Vzorky jsem uložila zpět do PCR cykléru, zmáčkla *PAUSE* a proces pokračoval dál. Následovalo zahřátí po dobu 10 minut při 25°C. Poté probíhala 50 minut při 42°C syntéza cDNA. V dalších 5 minutách při teplotě 80°C docházelo k denaturaci RT a degradaci RNA.

Po doběhnutí reverzní transkripce jsem ke vzorkům cDNA přidávala 120 μl DEPC H₂O, čímž jsem je 5x zředila. Výsledná koncentrace RNA byla 50 ng v 5 μl. Takto připravenou cDNA jsem uchovávala v mrazáku při -20°C.

4.4.3.5 Real-time PCR

Polymerasová řetězová reakce (PCR) se používá k amplifikaci a současné kvantifikaci cílového úseku DNA. Na rozdíl od konvenčního PCR, který je založen na „end-point“ analýze qPCR, kvantifikuje proces probíhající v reálném čase. Základem pro detekci a kvantifikaci je emise fluorescence. Existuje mnoho způsobů, jak docílit fluorescence například použitím značeného primeru, sondy nebo využitím vazby interkalačních fluorescenčních látek přímo na DNA (Sigh a kol. 2016). Ve své diplomové práci jsem použila SYBR Green I. Jedná se o barvivo, které se řadí mezi interkalační látky. Emise fluorescenčního záření je navržena tak, aby k ní docházelo pouze tehdy, pokud dojde k amplifikaci. Nárůst fluorescence vykazuje křivku esovitého charakteru (Beránek 2016).

PCR se skládá ze tří fází, fáze denaturace (94-96°C), annealingu (50-65°C) a elongace (72°C). Mnohonásobným opakováním těchto fází spolu se změnou teplot metoda získává svůj cyklický charakter. Při polymerasové řetězové reakci vznikají díky katalytické aktivitě DNA-polymeras nové řetězce ve směru 5'-3'. Ve fázi annealingu nové řetězce mohou hybridizovat s druhým z použitých primerů. Opakováním denaturačního kroku při teplotě kolem 95°C a následným snížením teplot v rozmezí 50-65°C mohou tepelně odolné primery

opětovně hybridizovat s DNA. Přítomná polymerasa vždy ve fázi elongace zdvojnásobí počet přítomných řetězců. Nové řetězce se amplifikují geometrickou řadou. Celkový počet cyklů je zhruba 30-40 opakování (Beránek 2016).

Kvantifikace genové exprese se stala základem většiny molekulárně biologických laboratoří. Měření množství buněčné RNA je možné určit do jaké míry je konkrétní gen exprimován. U mnoha genů je úroveň exprese velmi variabilní. Důvodem může být odlišnost jednotlivých genů nebo se může jednat o rozdíl mezi buňkami, ze kterých RNA stanovujeme a velmi také záleží na experimentálních podmínkách. Kvantitativní koncový bod pro PCR v reálném čase je prahový cyklus (C_T). C_T je definován jako cyklus PCR, při kterém fluorescenční signál barviva překročí libovolně stanovenou prahovou hodnotu. Číselná hodnota parametru C_T je nepřímo úměrná množství amplikonu v reakci, což znamená, že čím nižší máme hodnotu C_T , tím větší je množství amplikonu ve vzorku (Schmittgen a kol. 2008).

Reagencie:

- **qPCR kit xCEED (BIOTECH) - SG mix** – SYBR GREEN I 2x koncentrovaný již od výrobce obsahoval DNA polymerasu, dNTPs, pufr a barvivo SYBR green I.

- **F (forward) primer a R (reverse) primer** – Primery byly ředěné na koncentraci 5 μ M a smíchané dohromady. Primery navrhla doc. Petra Matoušková v programu Primer3 a jejich syntéza proběhla ve společnosti Generi Biotech v Hradci Králové. Účinnost a funkčnost primerů byla ověřena Dr. Tomášem Zárybnickým. Struktura použitých primerů je uvedena v Tabulka 12.

- **Redestilovaná voda**

Všechny reagencie kromě redestilované vody jsem uchovávala v mrazáku při -20°C .

Tabulka 12 Sekvence použitých primerů

| Zkratka | Název genu | Fyziologická funkce | Sekvence primerů 5'-3' |
|------------------------|---|--|--|
| Cílové geny | | | |
| CYP1A2 | Cytochrom P450 rodina 1, podrodina A, člen 2 | I. fáze biotransformace | F: CTTCCCTGAGAGTAGCGATGAGA R: GCAGTCTCCACGAACTCATGAG |
| CYP2B6 | Cytochrom P450 rodina 2, podrodina B, člen 6 | I. fáze biotransformace | F: CAGCTTCCGAGGGTACATCA R: AGGATTGAAGGCGTCTGGTT |
| CYP2C | Cytochrom P450 rodina 2, podrodina C | I. fáze biotransformace | F: TTTGGGATGGGGAAGAGGAG R: GGAGCACAGCCCAGGAT |
| CYP3A4 | Cytochrom P450 rodina 3, podrodina A, člen 4 | I. fáze biotransformace | F: CCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGG R: CTGGTGTCTCAGGCACAGA |
| NQO1 | NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa | I. fáze biotransformace | F: TTCCAGCCGACAACCAGATC R: AGCCTCCTCCTTTTCCTATCCT |
| AKR1C | Aldo-ketoreduktasa, rodina 1, podrodina C | I. fáze biotransformace | F: ATGAGGAGCAGGTTGGACTG R: GCTTTGAAGTGTAGAATATGTCTTCT |
| UGT1A6 | UDP-glukuronosyltransferasa, rodina 1, podrodina A, člen 6 | II. fáze biotransformace | F: CCGGGGTCATGAGATTGTAGT R: AGCTCTTCTTGTCATACGGC |
| SULT1A1 | Sulfotransferasa, rodina 1, podrodina A, člen 1 | II. fáze biotransformace | F: ATGGTTCAGCACACGTCGTT R: GGACGGTGGTGTAGTTGGTC |
| GSTA1 | Glutathion-S-transferasa, třída α , člen 1 | II. fáze biotransformace, ochrana před ROS a produkty peroxidace | F: CGCTACTTCCCTGCCTTTGA R: GCCCGGCTCAGCTTGTTG |
| GSTP1 | Glutathion-S-transferasa, třída π , člen 1 | II. fáze biotransformace | F: AGCCTTTGAGACCCTGCTG R: GTCAGCGAAGGAGATCTGGTC |
| Referenční geny | | | |
| SDHA | Sukcinátdehydrogenasa, podjednotka A | Součást citrátového cyklu a dýchacího řetězce | F: TGGGAACAAGAGGGCATCTG R: ACCACCACTGCATCAAATTCATG |
| YWHAZ | Tyrosin-3-monooxygenasa/tryptofan-5-monooxygenasa aktivační protein ζ | Součást signálních drah | F: TGATCCCCAATGCTTCACAAG R: GCCAAGTAACGGTAGTAATCTCC |

Dále jsem k qPCR potřebovala: 0,5 ml mikrozkušavky, 96-jamkové destičky, vortex, minicentrifugu, centrifugu na destičky, led, folii a klínek.

PCR cyklér jsem si zapnula 30 minut před analýzou. Vzorky jsme si mezitím nechala na ledu rozmraznout. Do 0,5 ml mikrozkušavek jsem napipetovala reagentie dle Tabulka 13. V připravené qPCR směsi jsem měla finální koncentraci primerů 250 μ M. Vzorky jsem stanovovala v duplikátu, tudíž jsme si chystala mastermixu dvojnásobné množství a k tomu 1-2

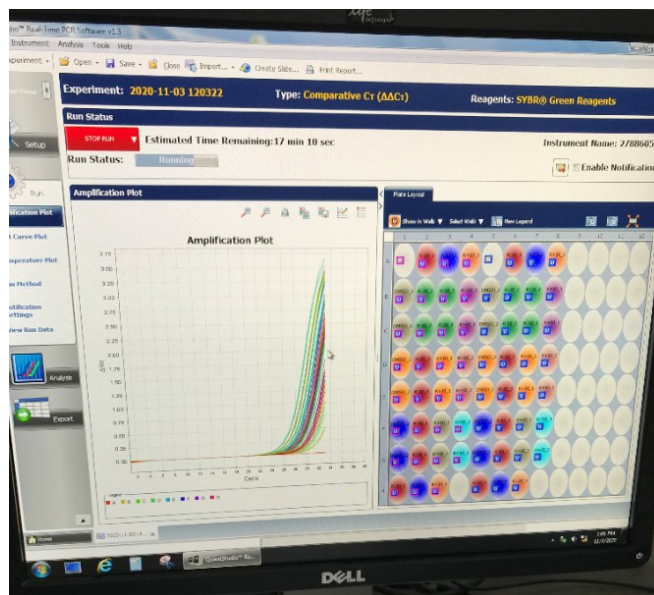
vzorky navíc kvůli pipetovací chybě. Do množství mastermixu v Tabulka 13 jsem započítala i stanovení NTC (no template control).

Tabulka 13 Příprava mastermixu na qPCR

| SYBR qPCR mastermix | | | |
|--|-----------------|------------------|------------------|
| | 1 vzorek | 34 vzorků | 30 vzorků |
| voda | 4,2 μ l | 142,8 μ l | 126 μ l |
| 2x SG mix | 10 μ l | 340 μ l | 300 μ l |
| F primer | 0,8 μ l | 27,2 μ l | 24 μ l |
| R primer | | | |
| 15 μl do každé jamky | | | |
| cDNA | 5 μ l | 5 μ l | 5 μ l |
| Celkem | 20 μ l | 20 μ l | 20 μ l |

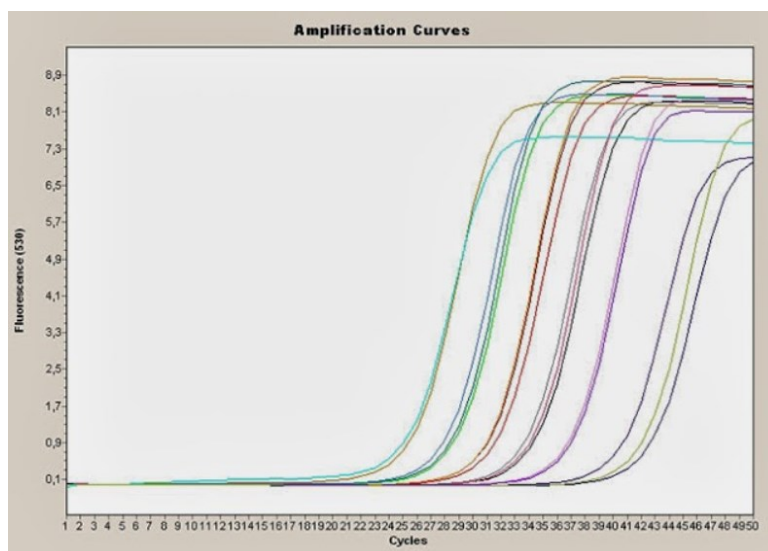
Směsi mastermixů jsme pipetovala 15 μ l do každé jamky. K tomu jsem přidala na stěnu 5 μ l cDNA. Pro stanovení NTC jsem pipetovala na stěnu 5 μ l redestilované vody. Destičku jsem přelepila folií, klínkem jsem ji zarovnal a dala stočit.

Poté jsem s destičkou pokračovala u PCR cykléru. Na PCR cykléru jsem zvolila tlačítko *Eject*. Zprava se vysunul držák, kam jsem destičku vložila a opět tlačítkem *Eject* jsem destičku zasunula do cykléru. K navolení běhu jsem se přesunula k počítači. Zde jsem v programu zvolila *New experiment -from template* a vybrala si templát určený pro mou analýzu. Následně jsem si popsala vzorky a jejich pozice v destičce, včetně umístění NTC. Popsala jsem si jaké geny jsem stanovovala, zvolila *RUN*, a tím zahájila qPCR. V průběhu analýzy jsme kontrolovala průběh fluorescenčních křivek a teploty tání (Obrázek 21). Doba celého běhu trvala asi 1 hodinu a 15 minut.



Obrázek 21 Kontrola průběhu fluorescenčních křivek při analýze qPCR (Autor)

Po skončení běhu jsem si data exportovala do Excelu. Ke kvantitativnímu vyhodnocení jsem potřebovala hodnotu C_T prahového cyklu. Výsledné fluorescenční křivky vypadaly jako na Obrázek 22.



Obrázek 22 Fluorescenční křivky qPCR
 (<<http://technologyinscience.blogspot.com/2013/12/real-time-pcr-qpcr-fluorescent-primer.html#.YGyieegzZPZ>>)

4.4.4 Statistická analýza

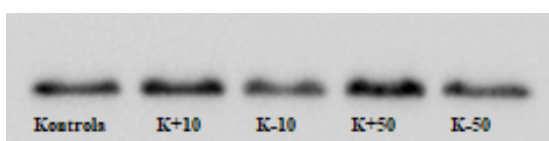
Řezy jsem připravila v triplikátu. Expresi mRNA jsem stanovovala v duplikátu pro každý řez zvlášť. Proteinovou expresi jsem prováděla ve směsných vzorcích a opakovala dvakrát až čtyřikrát. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Porovnání mezi skupinami jsem provedla pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým testem za použití GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Rozdíly jsem považovala za významné, když $p < 0,05$ a v grafu jsem je označila *.

5 VÝSLEDKY

5.1 Účinek isomerů kafru na proteinovou expresi biotransformačních enzymů

Techniku western blotu jsem využila k určení relativní proteinové exprese celkem čtyř enzymů. Jednalo se o CYP2C, CYP3A4, AKR1C3 a GSTA. Jaterní řezy byly inkubovány s isomery kafru, (+)-kafrem a (-)-kafrem v koncentraci 10 μ M a 50 μ M. Proto jsou vzorky dále označovány jako K+10, K+50, K-10 a K-50. Inkubace s jednotlivými koncentracemi isomerů probíhala při 37°C po dobu 24 hodin. Jako kontrolu jsem použila 0,1% DMSO (stejná koncentrace DMSO je i ve vzorcích s kafrem). Sada pacienta L46 obsahovala kvůli nedostatku tkáně pouze isomery o koncentraci 50 μ M.

Výsledné hodnoty *Volume* z programu *UVIband* jsem zpracovávala v programu Microsoft Excel. Hodnota *Volume* vyjadřuje denzitu jednotlivých bandů (proužků) (Obrázek 23). Proteinovou expresi studovaných enzymů jsem vztáhla k proteinové expresi kalnexinu, který sloužil jako tzv. kontrola nanášení. Jedná se o endoplasmatický chaperon s konstitutivní expresí. Stanovované enzymy byly jak cytosolické (GST), tak mikrosomální (CYP), ale z jaterních řezů byl připraven homogenát, který obsahuje oba typy proteinů.



Obrázek 23 Ukázka skenování blotu stanovení GSTA pacientky L48.

Stanovení jsem prováděla minimálně na dvou gelech pro každý stanovovaný protein včetně kalnexinu, přičemž kalnexin byl stanoven na každém gelu. Jednotlivé hodnoty proužků jsem dělila hodnotou odpovídajícího kalnexinu (Vzorec 1). Tuto hodnotu jsem dále použila ve výpočtu relativní exprese vztáženém na každou kontrolu přítomnou v sadě vzorků (Vzorec 2). Vypočítané hodnoty jsem zprůměrovala a spočítala směrodatnou odchylku (SD). Na závěr jsem vytvořila chybové úsečky.

Vzorec 1 Výpočet poměru denzit:

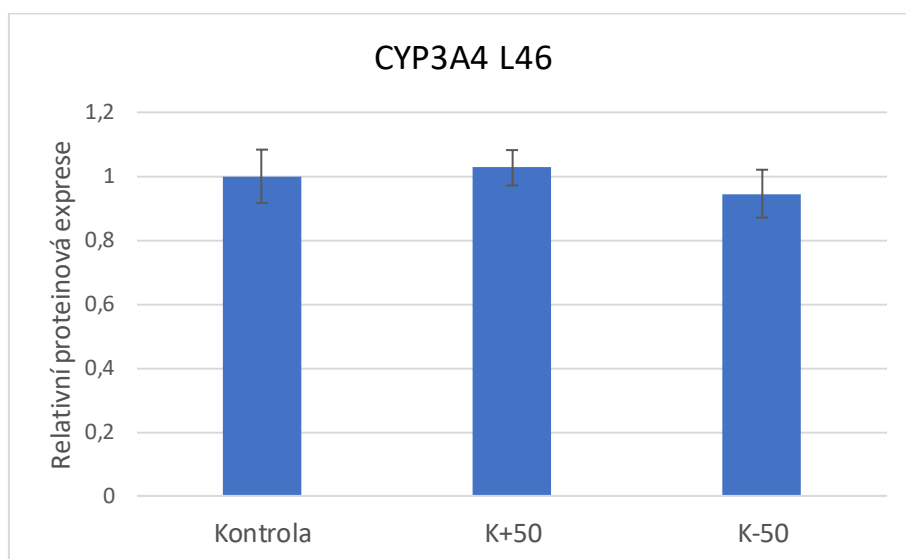
$$\text{Poměr denzit} = \frac{\text{denzita KONTROLY/VZORKU}^{\text{CYP3 A4/CYP2C/AKR1C3/GSTA}}}{\text{denzita KONTROLY/VZORKU}^{\text{KALNEXIN}}}$$

Vzorec 2 Výpočet relativní proteinové exprese vzorků:

$$\text{Relativní proteinová exprese} = \frac{\text{poměr denzit VZORKU}}{\text{poměr denzit KONTROLY}}$$

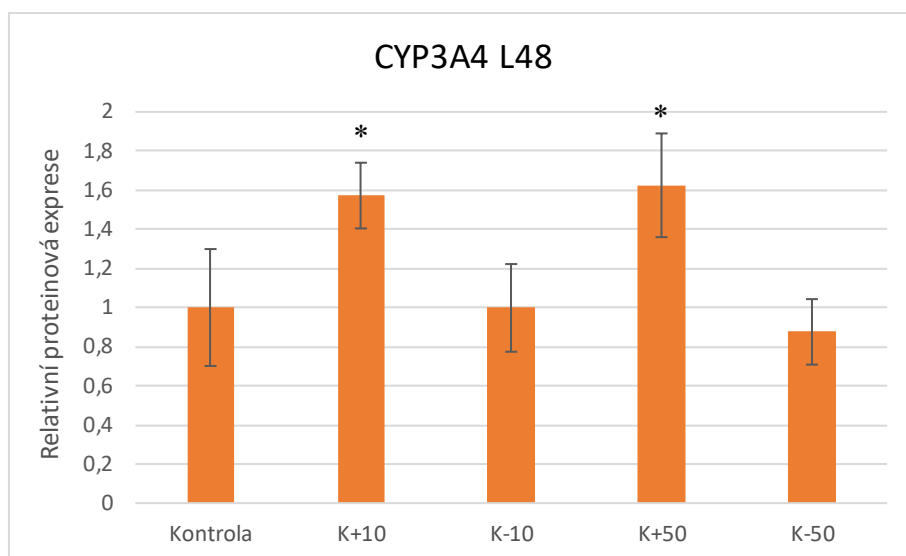
5.1.1 Proteinová exprese CYP3A4

Jaterní řezy pacienta L46 byly inkubovány s 50 μM (+)-kafrem (K+50) a (-)-kafrem (K-50). Při porovnání vzorků vztažené k hodnotě kontroly lze pozorovat, že relativní proteinová exprese CYP3A4 u tohoto pacienta nebyla ani jedním isomerem kafru ovlivněna (Obrázek 24).



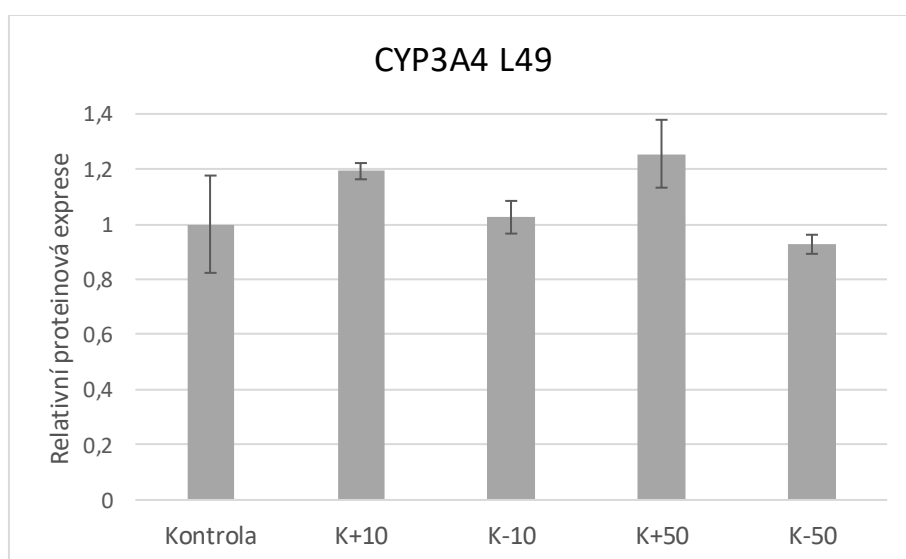
Obrázek 24 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP3A4 v jaterních řezech z pacienta L46. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kafrem a (-)-kafrem 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$).

Jaterní řezy pacientky L48 byly inkubovány s (+)-kafrem a (-)-kafrem v koncentracích 10 μM (K+10, K-10) a 50 μM (K+50, K-50). V porovnání vzorků s kontrolním vzorkem lze pozorovat signifikantně zvýšenou relativní proteinovou expresi enzymu CYP3A4 působením isomeru (+)-kafru v obou stanovovaných koncentracích. Při koncentraci K+10 jsou hodnoty vůči kontrole zvýšeny o 57,2 % a při koncentraci K+50 až o 62,5 %. Působením isomeru (-)-kafru (K-10 a K-50) nebyla proteinová exprese CYP3A4 ovlivněna (Obrázek 25).



Obrázek 25 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP3A4 v jaterních řezech z pacienta L48. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kaforem a (-)-kaforem 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$). Sloupce označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).

Jaterní řezy pacienta L49 byly inkubovány s oběma isomery v 10 μM a 50 μM koncentraci. (+)-Kafr (K+10, K+50) v obou koncentracích způsobil mírné zvýšení exprese CYP3A4 v porovnání s kontrolou (o 19,2 resp. 25,6 %), ale tento účinek nebyl statisticky významný. Druhý isomer nezpůsobil změnu v proteinové expresi (Obrázek 26). Získané výsledky jsou tedy velmi podobné výsledkům pacienta L48.

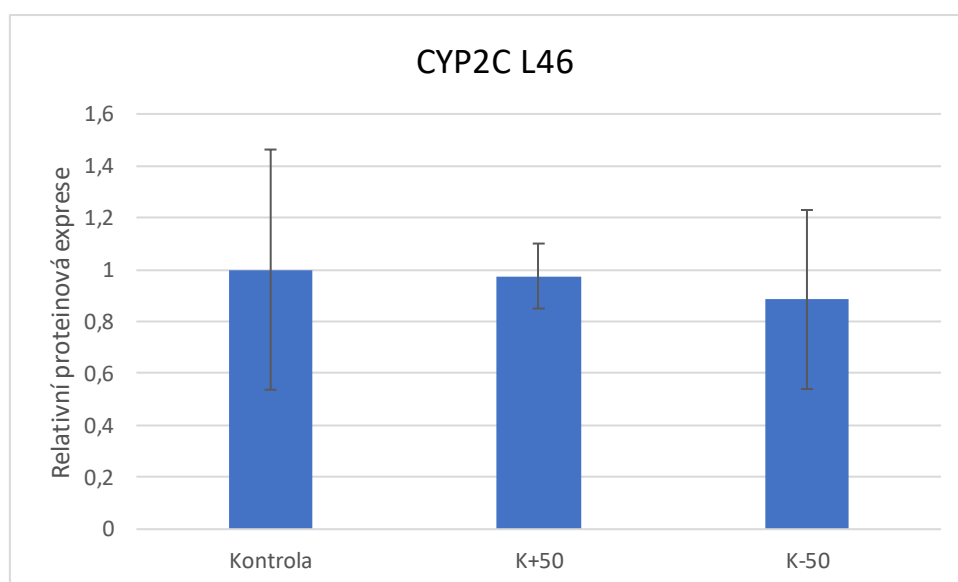


Obrázek 26 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP3A4 v jaterních řezech z pacienta L49. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kaforem a (-)-kaforem 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 2$).

5.1.2 Proteinová exprese CYP2C

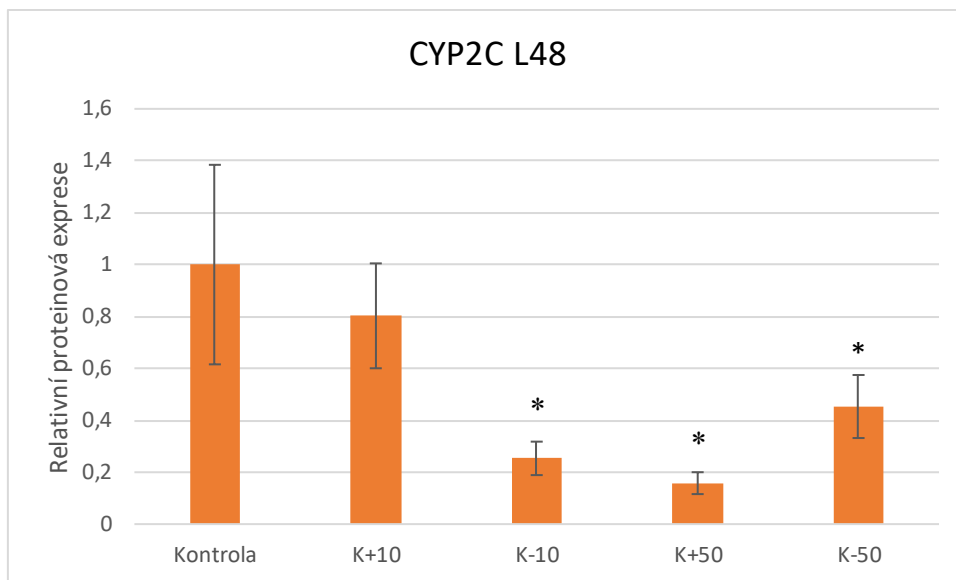
Použitá protilátka proti CYP2C je schopná detekovat čtyři isoformy CYP2C – lidské isoformy 2C9, 2C18 a 2C19 a potkaní isoformu 2C12.

Jaterní řezy pacienta L46 byly inkubovány s 50 μ M (+)-kafrem (K+50) a (-)-kafrem (K-50). Relativní proteinová exprese CYP2C u tohoto pacienta nebyla ani jedním isomerem kafru ovlivněna (Obrázek 27).



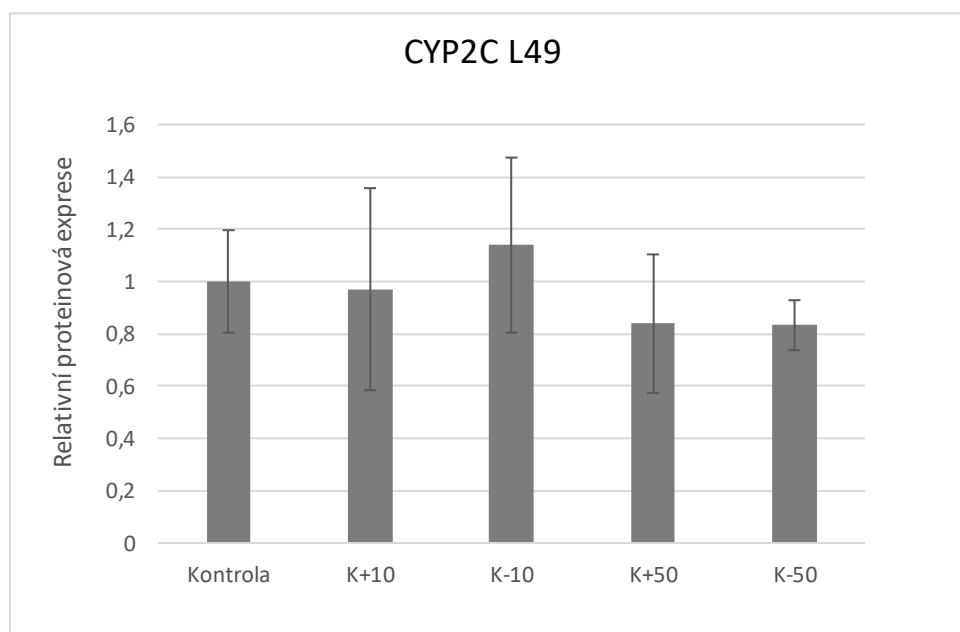
Obrázek 27 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP2C v jaterních řezech z pacienta L46. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kafrem a (-)-kafrem 50 μ M při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$).

Jaterní řezy pacientky L48 byly inkubovány s (+)-kafrem a (-)-kafrem v koncentracích 10 μ M (K+10, K-10) a 50 μ M (K+50, K-50). V porovnání vzorků s kontrolou lze pozorovat signifikantně sníženou relativní proteinovou expresi enzymu CYP2C u vzorku K+50, K-10 a K-50. Isomer (+)-kafř 50 μ M snížil proteinovou expresi CYP2C o 84,2 % ve srovnání s kontrolou. Ve vzorcích s (-)-kafrem 10 μ M a 50 μ M došlo ke snížení proteinové exprese CYP2C o 74,7 % resp. 54,7 % (Obrázek 28).



Obrázek 28 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP2C v jaterních řezech z pacientky L48. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kaftrem a (-)-kaftrem 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$). Sloupce označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).

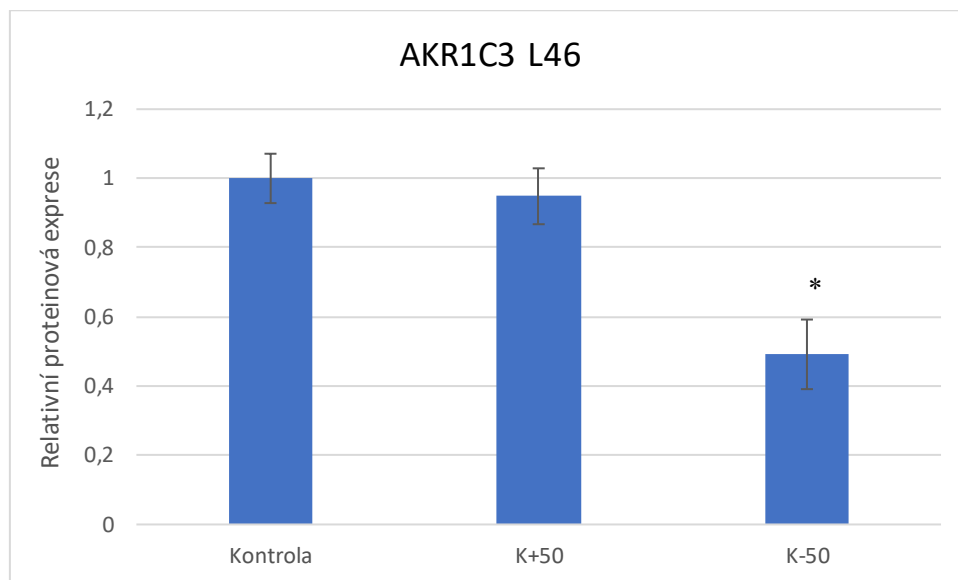
Jaterní řezy pacienta L49 byly inkubovány s oběma isomery v 10 μM (K+10, K+50) a 50 μM (K-10, K-50) koncentraci. Ani jeden isomer kafru nevyvolal statisticky významné změny v proteinové expresi enzymu CYP2C (Obrázek 29).



Obrázek 29 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP2C v jaterních řezech z pacienta L49. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kaftrem a (-)-kaftrem 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$).

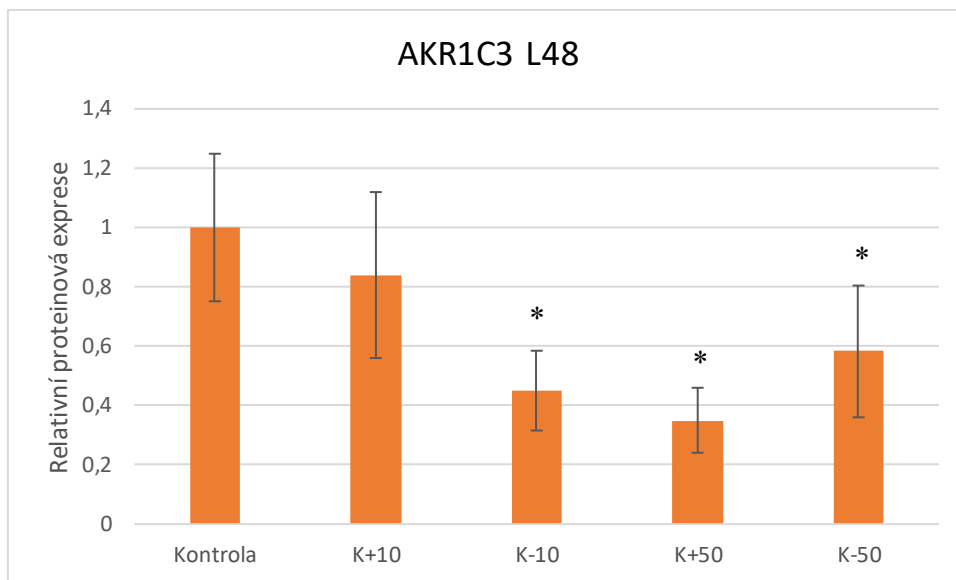
5.1.3 Proteinová exprese AKR1C3

Jaterní řezy pacienta L46 byly inkubovány s 50 μM (+)-kafrem (K+50) a (-)-kafrem (K-50). Relativní proteinová exprese AKR1C3 u tohoto pacienta byla signifikantně snížena u vzorku K-50 a to o 50,8 % ve srovnání s kontrolou (Obrázek 30).



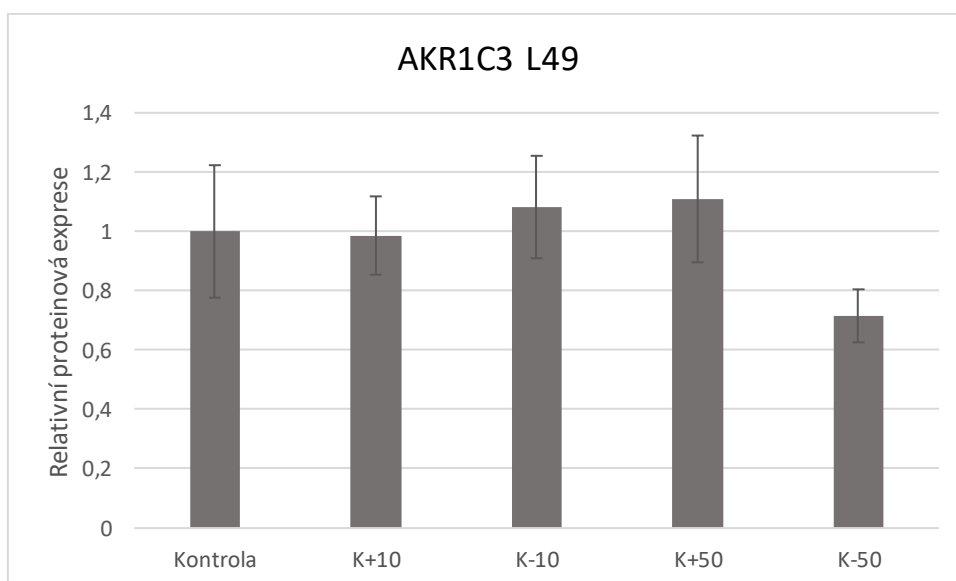
Obrázek 30 Vliv isomerů kofeinu na proteinovou expresi AKR1C3 v jaterních řezech z pacienta L46. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kafrem a (-)-kafrem 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$). Sloupce označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).

Jaterní řezy pacientky L48 byly inkubovány s (+)-kafrem a (-)-kafrem v koncentracích 10 μM (K+10, K-10) a 50 μM (K+50, K-50). V porovnání vzorků s kontrolním vzorkem lze pozorovat signifikantně sníženou relativní proteinovou expresi enzymu AKR1C3 u vzorků K+50, K-10 a K-50. Podobné snížení bylo zaznamenáno i u proteinové exprese enzymu CYP2C. Největší inhibiční účinek vyvolal (+)-kafir 50 μM , který snížil expresi AKR1C3 o 65,0 %. Isomer (-)-kafir 10 a 50 μM snížil proteinovou expresi AKR1C3 o 55,0 % resp. 41,8 % (Obrázek 31).



Obrázek 31 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi AKR1C3 v jaterních řezech z pacientky L48. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kaftrem a (-)-kaftrem 10 μM a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$). Sloupce označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).

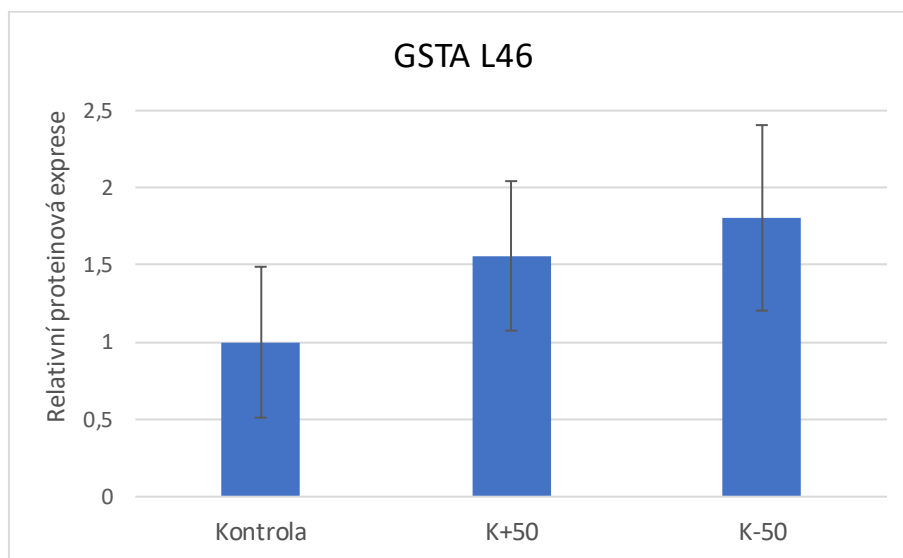
Jaterní řezy pacienta L49 byly inkubovány s oběma isomery v 10 μM (K+10, K+50) a 50 μM (K-10, K-50) koncentraci. Ani jeden isomer kafru nevyvolal statisticky významnou změnu v proteinové expresi enzymu AKR1C3 (Obrázek 32).



Obrázek 32 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi AKR1C3 v jaterních řezech z pacienta L49. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kaftrem a (-)-kaftrem 10 μM a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$).

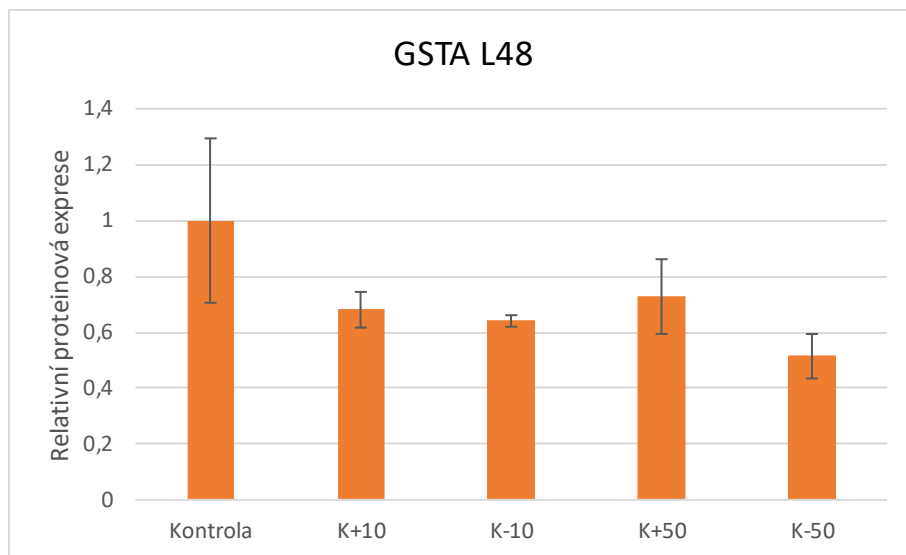
5.1.4 Proteinová exprese GSTA

Jaterní řezy pacienta L46 byly inkubovány s 50 μM (+)-kafrem (K+50) a (-)-kafrem (K-50). Při porovnání vzorků vztažené k hodnotě kontroly lze pozorovat, že relativní proteinová exprese GSTA u tohoto pacienta byla výrazněji zvýšena zejména ve vzorku K-50 až o 80,5 %, vzhledem k velkým směrodatným odchýlkám však nebyla tato změna statisticky významná (Obrázek 33).



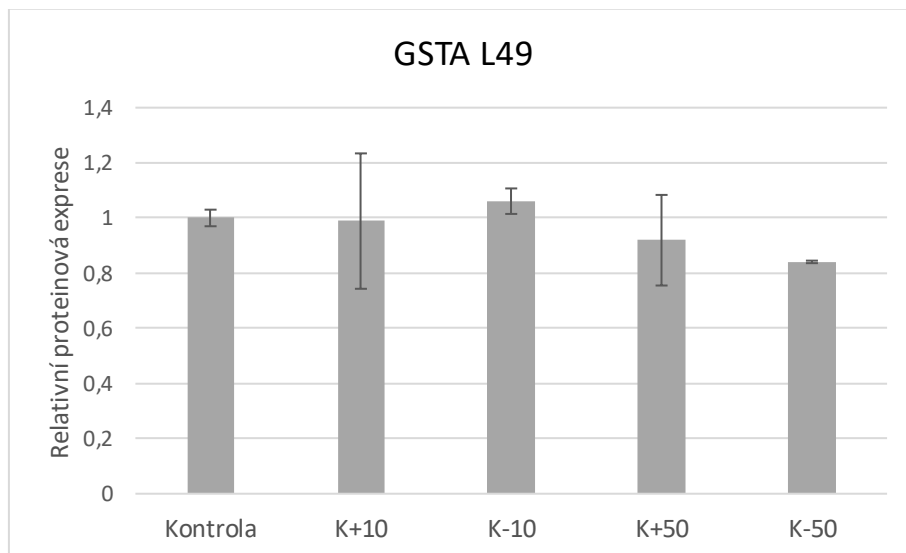
Obrázek 33 Vliv isomerů kafry na proteinovou expresi GSTA v jaterních řezech z pacienta L46. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kafrem a (-)-kafrem 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 4$).

Jaterní řezy pacientky L48 byly inkubovány s 10 a 50 μM (+)-kafrem (K+10, K+50) a (-)-kafrem (K-10, K-50). Při porovnání vzorků vztažené k hodnotě kontroly lze pozorovat, že relativní proteinová exprese GSTA zde byla ve všech vzorcích snížena o 27,2 až 48,6 %. Tento účinek však nebyl statisticky významný (Obrázek 34).



Obrázek 34 Vliv isomerů kofeinu na proteinovou expresi GSTA v jaterních řezech z pacienta L48. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kofeinem a (-)-kofeinem 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 2$).

Jaterní řezy pacienta L49 byly inkubovány s 10 a 50 μM (+)-kofeinem (K+10, K+50) a (-)-kofeinem (K-10, K-50). Ani u jednoho vzorku nedošlo k významné změně v expresi GSTA (Obrázek 35).



Obrázek 35 Vliv isomerů kofeinu na proteinovou expresi GSTA v jaterních řezech z pacienta L49. Jaterní řezy byly inkubovány s (+)-kofeinem a (-)-kofeinem 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Kalnexin sloužil jako kontrola nanášení. Každý sloupec znázorňuje průměr \pm SD ($n = 2$).

5.2 Účinek isomerů kafru na genovou expresi

QPCR jsem využila pro relativní kvantifikaci mRNA celkem deseti biotransformačních enzymů, šest z nich byly zástupci I. fáze a čtyři zástupci II. fáze biotransformace. Konkrétně se jednalo o CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4, CYP2C, NQO1, AKR1C (I. fáze), UGT1A6, SULT1A, GSTA1 a GSTP1 (II. fáze).

Jaterní řezy pacientů jsem inkubovala při 37°C celkem 24 hodin. Jaterní tkáň pacientky L48 a pacienta L49 jsem inkubovala při koncentracích 10 μM a 50 μM s (+)-kafrem (K+10 a K+50) a (-)-kafrem (K-10 a K-50). Řezy pacienta L46 jsem inkubovala s (+)-kafrem a (-)-kafrem pouze v koncentraci 50 μM . Jako kontrolu jsem opět využila 0,1% DMSO.

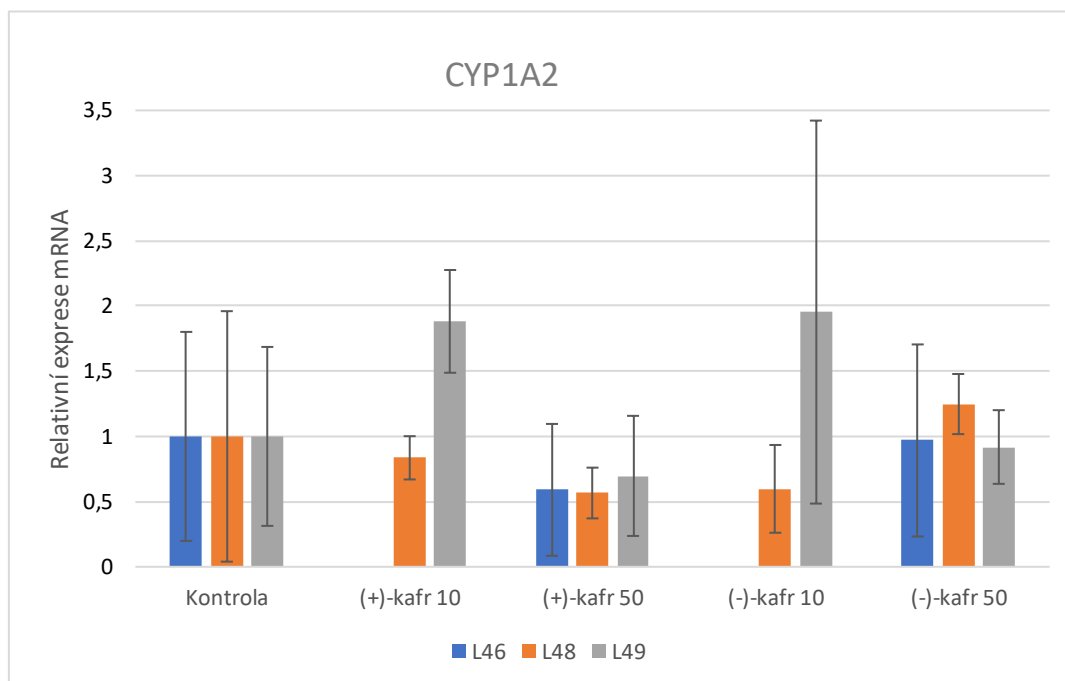
Výsledky jsem vyhodnocovala v programu Microsoft Excel. Ke kvantitativnímu hodnocení jsem potřebovala C_T hodnotu. Tato hodnota vyjadřuje překonání meze detekce (tzv. *threshold*). Čím více se ve vzorku nachází cDNA, tím dřív své meze detekce a exponenciální fáze dosáhne. Výsledné fluorescenční křivky jsem zkontrolovala, správné křivky mají tvar hyperboly. Dále jsem kontrolovala výsledek negativní kontroly. Negativní kontrola (NTC) je kontrola PCR reakce bez přidaného templátu, takže by měla být vždycky negativní. Pomocí NTC jsem se ujistila, že nemám ve vzorcích přítomnost DNA, která by mi vzorky kontaminovala. Zároveň jsem zjistila, jestli použité primery nevytvářejí dimery (Beránek a kol. 2016).

Relativní kvantifikace probíhala pomocí metody $\Delta\Delta C_q$ (Livak a Schmittgen 2001). Hodnotu ΔC_q jsem získala výpočtem $\Delta C_q = C_q^{\text{vzorek}} - C_q^{\text{referenční gen}}$. Nižší hodnota ΔC_q vzorku než referenčního genu znamená, že má vzorek větší expresi (Beránek a kol. 2016). Jako referenční gen jsem použila geometrický průměr SDHA (podjednotka A sukcinátdehydrogenasy) a YWHAZ (tyrosin-3-monooxygenasa/tryptofan-5-monooxygenasa aktivační protein ζ), které byly v programu RefFinder vyhodnoceny jako nejstabilnější. Podjednotka A sukcinátdehydrogenasy je součástí mitochondriálního komplexu II katalyzujícího oxidaci sukcinátu na fumarát a současně dochází k redukci ubichinonu na ubichinol. YWHAZ je 14-3-3 protein zeta, který se zapojuje do signálních drah a je regulátorem apoptotických drah (Zárybnický a kol. 2019)

Kontrole v každé sadě vzorků jsem dala hodnotu 1 a k ní jsem vztahovala hodnoty vzorků.

5.2.1 Genová exprese CYP1A2

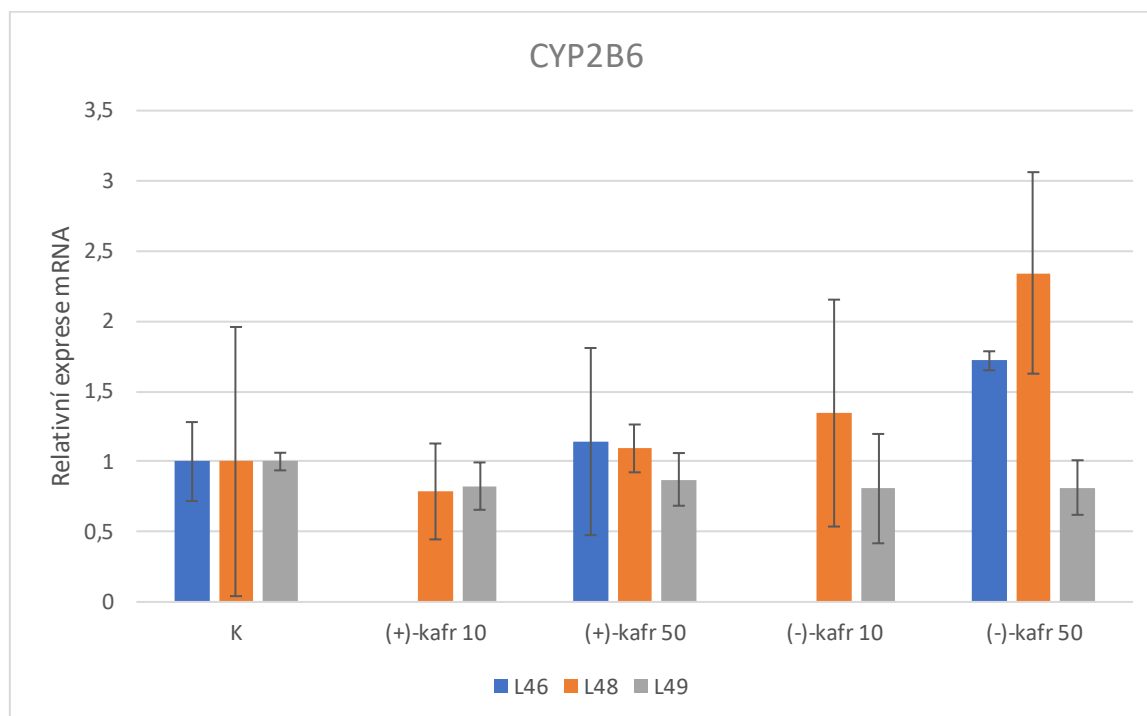
Ani jeden z isomerů kafru nevykazoval výraznější vliv na mRNA expresi CYP1A2 a pozorované změny nebyly díky velkým rozdílům mezi jednotlivými řezy signifikantní. (+)-Kafr 50 μM způsobil pokles exprese CYP1A2 u všech tří pacientů o 30 až 43 %. U pacienta L49 došlo vlivem obou isomerů kafru v 10 μM koncentraci k téměř dvojnásobnému zvýšení exprese CYP1A2 (Obrázek 36).



Obrázek 36 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi CYP1A2 v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ.

5.2.2 Genová exprese CYP2B6

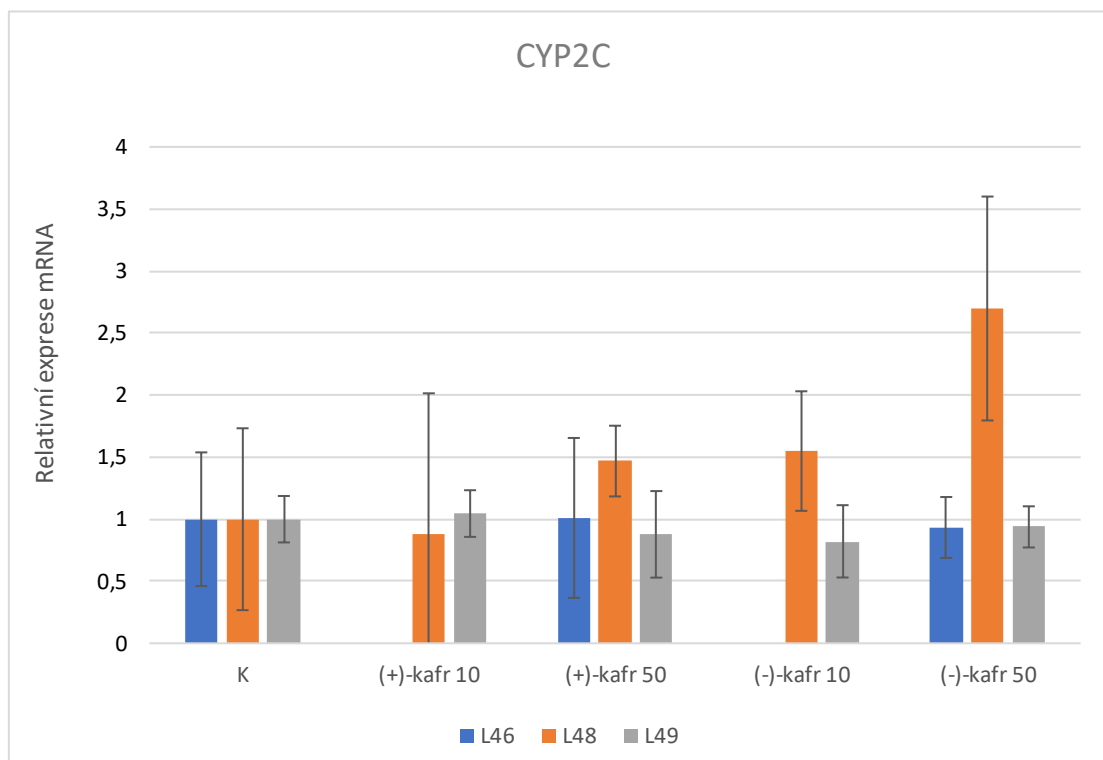
Exprese mRNA CYP2B6 nebyla vlivem isomerů kafru výrazněji ovlivněna ani u jednoho z pacientů. Pouze (-)-kafru 50 μM lze u pacienta L46 a pacientky L48 pozorovat určité zvýšení exprese CYP2B6, které však není signifikantní (Obrázek 37).



Obrázek 37 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi CYP2B6 v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ.

5.2.3 Genová exprese CYP2C

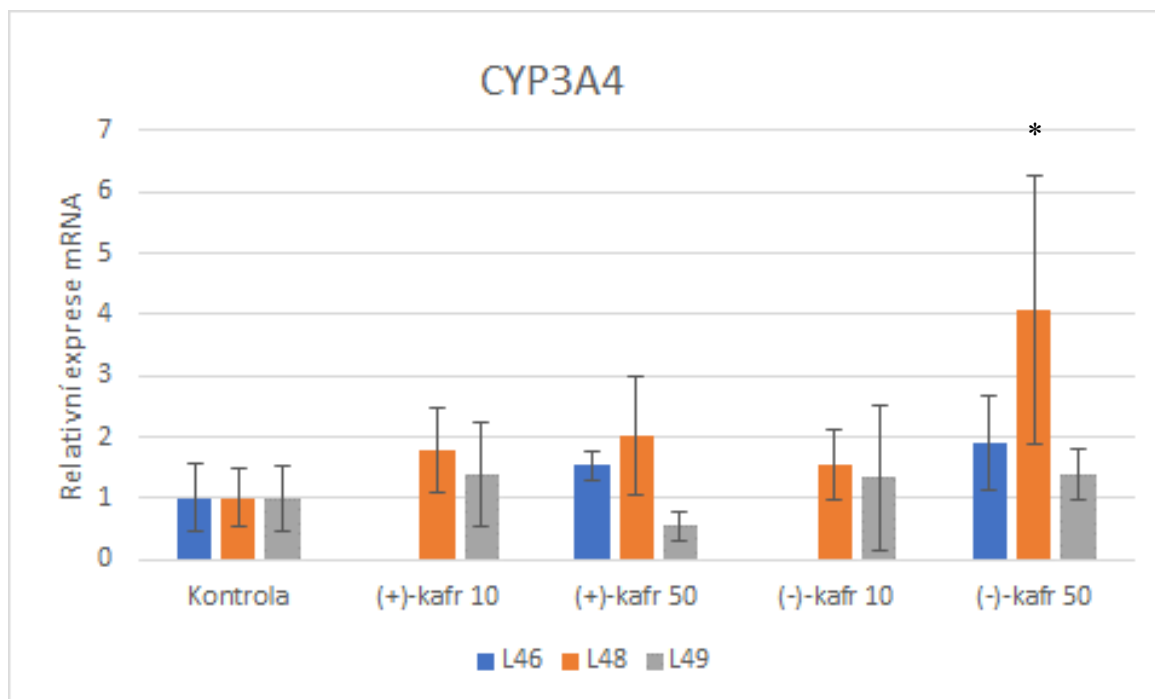
Primer, který jsem použila, je schopný zachytit isoformy 2C8, 2C9, 2C18 a 2C19, tedy všechny čtyři lidské isoformy CYP2C. Genová exprese CYP2C u pacientů L46 a L49 nejevila výrazné signifikantní změny. Nejvýraznější změny jsem pozorovala u pacientky L48, kde došlo k 1,5násobnému zvýšení exprese CYP2C vlivem (+)-kafru 50 μM a (-)-kafru 10 μM a (-)-kafr 50 μM zvýšil jeho expresi 2,7x (Obrázek 38).



Obrázek 38 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi CYP2C v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ.

5.2.4 Genová exprese CYP3A4

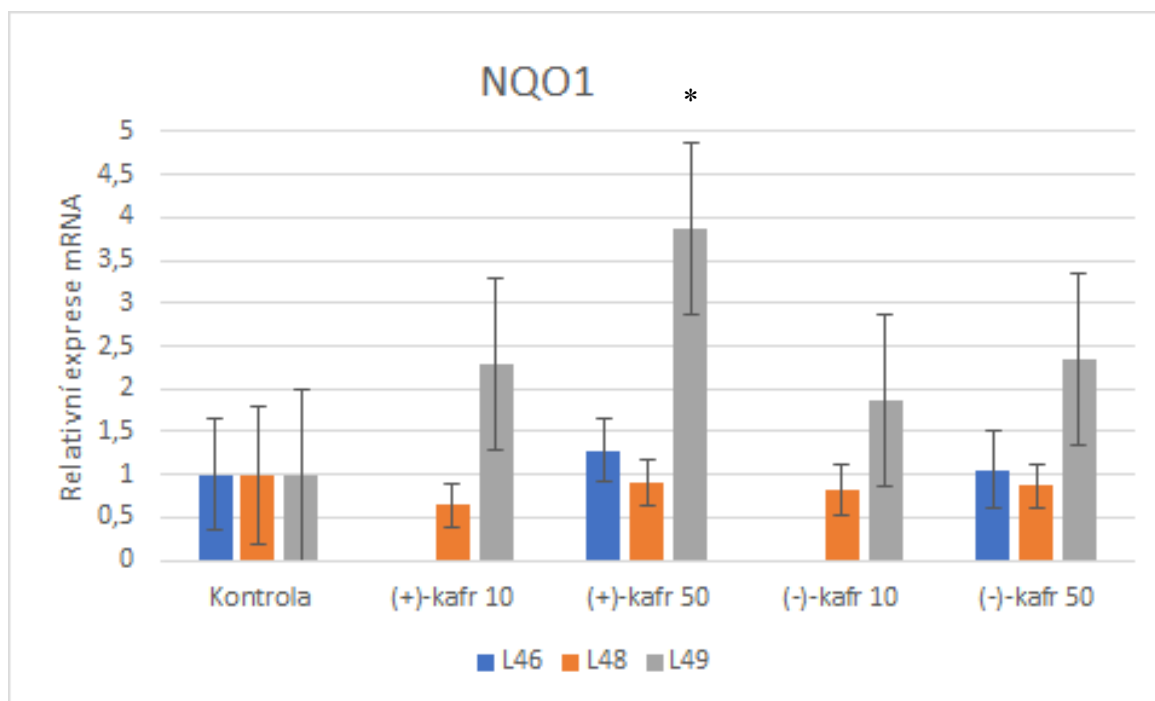
Jediným signifikantním výsledkem bylo čtyřnásobné zvýšení exprese mRNA CYP3A4 u pacientky L48 vlivem 50 μM (-)-kafru. U této pacientky jsem určitou upregulaci v rozmezí 1,5-2,0x pozorovala i v ostatních kafrem ovlivněných vzorcích. Rovněž u pacienta L46 jsem pozorovala zvýšení exprese CYP3A4 vlivem obou isomerů kafru a to 1,5 až 1,9x. V případě pacienta L49 byly pozorované změny jen malé (Obrázek 39).



Obrázek 39 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi CYP3A4 v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ. Sloupce označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).

5.2.5 Genová exprese NQO1

Oba isomery kafru v obou koncentracích způsobily u pacienta L49 zvýšení exprese mRNA NQO1 v rozmezí 1,9x až 3,9x. Nejvýraznější účinek měl (+)-kafr 50 μM . V ostatních jaterních vzorcích jsem žádný vliv kafru na expresi NQO1 nepozorovala (Obrázek 40).

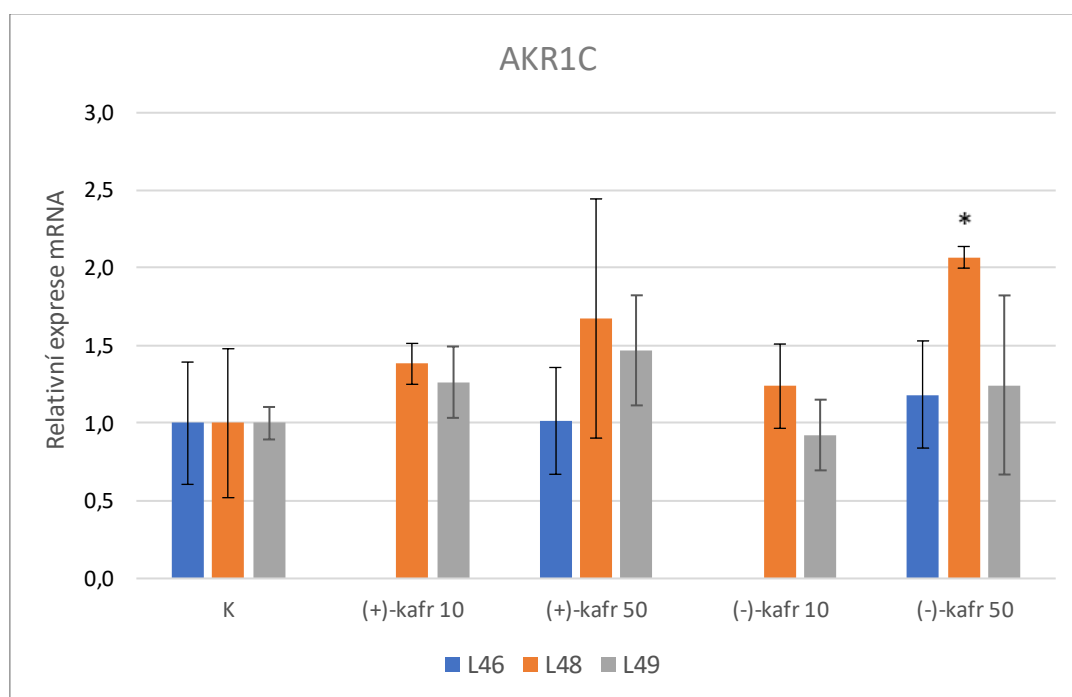


Obrázek 40 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi NQO1 v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ. Sloupce označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).

5.2.6 Genová exprese AKR1C

Použité primery v analýze mRNA amplifikují všechny čtyři lidské isoformy AKR1C, a to AKR1C1-1C4.

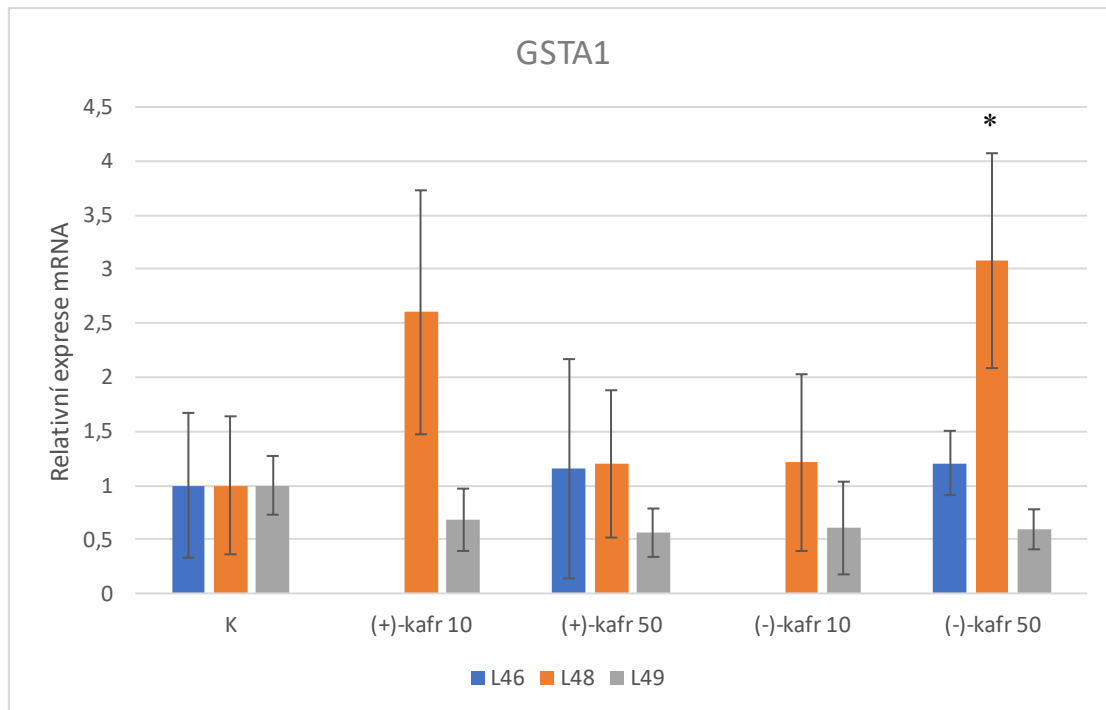
Jediným signifikantním výsledkem bylo 2,1x zvýšení exprese mRNA AKR1C u pacientky L48 vlivem 50 μM (-)-kafru. U této pacientky došlo k 1,4-1,7násobnému zvýšení exprese AKR1C i u ostatních vzorků, ale tyto změny nebyly signifikantní. Rovněž u pacienta L49 jsem pozorovala mírné, ale nesignifikantní zvýšení exprese AKR1C vlivem obou isomerů kafru, a to 1,3-1,5x (Obrázek 41).



*Obrázek 41 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi AKR1C v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ. Sloupce označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).*

5.2.7 Genová exprese GSTA1

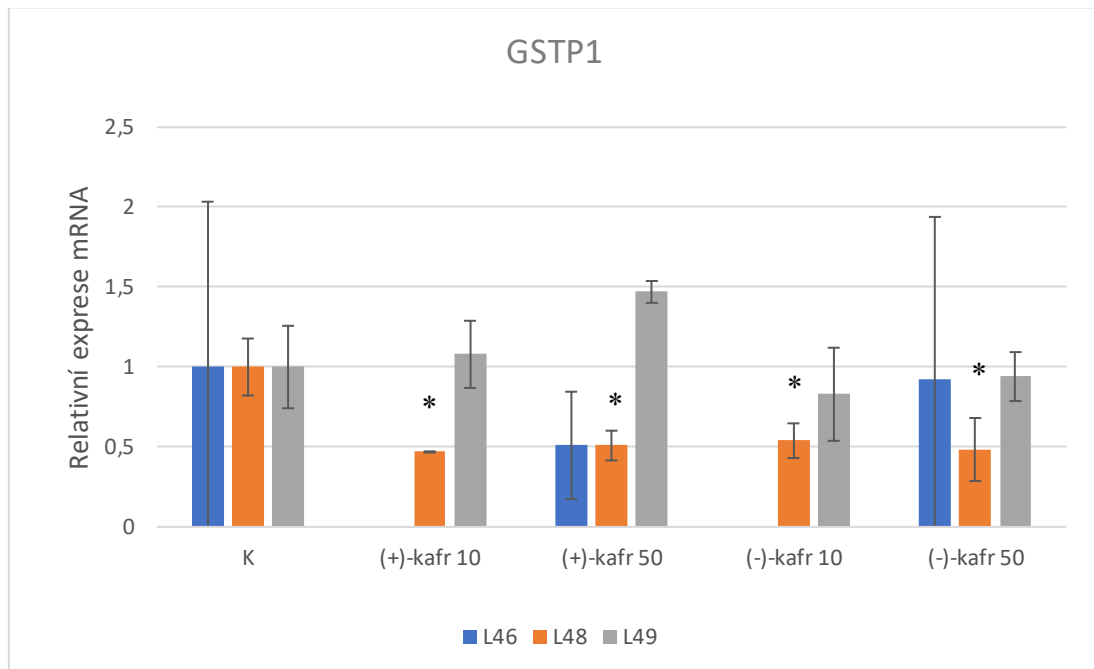
V případě exprese GSTA1 jsem pozorovala u pacientky L48 signifikantní zvýšení vlivem (-)-kafru 50 μM , rovněž (+)-kafr 10 μM vyvolal výrazné zvýšení její mRNA exprese. U pacienta L49 naopak došlo ve všech vzorcích ke snížení mRNA exprese, ale tato změna nebyla signifikantní. Genová exprese GSTA1 u pacienta L46 nebyla kafrem nijak významně ovlivněna (Obrázek 42).



Obrázek 42 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi GSTA1 v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ. Sloupce označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).

5.2.8 Genová exprese GSTP1

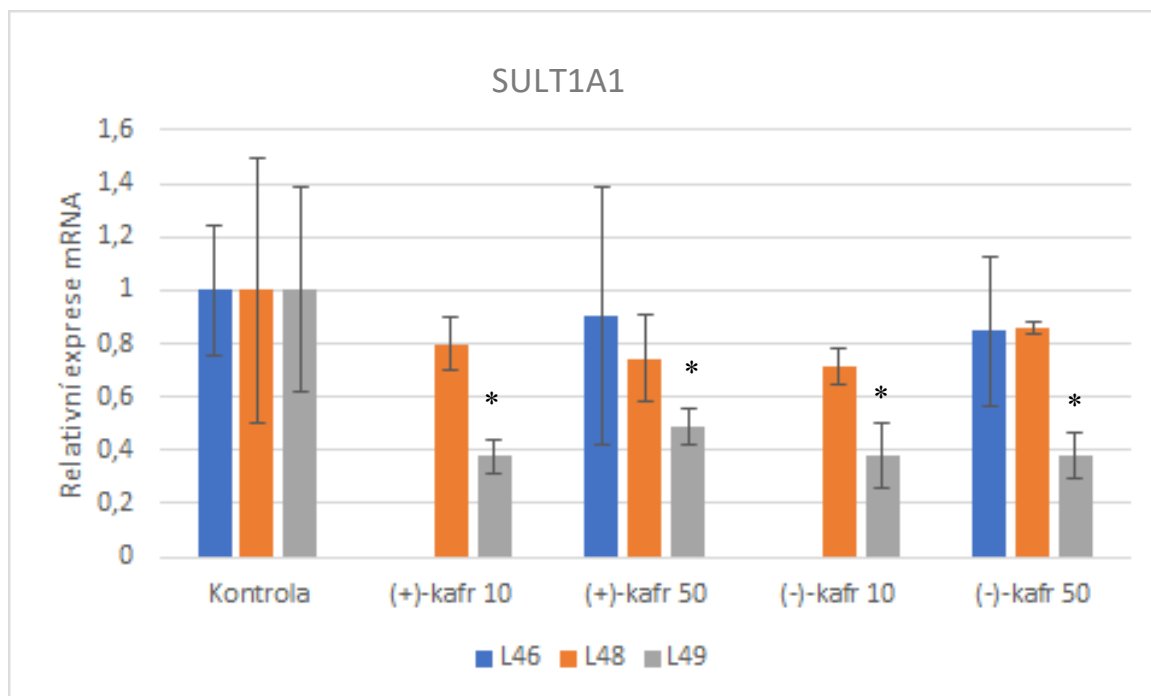
K nejméně výraznější změně exprese GSTP1 došlo vlivem obou isomerů kafru v obou koncentracích u pacientky L48, kde došlo k signifikantnímu poklesu o 46 až 53 % ve srovnání s kontrolou. U ostatních dvou pacientů jsem nepozorovala žádné výrazné změny v expresi GSTP1 (Obrázek 43).



*Obrázek 43 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi GSTP1 v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ. Sloupce označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).*

5.2.9 Genová exprese SULT1A1

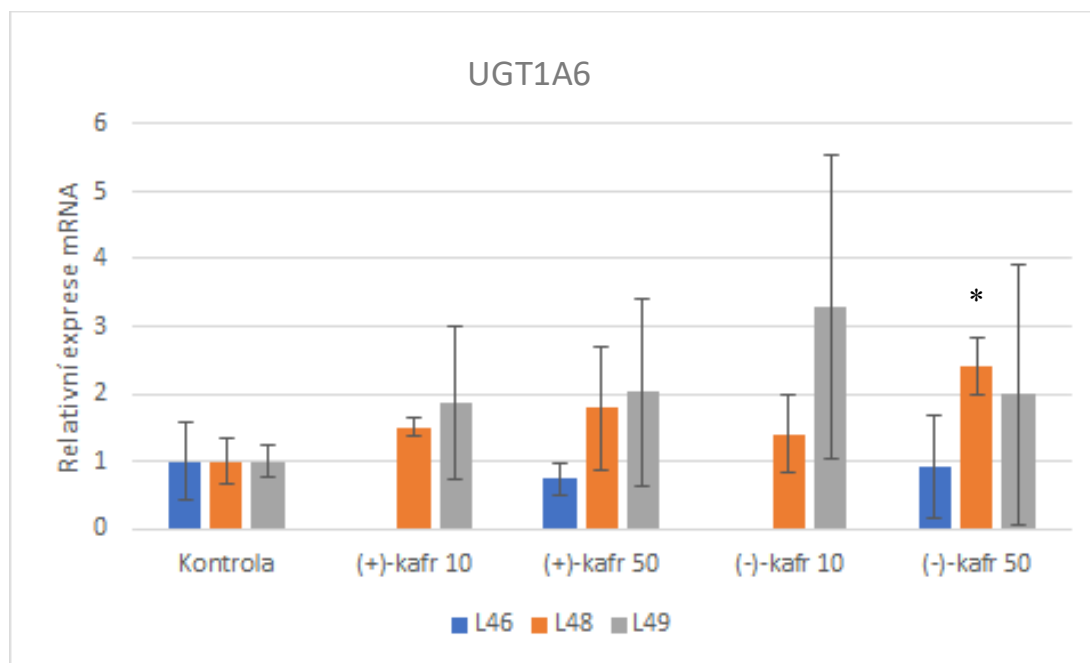
Genová exprese SULT1A1 byla vlivem obou isomerů kafru snížena u všech pacientů, pouze v případě pacienta L49 byl však tento účinek statisticky významný (pokles o 52 až 61 %) (Obrázek 44).



Obrázek 44 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi SULT1A1 v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ. Sloupce označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).

5.2.10 Genová exprese UGT1A6

V případě UGT1A6 jsem pozorovala určité zvýšení exprese u obou isomerů kafru v obou koncentracích u pacientů L48 a L49, statisticky významné zvýšení nastalo v případě pacientky L48 a 50 μM (-)-kafru. U pacienta L46 kafr expresi UGT1A6 neovlivnil (Obrázek 45).



Obrázek 45 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi UGT1A6 v lidských jaterních řezech. Ultratenké lidské jaterní řezy byly inkubovány se studovanými látkami v koncentraci 10 a 50 μM při 37°C po dobu 24 hodin. Každý sloupec představuje průměr ze tří biologických replikátů. Jako referenční gen byl použit geometrický průměr SDHA a YWHAZ. Sloupce označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-hoc testem)

6 DISKUSE

Terapeutické vlastnosti rostlin jsou známy od nepaměti. Dodnes je rostlinnými léčivými přípravky léčena celá řada patologických stavů. V posledních desetiletích došlo k výraznému nárůstu používání léčivých rostlin k podpoře zdraví a léčby nemocí v mnoha zemích světa včetně zemí rozvinutých. Řada rostlinných extraktů je v mnoha vyspělých zemích používána jako léky na předpis. Terapeutický účinek těchto preparátů bývá velmi často podmíněn synergickou činností více druhů rostlinných metabolitů. Ve světě moderní medicíny je všeobecně nejvíce využíváno přípravků vyrobených z jedné či dvou izolovaných účinných látek. Nicméně od použití izolovaných látek se začíná upouštět, jelikož mnohdy mají výrazně nižší účinnost než původní extrakt (Thomford a kol. 2018).

Užívání přírodních produktů má i svá úskalí. V současné době je pro tyto produkty velmi těžké prokázat jejich terapeutické účinky. Důvodem je nedostatek standardizovaných postupů, dále nedostatečné objasnění biologických mechanismů účinku a zřídka jsou u těchto produktů provedeny klinické studie dle odpovídajících standardů. Dalším důvodem může být nedostatečná izolace chemicky čistých produktů a sloučenin, což má za následek odlišné složení přípravků. Technologický pokrok v oblasti vývoje nových analytických a bioinformačních technik, které umožní lepší zpracování přírodních látek, může tuto situaci zlepšit. Pomocí analytických metod, jako jsou superkritická fluidní extrakce, metoda molekulární destilace, technologie membránové extrakce či využití mikrovlnné, ultrazvukové a enzymové extrakce, bylo dosaženo výrazně efektivnější extrakce. K dalšímu rozvoji tohoto odvětví může dojít díky pokrokům v biologickém testování, genomice, proteomice, metabolomice a v automatizaci procesů (Thomford a kol. 2018).

Používání kafru, přírodního produktu získaného ze dřeva stromu *Cinnamomum camphora*, sahá hluboko do historie. V současné době se kafr využívá jako antiseptikum, analgetikum, rubefaciens i jako protizánětlivý přípravek. Kafr se používá obzvláště ve formě přípravků pro lokální užití, kde působí mírným znecitlivujícím účinkem a pocitem tepla spolu s jeho charakteristicky pronikavou svěží vůní. Silná vůně v lidech vyvolává pocit silného účinku. Při nachlazení se hojně využívá jako antitusikum a expektorans. Přípravky kafru a jeho derivátů ve formě nosního dekongestiva stimulují chladové receptory v nose, což vyvolává pocity chladu a zvýšeného proudění vzduchu (Singh a kol 2012).

Všeobecně je doporučováno s přípravky obsahujícími kafr zacházet s opatrností. Intoxikace kafru může způsobit zvracení, bušení srdce, křeče až smrt (Singh a kol 2012). Většina intoxikací kafrem je zcela náhodná nebo je vyvolána nesprávným použitím či dávkováním (Zuccarini 2009). V minulosti došlo u mladých mužů v Íránu k několika otravám kafrem při snaze o snížení sexuálního libida. V íránském lidovém léčitelství se kafr používá jako afrodisiakum i antiafrodisiakum (Rahimi a kol. 2017). Ve studiích zaměřených na podávání kafru Japonským křepelkám se potvrdilo, že se vzrůstající koncentrací kafru u samečků dochází ke zvýšení libida. Zajímavostí zde bylo, že hladina testosteronu byla u nižších dávek kafru vyšší (Sedaghat a kol. 2016). Z jiných studií na myších vyplývá, že hladina testosteronu nebyla nijak významně ovlivněna, došlo však k výraznému snížení hladiny folikuly-stimulujícího hormonu a zvýšení hladiny luteinizačního hormonu (Shahabi a kol. 2014). Při podání vyšších dávek kafru došlo u dospělých samců potkana k nižší diferenciaci a proliferaci spermatocytů, včetně snížené vaskularizace. Při podání nižších dávek bylo viditelné zlepšení sexuálního libida a výkonnosti v důsledku zlepšené funkce varlat. Tyto studie naznačují, že kafr má důležitý význam pro reprodukční systém a může měnit fyziologické a vývojové procesy vedoucí k modifikaci sexuální aktivity (Sedaghat a kol. 2016). Účinky kafru na sexuální výkon mohou být zprostředkovány prostřednictvím účinků na sympatický nervový systém. Kafr specificky inhiboval sekreci katecholaminů blokováním nikotinových receptorů (Jamshidzadeha a kol 2006).

Balzámy a silice obsahující terpeny, zejména kafr, jsou potenciálně toxické. V minulosti byla hlášena řada nežádoucích účinků vyvolaných použitím kafrových produktů u kojenců a malých dětí. Produkty jsou zvláště oblíbené v Kambodži, kde kafrovými výrobky běžně potírají pokožku břicha a hlavy novorozenců a malých dětí. V současné době se přípravky s kafrem nedoporučují používat u dětí mladších 2 let, jelikož zde hrozí riziko náhodného požití a nebezpečí nadměrné absorpce kafru kůží. Pro malé děti je kafr zvláště nebezpečný pro své hepatoneurotoxické účinky. V mezinárodně prodávaných výrobcích může být obsah kafru vyšší než jsou doporučené koncentrace. V této problematice by měla nastat velká osvěta, která by informovala o nežádoucích účincích, zdravotních rizicích a možném úmrtí dětí (Bazzano a kol. 2016).

Oba isomery kafru vykazují různé profily toxicity. Toxicitu u myší vykazuje zejména syntetický kafr. Podání racemické směsi nebo zvláště podání D-kafru i L-kafru u myší vyvolalo shrbený postoj, změny v chování a trnutí těla. Podání D-kafru potkanům a králíkům způsobilo příznaky toxicity. Přírodní forma se prokázala jako netoxická. Také se prokázalo, že u březích

zvířat nedošlo k žádné embryotoxicitě ani jiné reprodukční toxicitě (Zuccarini 2009). Podle jiného výzkumu byla zjištěna přímá korelace mezi množstvím použité dávky a negativním dopadem na dělohu březí myši, což naznačuje negativní dopad na reprodukční zdraví zvířat, které by mohlo podáním vyšších dávek kafru vyvolat potrat (Singh a kol. 2012). Výzkumy zaměřené na účinky kafrové masti odhalilo vliv na pohlavní hormony a gonadotropiny, což způsobilo zpomalené dospívání a snížení hmotnosti orgánů potkanů obou pohlaví (Sedaghat a kol. 2016).

Dle zmíněných výsledků se studie v mnohých závěrech velmi liší. V některých studiích byly použity deriváty kafru, v jiných čistý kafr v 10% ethanolu či jiných rozpouštědlech. Z tohoto poznatku vyplývá, že studie mohly být ovlivněny druhem použitého kafru a typem rozpouštědla (Shahabi a kol. 2014).

Metabolismus kafru byl studován u samic albinotických myší typu Swiss, u kterých v játrech způsobil významné zvýšení aktivity cytochromu P450, cytochromu b5, arylhydroxylasy a glutathion-S-transferasy. Dále došlo k inhibici mitochondriálního dýchání. Toho by se v budoucnu mohlo využít při radioterapii nádorů, ve které by kafr byl používán jako látka s radiosensitizačním potenciálem (Singh a kol. 2012).

Kafr moduluje aktivity jaterních enzymů účastnících se metabolismu léčiv (Singh a kol. 2012). Moje diplomová práce byla zaměřena na studium vlivu isomerů kafru na proteinovou a mRNA expresi vybraných enzymů I. a II. fáze biotransformace léčiv. Metodou RT-qPCR jsem stanovila mRNA expresi AKR1C, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4, NQO1, SULT1A1, UGT1A6, GSTA1 a GSTP1. Metodou western blot jsem stanovila proteinovou expresi enzymů CYP3A4, CYP2C, AKR1C3 a GSTA.

Při stanovení exprese mRNA CYP3A4 jsem nejvýznamnější účinek zaznamenala u pacientky L48, kde došlo vlivem (-)-kafru 50 μ M ke zvýšení exprese 3,98x. Proteinová exprese se u tohoto vzorku nelišila od kontroly. U ostatních vzorků pacientky L48 jsem rovněž pozorovala vyšší, ale ne signifikantní, mRNA expresi CYP3A4. V případě (+)-kafru 10 μ M byla exprese 1,66x vyšší a u 50 μ M dosahovala hodnoty 1,83x vyšší. Zvýšení relativní proteinové exprese CYP3A4 u obou koncentrací (+)-kafru se pomocí western blotu potvrdilo (zvýšení o 57 resp. 62 %). U pacienta L49 nebyla genová exprese nijak signifikantně ovlivněná. Stejně tak i při stanovení relativní proteinové exprese pacienta L49 zde bylo jen nepatrné zvýšení u (+)-kafru. U pacienta L46 nastalo zvýšení genové exprese u obou isomerů kafru, které však nebylo signifikantní a nebylo potvrzeno na úrovni proteinu.

Expres mRNA CYP1A2, CYP2B6 a CYP2C nebyla isomery kafru výrazněji ovlivněna ani u jednoho pacienta. Relativní proteinová exprese CYP2C byla u pacientky L48 signifikantně snižena, obzvláště (+)-kafr 50 μ M snížil jeho expresi na pouhých 15,8 %. Signifikantní snížení na 25,3 % resp. 45,3 % kontroly nastalo u (-)-kafru 10 μ M a 50 μ M. U pacientů L46 a L49 nedošlo k výraznému ovlivnění proteinové exprese CYP2C.

Nejvýznamnější isoformou CYP, která se podílí na metabolismu (-)-kafru, je CYP2A6, jak bylo zjištěno ve studii s lidskými jaterními mikrosomy. Další isoformy CYP (tj. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) aktivitu vůči (-)-kafru nevykazovaly. Pomocí GC-MS byl stanovován produkt 5-exohydroxykafr (Gyoubu a kol. 2007).

Expres mRNA NQO1, enzymu I. fáze biotransformace, došlo ke zvýšení všech vzorků pouze u pacienta L49 v rozmezí 1,9x až 3,9x. Signifikantní byl pouze účinek (+)-kafru 50 μ M. Fyziologicky NQO1 chrání buňky před různými druhy cytotoxických chinonů a oxidačním stresem, katalyzuje redukci a detoxikaci chinonových substrátů a chrání buňky před karcinogeny. Nadměrná exprese NQO1 je spojena se špatnou prognózou nádorových onemocnění. Mezi nejčastější choroby s upregulací NQO1 patří kolorektální karcinom, nádorové onemocnění plic, srdce, pankreatu či žaludku, melanom či cholangiokarcinom (Oh a kol. 2016).

Při I. fázi biotransformace se redukčními mechanismy uplatňují enzymy zvané reduktasy. V přítomnosti NADPH-reduktasy katalyzují přeměnu sloučenin obsahujících karbonylovou skupinu, jimiž jsou aldehydy nebo ketony. Reduktasy jsou exprimovány ve více druzích lidských tkáních a dále se účastní metabolismu hormonů, apoptózy, mutageneze či karcinogeneze. Z tohoto důvodu mohou změny v expresi reduktas modulovat riziko rozvoje nádorových onemocnění. Jednou z hlavních skupin reduktas jsou aldo-ketoreduktasy (AKR). AKR1 je největší rodinou a je rozdělena do různých podrodin včetně AKR1C jako hlavní podrodiny. U člověka se vyskytují celkem čtyři isoformy AKR1C, jsou jimi AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR1C4 (Alshogran 2017). Stanovením genové exprese mRNA AKR1C všech čtyř lidských isoform jsem zaznamenala všeobecně zvýšenou aktivitu téměř u každého vzorku jaterních řezů. U pacientky L48 došlo vlivem (-)-kafru 50 μ M ke zvýšení mRNA 2,1x, zatímco proteinová exprese byla u této pacientky vlivem (-)-kafru 10 μ M a 50 μ M a (+)-kafru 50 μ M snížena o 41,8 až 65,0 %. Významné snížení proteinové exprese o 50,9 % jsem pozorovala i u pacienta L46 vlivem (-)-kafru 50 μ M.

Stanovení enzymů II fáze biotransformace jsem provedla u enzymu SULT1A1, GSTA1 a GSTP1 a UGT1A6. Genovou expresi jsem stanovila u všech jmenovaných enzymů. Technikou western blotu jsem stanovila relativní proteinovou expresi pouze u GSTA. Nejvyšší zvýšení exprese mRNA enzymu GSTA1 jsem zaznamenala u (-)-kafru 50 μ M (3,1x vyšší) a (+)-kafru 10 μ M (2,6x vyšší). Proteinová exprese GSTA nebyla vlivem kafru výrazněji ovlivněna. Ve stanovení genové exprese enzymu GSTP1 jsem zaznamenala snížení exprese u všech vzorků pacientky L48. Nepatrné zvýšení, statisticky nevýznamné, bylo u pacienta L49 u obou koncentrací (+)-kafru. Exprese mRNA UGT1A6 u pacientky L48 byla vlivem (-)-kafru 50 μ M signifikantně zvýšena. U genové exprese SULT1A1 jsem zaznamenala pokles pacienta L49 u obou koncentrací obou isomerů kafru. U ostatních pacientů nedošlo k výraznému zvýšení či snížení exprese enzymu.

Výskyt nedokonalé korelace mezi hladinami mRNA a proteinem může nastat v důsledku důvodů technických při provádění analýzy nebo důvodů biologických (posttranskripční regulace) (Buccitelli a kol. 2020). Získání reprodukovatelných výsledků SDS-PAGE je technicky náročné a často jej doprovází komplikace při porovnávání gelů se vzorky připravenými za podobných podmínek (Maier a kol. 2009). Pro srovnávání exprese enzymů se hojně využívá imunologická proteinová kvantifikace, nicméně ta trpí velmi špatnou reprodukovatelností a specificitou. Problémy týkající se blotové techniky mohou být ve specificitě protilátek nebo kvalitě referenčních proteinů. Sama ze zkušeností při vypracování praktické části diplomové práce mohu potvrdit, že blotová technika je opravdu náročná metodika, při které i drobná chyba velmi snadno ovlivní výsledek (Drozdik a kol. 2017). Změny v genové expresi nemusí zcela způsobit změny v expresi proteinové, tudíž stanovením mRNA nelze určit hladinu proteinu (Buccitelli a kol. 2020). Riziku nesprávné interpretace by se dalo předejít porovnáním spárovaných vzorků jednoho pacienta enzymové exprese v játrech a ve střevech (Drozdik a kol. 2017).

Dále mezi pacienty dochází k podstatné interindividuální variabilitě exprese enzymů. Proto je třeba brát při hodnocení výsledků tuto problematiku v potaz (Drozdik a kol. 2017). Některé dědičné změny ve funkci genů nejsou založeny pouze na změně v sekvenci DNA, ale i na epigenetických změnách. Důležitými epigenetickými mechanismy jsou methylace DNA a modifikace histonů. Epigenetické změny se mohou vyskytovat v genech kódujících regulační mechanismy tzv. mikroRNA (miRNA). Epigenetické vzorce jsou v zásadě reverzibilní a mohou být tkáňově specifické a ovlivněné faktory jako je pohlaví, věk či prostředí, ve kterém se jedinec vyskytuje (Zanger a kol. 2013).

7 ZÁVĚR

Dosažené výsledky v mé diplomové práci lze shrnout následovně:

Pro praktickou část diplomové práce jsem připravila ultratenké jaterní řezy celkem ze tří pacientů, dvou mužů a jedné ženy. Jaterní řezy pacientů L48 a L49 jsem inkubovala v přítomnosti 10 μM a 50 μM (-)-kafru a (+)-kafru nebo 0,1% DMSO (kontrola). Pro nedostatek jaterní tkáň jsem jaterní řezy z pacienta L46 inkubovala pouze s 50 μM (-)-kafrem a (+)-kafrem. Inkubace probíhala 24 hodin při 37°C.

Stanovení relativní proteinové exprese enzymů CYP3A4, CYP2C, AKR1C3 a GSTA jsem prováděla pomocí western blottingu. K nejvýznamnějším změnám na úrovni proteinu došlo u pacientky L48, kde došlo vlivem (+)-kafru 10 a 50 μM ke zvýšení exprese CYP3A4 a ke snížení exprese CYP2C a AKR1C3 vlivem (+)-kafru 50 μM , (-)-kafru 10 a 50 μM . U pacienta L46 došlo ke snížení exprese AKR1C3 vlivem (-)-kafru 50 μM .

Stanovení exprese mRNA jsem provedla u enzymů AKR1C, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4, NQO1, SULT1A1, UGT1A6, GSTA1 a GSTP1. (-)-Kafr 50 μM způsobil u pacientky L48 signifikantní indukci CYP3A4, AKR1C, GSTA, UGT1A6. U pacienta L49 došlo vlivem (+)-kafru 50 μM k indukci NQO1. Naproti tomu oba isomery kafru v obou koncentracích vyvolaly signifikantní snížení exprese mRNA GSTP1 (L48) a SULT1A1 (L49).

8 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|----------------|--|
| AA | akrylamid |
| Acetoacyl-CoA | acetoacylkoenzym A |
| Acetyl-CoA | acetylkoenzym A |
| AKR | aldo-ketoreduktasa |
| ALP | alkalická fosfatasa |
| ALT | alaninaminotransferasa |
| APS | persíran amonný |
| AST | aspartátaminotransferasa |
| BCA | kyselina bicinchoninová |
| bisAA | bis-akrylamid |
| BSA | hovězí sérový albumin |
| cDNA | komplementární deoxyribonukleasa |
| C _T | threshold cycle |
| CYP | cytochrom P450 |
| DEPC | diethylpyrokarbonát |
| DMAPP | dimethylallyl-difosfát |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DNAsa | deoxyribonukleasa |
| dNTPs | deoxynukleotidy |
| DTT | dithiotreitol |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| EGTA | ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová kyselina |

| | |
|----------|--|
| F | forward |
| GPP | geranyldifosfát |
| GSH | glutathion |
| GST | glutathion-S-transferasa |
| HEPES | (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina |
| HMG-CoA | (3S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA |
| IPP | isopentenylidifosfátu |
| LPP | linalyldifosfát |
| mRNA | mediátorová ribonukleová kyselina |
| NQO | NAD(P)H: chinon oxidoreduktása |
| NTC | no template control |
| PCR | polymerasová řetězová reakce |
| PMSF | fenylmethylsulfonylfluorid |
| qPCR | kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase |
| R | reverse |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RNasa | ribonukleasa |
| rpm | otáčky za minutu |
| RT | reverzní transkriptasa, reverzní transkripce |
| RT-qPCR | kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí |
| SD | směrodatná odchylka |
| SDHA | sukcinátdehydrogenasa, podjednotka A |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným |

| | |
|-------|---|
| SULT | sulfotransferasa |
| TBS | solný roztok pufovaný Tris |
| TBST | solný roztok pufovaný Tris + Tween 20 |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UGT | UDP-glukuronosyltransferasa |
| UV | ultrafialové záření |
| YWHAZ | tyrosin-3-monooxygenasa/tryptofan-5-monooxygenasa aktivační protein ζ |

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 Biosyntéza isopentenylidifosfátu | 10 |
| Obrázek 2 Konverze mevalonátu | 11 |
| Obrázek 3 Monoterpeny a jejich deriváty | 13 |
| Obrázek 4 Chemický vzorec kafru | 16 |
| Obrázek 5 Cinammomum camphora..... | 17 |
| Obrázek 6 Graf ukazující expresi různých isoformů cytochromu P450 v játrech člověka. | 22 |
| Obrázek 7 Stanovení ALT..... | 30 |
| Obrázek 8 Stanovení AST..... | 30 |
| Obrázek 9 Metabolity D-kafru | 32 |
| Obrázek 10 Princip stanovení bílkoviny metodou s BCA | 45 |
| Obrázek 11 Kalibrační křivka stanovení BCA..... | 47 |
| Obrázek 12 Polymerace separačního gelu převrstveného isobutanolem | 50 |
| Obrázek 13 Probíhající elektroforéza zasypaná ledem | 52 |
| Obrázek 14 Účinnost separace v gelech o různé porozitě..... | 53 |
| Obrázek 15 Schéma imunodetekce | 54 |
| Obrázek 16 Vyroběný blot pro stanovení GSTA z 12,5% gelu | 56 |
| Obrázek 17 Ukázka stříhání blotů..... | 57 |
| Obrázek 18 Zjednodušené schéma izolace RNA s Trizolem..... | 61 |
| Obrázek 19 Přepipetování horní fáze s RNA, pipetování isopropanolu | 62 |
| Obrázek 20 Ukázková křivka při měření analyzátozem Nanodrop | 63 |
| Obrázek 21 Kontrola průběhu fluorescenčních křivek při analýze qPCR | 71 |
| Obrázek 22 Fluorescenční křivky qPCR..... | 71 |
| Obrázek 23 Ukázka skenování blotu stanovení GSTA pacientky L48..... | 73 |
| Obrázek 24 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP3A4 pacienta L46..... | 74 |
| Obrázek 25 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP3A4 pacientky L48..... | 75 |
| Obrázek 26 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP3A4 pacienta L49..... | 75 |
| Obrázek 27 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP2C pacienta L46 | 76 |
| Obrázek 28 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP2C pacientky L48..... | 77 |
| Obrázek 29 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi CYP2C pacienta L49..... | 77 |
| Obrázek 30 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi AKR1C3 pacienta L46..... | 78 |
| Obrázek 31 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi AKR1C3 pacientky L48..... | 79 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 32 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi AKR1C3 pacienta L49..... | 79 |
| Obrázek 33 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi GSTA pacienta L46 | 80 |
| Obrázek 34 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi GSTA pacienta L48..... | 81 |
| Obrázek 35 Vliv isomerů kafru na proteinovou expresi GSTA pacienta L49 | 81 |
| Obrázek 36 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi CYP1A2..... | 83 |
| Obrázek 37 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi CYP2B6..... | 84 |
| Obrázek 38 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi CYP2C..... | 85 |
| Obrázek 39 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi CYP3A4..... | 86 |
| Obrázek 40 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi NQO1..... | 87 |
| Obrázek 41 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi AKR1C | 88 |
| Obrázek 42 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi GSTA1..... | 89 |
| Obrázek 43 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi GSTP1 | 90 |
| Obrázek 44 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi SULT1A1 | 91 |
| Obrázek 45 Vliv isomerů kafru na mRNA expresi UGT1A6 | 92 |

10 SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Klasifikace terpenů podle počtu isoprenových jednotek a příklady zástupců..... | 10 |
| Tabulka 2 Informace o pacientech | 35 |
| Tabulka 3 Složení 10x koncentrovaného Krebs-Henseleitova pufru..... | 40 |
| Tabulka 4 Finální roztok Krebs-Henseleitova pufru..... | 41 |
| Tabulka 5 Kultivační Williamsovo medium E suplementovné glutaMaxem | 41 |
| Tabulka 6 Složení 4x SDS vzorkového pufru..... | 43 |
| Tabulka 7 Složení lyzačního pufru..... | 44 |
| Tabulka 8 Příprava roztoků pro sestrojení kalibrační přímky | 46 |
| Tabulka 9 Příprava separačního gelu | 50 |
| Tabulka 10 Příprava zaostřovacího gelu | 51 |
| Tabulka 11 Příprava mastermixu pro reversní transkripci | 66 |
| Tabulka 12 Sekvence použitých primerů | 69 |
| Tabulka 13 Příprava mastermixu na qPCR | 70 |

11 POUŽITÁ LITERATURA

AGUILAR, F., AUTRUP, H. a BARLOW, S. a kol. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the European Commission on Coumarin in flavourings and other food ingredients with flavouring properties. *European Food Safety Authority*. 2008.

ALMAZROO, O. A., MIAH, M. K. a VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease*. 2017, 21(1), 1-20. DOI:10.1016/j.cld.2016.08.001.

ALSHOGRAN, O. Y. Pharmacogenetics of aldo-keto reductase 1C (AKR1C) enzymes. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2017, 13(10), 1063–1073. DOI:10.1080/17425255.2017.1376648

AL-TAWEEL, A. a PERVEEN, S. Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. *IntechOpen* [online]. 2018, [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: <<https://www.intechopen.com/books/terpenes-and-terpenoids/introductory-chapter-terpenes-and-terpenoids>>. DOI:10.5772/intechopen.79683.

BACHMAN, J. Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*. 2013, 67–74. DOI:10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6.

BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Vyd 2. Praha: Grada publishing, 2011. ISBN 987-80-247-3533-7.

BAZZANO, A. N., VAR, C., GROSSMAN, F. a kol. Use of Camphor and Essential Oil Balms for Infants in Cambodia. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2016, 63(1), 65-69. DOI:10.1093/tropej/fmw013.

BERÁNEK, M. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3246-9.

BERÁNEK, M., FIALA, Z., KREMLÁČEK, J. a kol. Technologie digitální PCR pro vyšetření delečního polymorfismu v genu GSTM1. *Chemické Listy*. 2016, 110, 655-657.

BERÁNEK, M., TICHÝ, M. a kol. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program zdravotnická bioanalytika*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2013, 58-59. ISBN 978-80-246-2186-9.

BORGES, R. S., ORTIZ, B. L. S. a PEREIRA, A. C. M. a kol. Rosmarinus officinalis Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018. DOI:10.1016/j.jep.2018.09.038.

BOUŠOVÁ, I. a SKÁLOVÁ, L. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metabolism Reviews*. 2012, 44(4), 267–286. DOI:10.3109/03602532.2012.713969.

BROEKMAN, M. M. T. J., BOS, C., TE MORSCHE, R. H. M. a kol. GST Theta null genotype is associated with an increased risk for ulcerative colitis: a case–control study and meta-analysis of GST Mu and GST Theta polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Journal of Human Genetics*. 2014, 59(10), 575–580. DOI:10.1038/jhg.2014.77.

BRUNELLE, J. L. a GREEN, R. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*. 2014, 151-159. DOI:10.1016/b978-0-12-420119-4.00012-4.

CIKOŠ, A-M., MLADENKA, J., ČOŽ-RAKOVAC, R. a kol. Update on Monoterpenes from Red Macroalgae: Isolation, Analysis, and Bioactivity. *Marine drugs*. 2019, 17(537). DOI:10.3390/md17090537.

COUGHTRIE, M.W.H. Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (SULT) family. *Chemico-Biological Interactions*. 2016. DOI:10.1016/j.cbi.2016.05.005 0009-2797.

CROOM, E. Metabolism of xenobiotics of human environments. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012, (112), 31-88. DOI:10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9.

DE GRAAF, I., A., M., OLINGA, P. a DE JAGER, M., H. a kol. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies: 5(9). *Nature Protocols*. 2010, 5(9), 1540–1551. DOI:10.1038/nprot.2010.111.

DOSTÁLEK, M. a kol. *Farmakokinetika*. Praha: Grada publishing, 2006. ISBN 80-247-1464-7.

DROZDZIK, M., BUSCH, D., LAPCZUK, J. a kol. Protein Abundance of Clinically Relevant Drug-Metabolizing Enzymes in the Human Liver and Intestine: A Comparative Analysis in Paired Tissue Specimens. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2017. DOI:10.1002/cpt.967.

DVOŘÁKOVÁ, M., VALTEROVÁ, I. a VANĚK, T. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické Listy*. 2011, (105), 839-845.

FOTI, R. S. a DEEPAK, K. D. Cytochrome P450 and Non-Cytochrome P450 Oxidative Metabolism: Contributions to the Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of Xenobiotics. *Drug metabolism and disposition*. 2016, (44), 1229–1245. DOI:10.1124/dmd.116.071753.

GALLAGHER, S. R. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Cell Biology*. 2007, 37(1), 6.1.1–6.1.38. DOI:10.1002/0471143030.cb0601s37.

GORDON, P. a KHOJASTEH, S. C. A decades-long investigation of acute metabolism-based hepatotoxicity by herbal constituents: a case study of pennyroyal oil. *Drug Metabolism Reviews*. 2014, 47, 12–20. DOI:10.3109/03602532.2014.990032.

GYOUBU, K. a MIYAZAWA. In Vitro Metabolism of (-)-Camphor Using Human Liver Microsomes and CYP2A6. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007, 30(2), 230-233. DOI:10.1248/bpb.30.230.

HIRT, M., VOREL, F. a kol. *Soudní lékařství II.díl*. Praha: Grada publishing, 2016. ISBN 978-80-271-9468-1.

HONGLING, S., YUNSHAN, C. a JING, L. a kol. GST null polymorphisms may affect the risk of coronary artery disease: evidence from a meta-analysis. *Thrombosis journal*. 2020, 18(20). DOI:10.1186/s12959-020-00234-x.

HU, D. G., MACKENZIE, P. I., MCKINNON, R. A. a kol. Genetic polymorphisms of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) genes and cancer risk. *Drug Metabolism Reviews*. 2016, 48(1), 47–69. DOI:10.3109/03602532.2015.1131292.

CHEN, B.-H., WANG, C.-C. a HOU, Y.-H. a kol. Mechanism of sulfotransferase pharmacogenetics in altered xenobiotic metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2015, 11(7), 1053–1071. DOI:10.1517/17425255.2015.1045486.

CHIU, C.C., KEELING, C.I a BOHLMANN, J. Toxicity of Pine Monoterpenes to Mountain Pine Beetle. *Scientific Reports*. 2017, 7(8858). DOI:10.1038/s41598-017-08983-y.

JAMSHIDZADEHA, A., SAJEDIANFARDB, J., NEKOOEIANC, A. A. a kol. Effects of Camphor on Sexual Behaviors in Male Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, 2(4), 209-214.

KLUSEK, J., GŁUSZEK, S. a KLUSEK, J. Review GST genes polymorphisms and the risk of colorectal cancer development. *Współczesna Onkologia*. 2014, (4), 219–221. DOI:10.5114/wo.2014.41388.

KODAMA, S. a NEGISHI, M. Sulfotransferase genes: Regulation by nuclear receptors in response to xeno/endo-biotics. *Drug Metabolism Reviews*. 2013, 45(4), 441–449. DOI:10.3109/03602532.2013.835630.

KOUSALOVÁ, L., BARANOVÁ, J. a ANZENBACHER, P. Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klinická Farmakologie a Farmacie*. 2003, 17, 151–157.

KURIEN, B. T. a SCOFIELD, R. H. Extraction of proteins from gels—A brief review. *Methods in Molecular Biology*. 2012, (869), 403–405. DOI:10.1007/978-1-61779-821-4_33.

KURIEN, B. T. a SCOFIELD, R. H. Western Blotting: An Introduction. *Western Blotting*. 2015, 17–30. DOI:10.1007/978-1-4939-2694-7_5.

LIVAK, K. J. a SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001, 25(4), 402–408. DOI:10.1006/meth.2001.1262.

LYNCH, T. a PRICE, A. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *American Family Physician*. 2007, 76(3), 391–396.

MAIER, T., GÜELL, M. a SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*. 2009, 583(24), 3966–3973. DOI:10.1016/j.febslet.2009.10.036.

MANSOUR, A.A., SALEH, O.M., ASKAR, T. a kol. Frequency of glutathione-S-transferase null-M1 and null-T1 genotypes among the Turabah population in Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*. 2015, 14(4), 16863–16871. DOI:10.4238/2015.December.14.13.

MCMURRY, J. *Organická chemie*. Vysoké učení technické v Brně: VUTIUM, 2007, 197–198; 1035–1045. ISBN 978-80-214-3291-8.

MEECH, R., HU, D. G., MCKINNON, R. A. a kol. The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. *Physiological Reviews*. 2019, 99(2), 1153–1222. DOI:10.1152/physrev.00058.2017.

MOREHOUSE, B.R., KUMAR, R.P., MATOS J.O., a kol. Direct Evidence of an Enzyme-Generated LPP Intermediate in (+)-Limonene Synthase Using a Fluorinated GPP Substrate Analog. *ACS chemical biology*. 2019, (14), 2035–2043. DOI:10.1021/acscchembio.9b00514.

NAGATA, K. a YAMAZOE, Y. Pharmacogenetics of Sulfotransferase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2000, 40(1), 159–176. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.159.

OH, E.-T., KIM, J., KIM, J. M. a kol. NQO1 Inhibits proteasome-mediated degradation of HIF-1 α . *Nature Communications*. 2016, 7(13593).DOI:10.1038/ncomms13593.

OTIENO, B. A., KRAUSE, C. E. a RUSLING, J. F. Bioconjugation of Antibodies and Enzyme Labels onto Magnetic Beads. *Methods in Enzymology*. 2016, 571, 135-150. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.10.005.

PASKA, C, BARTA I. a DROZDOVSZKY O. a kol. Elimination of bacterial DNA during RNA isolation from sputum: Bashing bead vortexing is preferable over prolonged DNase treatment. *PLoS ONE*. 2019, 14(3). DOI:10.1371/ journal.pone.0214609.

PRICE, R. J., BALL, S. E., a ENWICK, A. B. a kol. Use of precision-cut rat liver slices for studies of xenobiotic metabolism and toxicity : comparison of the Krumdieck and Brendel tissue slicers. *Xenobiotica*. 1998, 28(4), 361–371. DOI:10.1080/004982598239470.

RAHIMI, M., SHOKRI, F., HASSANIAN-MOGHADDAM, H., a kol. Severe camphor poisoning, a seven-year observational study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017, (52), 8-13. DOI:10.1016/j.etap.2017.03.009.

RASHIDI, W. N.W. a BAKAR, S. A. Glutathione S-Transferase: An Overview on Distribution of GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms in Malaysian and Other Populations. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 2019, 15(15SP2), 85-95.

REID, M. L., SEKHON, J. K. a FRAMBOISE, L. M. Toxicity of Monoterpene Structure, Diversity and Concentration to Mountain Pine Beetles, *Dendroctonus ponderosae*: Beetle Traits Matter More. *Journal of Chemical Ecology*. 2017, 43(4), 351-361. DOI:10.1007/s10886-017-0824-1.

SANTOS, C. D. a CABOT, J. C. Persistent Effects after Camphor Ingestion: A Case Report and Literature Review. *The Journal of Emergency Medicine*. 2015, 48(3), 298–304. DOI:10.1016/j.jemermed.2014.05.015.

SEDAGHAT, A., KARIMI TORSHIZI, M. A. a RAHIMI, S. Auxiliary effects of camphor on reproductive function of Japanese quail. *Poultry Science*. 2016, 95(12), 2946–2955. DOI:10.3382/ps/pew247.

SHAHABI, SGA JORSARAEI, AA MOGHADAMNIA, S., JORSARAEI, S.G.A., MOGHADAMNIA, A. A. a kol. The Effect of Camphor on Sex Hormones Levels in Rats. *Cell Journal*. 2014, 16(2), 231-234.

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

SINGH, A., BHAT, K. T. a SHARMA, O. P. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. *Journal of Clinical Toxicology*. 2011, (S4:001). DOI:10.4172/2161-0495.S4-001.

SINGH, R., a JAWAID, T. Cinnamomum camphora (Kapur): Review. *Pharmacognosy Journal*. 2012, 4(28), 1–5. DOI:10.5530/pj.2012.28.1.

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

SPILKOVÁ, J., MARTIN, J. a SIATKA, T. *Farmakognozie*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2016, 267-278. ISBN 978-80-246-3264-3.

STICKEL, F. a SHOIVAL, D. Hepatotoxicity of herbal and dietary supplements: an update. *Archives of Toxicology*. 2015, (89), 851–865. DOI: 10.1007/s00204-015-1471-3.

STREBLOVA, E. *Souhrnné texty z chemie: pro přípravu k přijímacím zkouškám (přírodovědné obory, lékařství) II.díl*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2002, 135-136. ISBN 80-246-0153-2.

SUNDARARAGHAVAN, V. L., SINDHWANI, P. a HINDS, T.D. Glucuronidation and UGT isozymes in bladder: new targets for the treatment of uroepithelial carcinomas? *Oncotarget*. 2017, 8(2), 3640-3648.

ŠADIBOLOVÁ, M., ZÁRYBNICKÝ, T. a SMUTNÝ, T. a kol. Sesquiterpenes Are Agonists of the Pregnane X Receptor but Do Not Induce the Expression of Phase I Drug-Metabolizing Enzymes in the Human Liver. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(4562). DOI:10.3390/ijms20184562.

ŠVIHOVEC, J. a kol. *Farmakologie*. Praha: Grada publishing, 2018. ISBN 978-80-271-2150-2.

TAJ, F., KHAN, M. A. a ALI, H., a kol. Improved Production of Industrially Important Essential Oils Through Elicitation in the Adventitious Roots of *Artemisia amygdalina*. *Plants*. 2019, 8(430). DOI:10.3390/plants8100430.

TAYLOR, M., CAMPBELL, L. a RUTLEDGE, R. a kol. Comparison of Unisol with Euro-Collins solution as a vehicle solution for cryoprotectants. *Transplantation Proceedings*. 2001, 33, 677–679. DOI:10.1016/s0041-1345(00)02198-9.

TESCHKE, R. a EICKHOFF, A. Herbal hepatotoxicity in traditional and modern medicine: actual key issues and new encouraging steps. *Frontiers in Pharmacology*. 2015, 6(72). DOI:10.3389/fphar.2015.00072.

THOMFORD, N., SENTHEBANE, D., ROWE, A. a kol. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(1578). DOI:10.3390/ijms19061578.

THURLOW, N. *PROCESS OF PRODUCING CAMPHOR*. USA. 698 761. Uděleno 1902.

TONG, F. a COATS, J. R. Quantitative structure-activity relationships of monoterpene binding activities to the housefly GABA receptor. *Pest Management Science*. 2012, 68(8), 1122–1129. DOI:10.1002/ps.3280.

WARING, R. H. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica*. 2019. DOI:10.1080/00498254.2019.1648911.

WOJTUNIK-KULESZA, K., KASPRZAK, K., ONISZCZUK, T. a kol. Natural monoterpenes: much more than only a scent. *Chemistry & Biodiversity*. 2019. DOI:10.1002/cbdv.201900434.

ZANGER, U. M. a SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013, 138(1), 103-141. DOI:10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.

ZÁRYBNICKÝ, T., BOUŠOVÁ, I. a AMBROŽ, M. Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Archives of Toxicology*. 2018a, (92). DOI:10.1007/s00204-017-2062-2.

ZÁRYBNICKÝ, T., MATOUŠKOVÁ, P. a AMBROŽ, M. a kol. The Selection and Validation of Reference Genes for mRNA and microRNA Expression Studies in Human Liver Slices Using RT-qPCR. *Genes*. 2019, 10(763). DOI:10.3390/genes10100763.

ZÁRYBNICKÝ, T., P. MATOUŠKOVÁ, P. a LANCOŠOVÁ, B. a kol. Inter-Individual Variability in Acute Toxicity of R-Pulegone and R-Menthofuran in Human Liver Slices and Their Influence on miRNA Expression Changes in Comparison to Acetaminophen. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018b, 19(1805). DOI:10.3390/ijms19061805.

ZHOU, Z., WANG, B. a ZENG, S. a kol. Glutathione S-transferase (GST) genes from marine copepods *Acartia tonsa*: cDNA cloning and mRNA expression in response to 1,2-dimethylnaphthalen. *Aquatic Toxicology*. 2020, 224. DOI:10.1016/j.aquatox.2020.105480.

ZUCCARINI, P. Camphor: risks and benefits of a widely used natural product. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 2009, 13(2), 69 – 74.