

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

**VLIV POLYFENONU NA VYBRANÉ
BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY U MYŠÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph. D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

JANA SKORKOVSKÁ

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat mé školitelce, Prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení experimentální části diplomové práce i za trpělivost a mnoho podnětných rad a připomínek při jejím vypracování. Také děkuji Mgr. Haně Bártíkové, Ph.D. a Mgr. Veronice Hanušové za mnoho podnětných rad a informací, které mi byly velkým přínosem. Dále děkuji Katedře biochemických věd za příjemné pracovní prostředí.

„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

.....

1. OBSAH

1. OBSAH.....	4
2. ÚVOD.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 ZELENÝ ČAJ.....	9
3.1.1 VÝROBA ZELENÉHO ČAJE	9
3.1.2 PŘÍPRAVA ZELENÉHO ČAJE	10
3.2 PŘÍPRAVKY ZE ZELENÉHO ČAJE.....	10
3.2 OBSAHOVÉ SLOŽENÍ ZELENÉHO ČAJE.....	11
3.2.1 FLAVONOIDY	11
3.2.2 PURINOVÉ ALKALOIDY	14
3.2.3 AMINOKYSELINY	15
3.2.4 DALŠÍ LÁTKY OBSAŽENÉ V ZELENÉM ČAJI.....	16
3.3 OSUD POLYFENOLŮ V LIDSKÉM ORGANISMU.....	17
3.4 POZITIVNÍ ÚČINKY ZELENÉHO ČAJE.....	18
3.4.1 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA ZELENÉHO ČAJE.....	18
3.4.2 ANTIMUTAGENNÍ A ANTIKANCEROGENNÍ AKTIVITA ZELENÉHO ČAJE.....	20
3.4.3 ÚČINEK ZELENÉHO ČAJE NA KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM. 21	
3.4.4 ÚČINKY ZELENÉHO ČAJE V DUTINĚ ÚSTNÍ.....	22
3.4.5 OCHRANA PŘED SLUNEČNÍM UV ZÁŘENÍM	22
3.4.6 ZELENÝ ČAJ A OBEZITA.....	22
3.4.7 ANTIDIABETICKÝ ÚČINEK ZELENÉHO ČAJE.....	23
3.4.8 ANTIBAKTERIÁLNÍ A ANTIVIROVÝ ÚČINEK ZELENÉHO ČAJE 24	
3.4.9 ZELENÝ ČAJ A ALERGIE	24

3.5	NEGATIVNÍ ÚČINKY ZELENÉHO ČAJE.....	25
3.5.1	KOFEIN.....	25
3.5.2	HLINÍK.....	26
3.5.3	INTERAKCE SE ŽELEZEM.....	26
3.5.4	INTERAKCE S LÉČIVY.....	26
3.6	BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY.....	27
3.6.1	ALDOKETOREDUKTASY.....	28
3.6.2	KARBONYLREDUKTASY.....	29
3.6.3	UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASA.....	29
3.6.4	GLUTATHION-S-TRANSFERASA.....	31
4.	CÍLE PRÁCE.....	33
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
5.1	MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE.....	34
5.1.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	34
5.1.2	PŘÍSTROJE.....	34
5.1.3	POMŮCKY.....	34
5.1.4	CHEMIKÁLIE.....	35
5.2	METODIKA.....	35
5.2.1	NAVOZENÍ OBEZITY U NMRI MYŠÍ GLUTAMÁTEM SODNÝM..	35
5.2.2	PŘÍPRAVA SUBCELULÁRNÍCH FRAKCÍ.....	37
5.2.3	STANOVENÍ BÍLKOVINY POMOCÍ BCA.....	38
5.2.4	STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHION-S-TRANSFERASY.....	40
5.2.5	STANOVENÍ AKTIVITY UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASY	41
5.2.6	STANOVENÍ AKTIVITY KARBONYLREDUKTASY POMOCÍ MENADIONU.....	43

5.2.7	STANOVENÍ AKTIVITY ALDEHYDREDUKTASY (AKR1A1) POMOCÍ GLYCERALDEHYDU	44
5.2.8	STANOVENÍ AKTIVITY ALDOKETOREDUKTASY (AKR1C) POMOCÍ ACENAFTENOLU.....	46
5.2.9	STANOVENÍ AKTIVITY ALDOKETOREDUKTASY POMOCÍ 4-PYRIDINKARBOXALDEHYDU	48
5.2.10	ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ NA POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU	49
5.2.11	IMUNOBLOTTING PO ELEKTROFORÉZE	54
5.2.12	DETEKCE PROTEINŮ	55
5.2.13	CHEMILUMINISCENČNÍ DETEKCE.....	56
6.	VÝSLEDKY	58
6.1	PRŮMĚRNÉ MNOŽSTVÍ SEŽRANÉHO KRMIVA	59
6.2	PRŮMĚRNÁ HMOTNOST JEDNOHO MYŠÍHO SAMCE	59
6.3	BIOCHEMICKÝ ROZBOR KRVE MYŠÍCH SAMCŮ.....	61
6.4	KONCENTRACE PROTEINU V CYTOSOLU JATER A TENKÉHO STŘEVA	62
6.5	KONCENTRACE PROTEINU V MIKROSOMECH JATER A TENKÉHO STŘEVA	63
6.6	AKTIVITA GST V JATERNÍM CYTOSOLU	64
6.7	AKTIVITA GST V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA	65
6.8	AKTIVITA UGT V JATERNÍCH MIKROSOMECH.....	66
6.9	AKTIVITA UGT V MIKROSOMECH TENKÉHO STŘEVA	68
6.10	AKTIVITA CBR V JATERNÍM CYTOSOLU.....	69
6.11	AKTIVITA CBR V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA	70
6.12	AKTIVITA AKR1A1 V JATERNÍM CYTOSOLU	72
6.13	AKTIVITA AKR1A1 V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA.....	73
6.14	AKTIVITA AKR1C V JATERNÍM CYTOSOLU.....	74

6.15	AKTIVITA AKR1C V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA.....	76
6.16	AKTIVITA AKR1A/1C V CYTOSOLU JATER	77
6.17	AKTIVITA AKR1A/1C V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA.....	79
6.18	DETEKCE PROTEINU CBR V JATERNÍM CYTOSOLU.....	80
6.19	DETEKCE PROTEINU UGT V JATERNÍCH MIKROSOMECH.....	81
7.	DISKUSE	83
8.	ZÁVĚR.....	88
9.	ABSTRAKT	89
10.	ABSTRACT	90
11.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	91
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	93
13.	POUŽITÁ LITERATURA	96

2. ÚVOD

Čaj je osvěžujícím a po vodě druhým nejužívanějším nápojem na zemi. Jeho kolébkou je Čína, kde je pěstován již nejméně 2500 let. (Preedy 2013; Wachendorf 2007) Kultura čaje je rozšířena po celém světě, zelený čaj se vyrábí ve více než dvaceti zemích v tropických, subtropických a mírných pásech světa. (Preedy 2013) Přispívá k celkovému dennímu příjmu tekutin a také antioxidantních a minerálních látek. (Cabrera et al. 2006) Velká pozornost je zaměřena na možné příznivé účinky zeleného čaje. A právě jeho účinky jsou neustále zkoumány. (Yang et al. 2000) Jednou z nejdůležitějších skupin látek v zeleném čaji jsou katechiny. Tyto flavonoidy mají řadu pozitivních vlivů na zdraví lidí, mimo jiné jsou výbornými antioxidanty. (Hara 2001; Velíšek (2) 1999) Katechiny jsou však také schopné ovlivňovat expresi a aktivitu různých enzymů, což může mít jak pozitivní, tak i negativní účinek na lidský organismus. Tato diplomová práce hodnotí změny aktivit vybraných biotransformačních enzymů u normálních a obézních skupin myši po podávání výtažků ze zeleného čaje, konkrétně polyfenonu. Polyfenon byl přidáván ve dvou koncentracích (0,1 a 0,01 %) 3 dny či 28 dní myším do krmiva.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ZELENÝ ČAJ

Mateřskou rostlinou zeleného čaje je čajovník čínský (L.) O. Kuntze (*Camellia sinensis*) z čeledi čajovníkovité (*Theaceae*). Čajovník je stálezelený strom nebo keř s bíložlutými květy. V dnešní době se pěstuje nejčastěji v oblastech Číny, Japonska, Indie, Indonésie, Srí Lanky nebo Keni. (Preedy 2013; Spilková a Siatka 2006) Ideálními podmínkami pro pěstování čajovníků jsou dostatek světla a teplota mezi 18 a 28 °C. (Wachendorf 2007) Největším producentem zeleného čaje je Čína, která odpovídá za přibližně 73 % celkové světové produkce čaje. Druhou zemí s největší produkcí čaje je Japonsko přispívající patnácti procenty k celkové produkci na světě.

Čaj lze rozdělit do tří typů, v závislosti na stupni oxidace existuje čaj zelený (neoxidovaný), oolong (částečně oxidovaný) a černý čaj, který je oxidovaný. Částečně oxidovaný oolong čaj představuje přechodný typ mezi zeleným a černým čajem. (Velayutham et al. 2009) Ročně je vyrobeno a spotřebováno okolo tří miliard kilogramů čaje. (Yang et al. 2000) Existují dvě odrůdy čajovníku, *Camellia sinensis* var. *assamica* s většími a širšími listy a *Camellia sinensis* var. *sinensis* s listy malými a úzkými. Pro přípravu zeleného čaje se nejčastěji užívají listy malé, protože mají sladší chuť, odrůda *assamica* obsahuje vyšší množství polyfenolů, které způsobují hořkou chuť. (Cabrera et al. 2006; Preedy 2013; Spilková a Siatka 2006) Z odrůdy *assamica* se také ve větším množství vyrábí čaj černý. Jednotlivé odrůdy čajovníků se mezi sebou také často kříží, díky čemuž vznikají různé druhy čajů s odlišným složením. (Teufl 2000)

3.1.1 VÝROBA ZELENÉHO ČAJE

Při sklizni zeleného čaje se sbírají pouze vrcholové větvičky s pupenem a jedním až třemi listy. (Spilková a Siatka 2006; Watson a Preedy 2008) Sklizeň probíhá buď ručním sběrem či mechanicky strojově. (Preedy 2013) V listech je okamžitě po sklizni nutno inaktivovat enzymy působením horké páry či vzduchu po dobu 10 – 15 minut za teploty lišící se od 100 °C až po 330 °C. Právě tento proces deaktivuje enzymy a zachová v zeleném čaji polyfenoly včetně katechinů i chlorofyl, díky kterému zůstává barva listů čaje zelená. (Preedy 2013; Spilková a Siatka 2006; Watson a Preedy 2008)

Deaktivace enzymů také zabrání oxidaci a fermentaci zeleného čaje. (Preedy 2013) Právě oxidace je rozdílem mezi zeleným a černým čajem, po oxidaci se z čaje zeleného stává čaj černý. (Teufl 2000) Také působení horké páry zachová v listech čaje vyšší obsah polyfenolů s antioxidační aktivitou a sytější barvu než působení suchého vzduchu. (Preedy 2013) Následně se listy rolují. Rolování je způsob úpravy čajových listů pro pozdější snadné uvolnění obsahových látek z čaje. (Teufl 2000) Na závěr se čajové listy tvarují a suší. (Preedy 2013) Vysušit se listy musí opravdu dosucha, aby kvůli částečné vlhkosti nedocházelo k pozdější fermentaci čaje či jeho plesnivění. (Teufl 2000) Podle způsobu úpravy a velikosti listů se zelený čaj třídí na listový (celé listy), zlomkový (rozlámané listy), drť (části strojem zpracovaných listů) a prach (nejjemnější části čaje propadlé jemným sítem). (Wachendorf 2007)

3.1.2 PŘÍPRAVA ZELENÉHO ČAJE

Aby byly využity všechny pozitivní účinky zeleného čaje, musí se umět správně připravit. Na rozdíl od černého čaje se látky v zeleném čaji při louhování snadněji a rychleji uvolní. Právě proto by se zelený čaj měl louhovat kratší dobu a při nižších teplotách. Ideální teploty se pohybují od 60 do 90 °C, dle druhu zeleného čaje. Ideální doba louhování je 2 až 3 minuty. Klasickým způsobem přípravy je příprava pomocí dvou konviček. Do první keramické konvice nasypane zelený čaj a přelijeme ho vodou. Po správném čase louhování se čaj přelije přes filtr do konvice druhé, například porcelánové. (Teufl 2000; Wachendorf 2007)

3.2 PŘÍPRAVKY ZE ZELENÉHO ČAJE

Díky mnoha pozitivním účinkům zeleného čaje se jeho výtažky přidávají do rozličných výrobků a přípravků. Patří mezi ně například zubní pasty a ústní vody, které chrání před zápachem z úst i zubním kazem a díky fluoru posilují zubní sklovinu.

Také kosmetické přípravky mohou obsahovat extrakty ze zeleného čaje, existují například mýdla, šampony, pleťové krémy, vody, čisticí roztoky a gely a také opalovací krémy i dekorativní kosmetika. Výtažky ze zeleného čaje se do kosmetických výrobků přidávají jako přísada proti stárnutí pokožky či jako ochranná a protizánětlivá komponenta. Jsou také vyvíjeny přípravky, které obsahují polyfenoly jako aktivní složku pro podporu regenerace kůže a pro léčení některých epitelálních problémů, jako

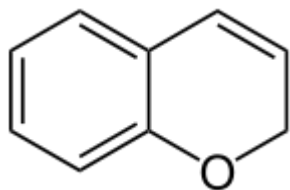
jsou například aftózní vředy, lupénka, rosacea, nebo keratózy. Protože penetrace polyfenolů přes kůži je slabá, je nutné vytvořit lokální přípravky na bázi organického rozpouštědla nebo přípravky na bázi tuku, které mohou zlepšit pronikání polyfenolů kůží a které budou mít za následek efektivnější fotoochranu kůže. Vyvíjí se také deodorační přípravky, převážně na nohy, protože výtažky ze zeleného čaje účinně ničí bakterie, které způsobují zápach. (Lekh 2013; Lübeck 2007)

Také existují potravní doplňky obsahující extrakt ze zeleného čaje. (Lübeck 2007) Většina těchto přípravků obsahuje práškový extrakt polyfenolů ve formě tablet nebo kapslí. Existují také potravní doplňky obsahující kombinaci katechinů s kofeinem, které se prodávají jako tzv. „spalovače tuků“. (Lekh 2013)

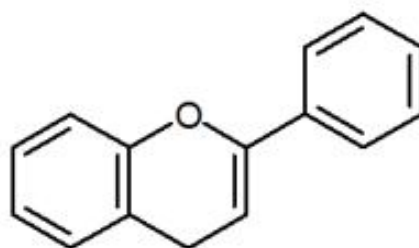
3.2 OBSAHOVÉ SLOŽENÍ ZELENÉHO ČAJE

3.2.1 FLAVONOIDY

Flavonoidy jsou přírodní rostlinné látky typu fenolů. (Velíšek (3) 1999) Vyskytují se v cytosolu nebo vakuolách rostlinných buněk. (Preedy 2013) V rostlinné říši mají klíčovou roli v signalizaci mezi rostlinami a mikroby, jako antimikrobiální a UV ochrana a také jako ochrana proti spálení zvířaty. (Winkel-Shirely 2001) Jejich molekulu tvoří dva benzenové kruhy propojené řetězcem třech uhlíků, které jsou většinou součástí pyranového kruhu. Základní strukturu flavonoidů tvoří 2H-chromen (Obrázek 1), který je v poloze 2 substituovaný fenylovou skupinou. Tato struktura se nazývá flavan (Obrázek 2). Z této struktury jsou odvozeny základní typy flavonoidů, liší se rozdílnou substitucí hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami na pyranovém kruhu. (Velíšek (3) 1999)



Obrázek 1: *Struktura 2H- chromenu*

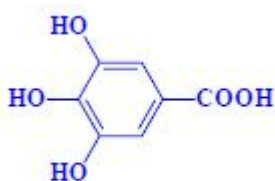


Obrázek 2: *Struktura flavanu*

Mezi základní skupiny flavonoidů řadíme: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny. (Velíšek (3) 1999) Flavanoly se někdy nazývají právě katechiny. Jsou hlavními složkami přítomnými v zeleném čaji. Vyskytují se v podobě β -glykosidů napojených na sacharidovou složku, kterou bývá nejčastěji glukosa nebo rhamnosa či arabinosa. (Preedy 2013; Slanina a Táborská 2004)

3.2.1.1 TŘÍSLOVINY

V zeleném čaji nalezneme také třísloviny. Jsou to fenolové polymerní sloučeniny, takzvané polyfenoly, které jsou schopny reagovat s lidskými slinami v dutině ústní, díky čemuž vnímáme jejich chuť jako trpkou či svíravou. Polymery látek se strukturou hydroxy-3-flavanu se nazývají třísloviny kondenzované. Polymerní látky esterů kyseliny gallové (Obrázek 3) jsou třísloviny hydrolyzovatelné. Sacharidovou složkou esterů kyseliny gallové bývá nejčastěji D-glukosa. Sloučeniny hydrolyzovatelných a kondenzovaných tříslovin se nazývají třísloviny komplexní. (Velíšek (2) 1999) Mají protizánětlivý a zklidňující účinek a působí proti nachlazení. Čím déle čaj louhujeme, tím získává trpkou chuť, kterou způsobují právě třísloviny. (Wachendorf 2007) Pokud bychom do čaje přidali mléko, díky interakci tříslovin s proteiny mléka trpká chuť zmizí. (Velíšek (2) 1999)



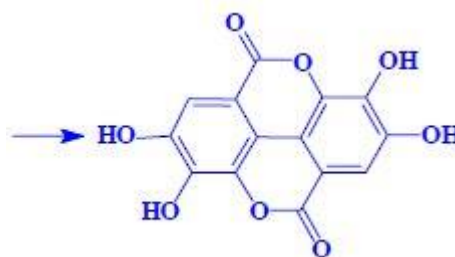
Obrázek 3: *Struktura kyseliny gallové*

Pokud necháme reagovat hydrolyzovatelné třísloviny s kyselinou, zásadou či esterázou, hydrolytickou reakcí vznikne kyselina gallová nebo kyselina hexahydroxybifenyllová (Obrázek 4) a D-glukosa. Právě hexahydroxybifenyllová kyselina se v kyselém prostředí samovolně mění na kyselinu ellagovou (Obrázek 5)

a vznikají produkty ellagotanniny. Hydrolytickou přeměnou kyseliny gallové vznikají galotanniny. (Velíšek (2) 1999)



Obrázek 4: Struktura kyseliny hexahydroxybifenylové

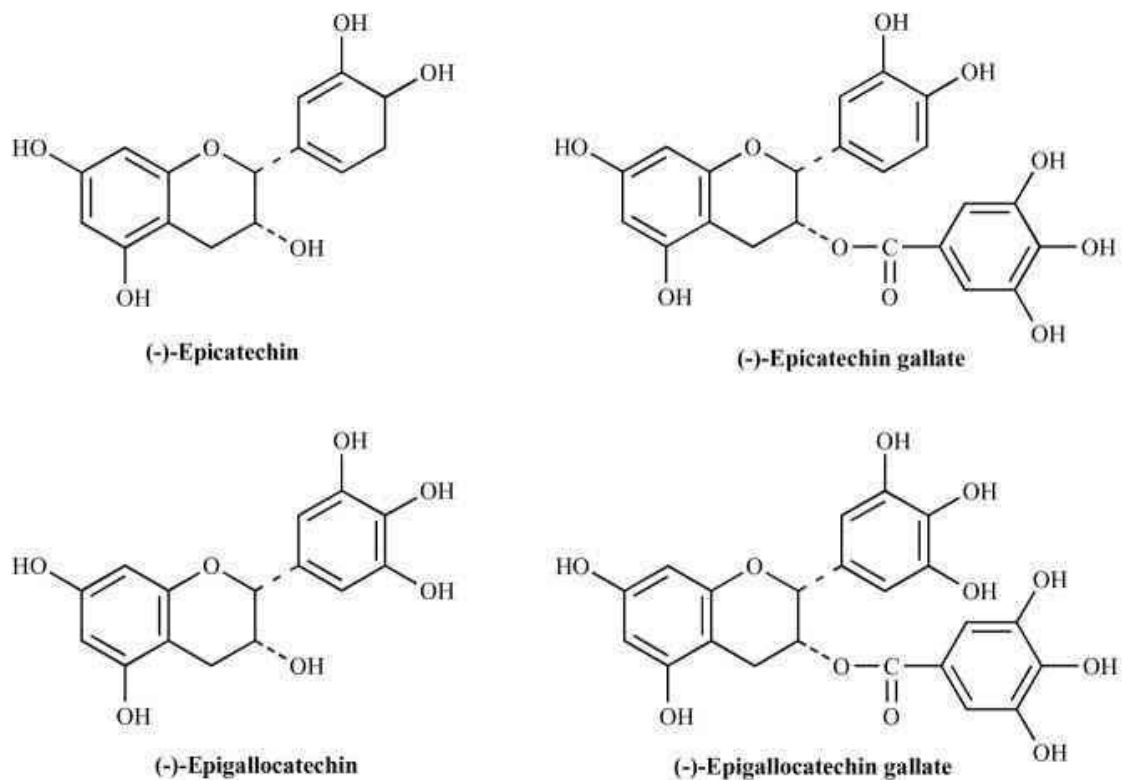


Obrázek 5: Struktura kyseliny ellagové

Kondenzované třísloviny neboli jinak nazývané proanthokyanidiny jsou polymery flavonoidů. Mezi ně patří také katechiny zeleného čaje. Jejich trpká chuť se v nálevu zeleného čaje kompenzuje reakcí s bílkovinami v čaji. (Velíšek (2) 1999)

3.2.1.2 KATECHINY

Zelený čaj obsahuje různé druhy katechinů, které jsou zastoupeny až v 30 % sušiny. Mezi volné katechiny patří katechin, gallokatechin, epikatechin (EC), epigallokatechin (EGC). Tyto katechiny mají mírně trpkou chuť. Další skupinou jsou esterifikované katechiny, mezi které patří epikatechin galát (ECG), epigallokatechin galát (EGCG) či gallokatechin galát (Obrázek 6). Esterifikované katechiny mají velmi hořkou a trpkou chuť. Právě katechiny jsou považovány za látky s nejvyšším antioxidačním působením v zeleném čaji. (Hara 2001; Spilková a Siatka 2006) Katechiny tvoří v zeleném čaji 80 až 90 % všech flavonoidů. (Velayutham et al. 2009) Největší množství zaujímá EGCG, až 50 – 60 % z celkového počtu katechinů v zeleném čaji. (Preedy 2013) Právě EGCG je také přisuzován největší účinek ze všech katechinů v zeleném čaji. (Teufl 2000) Čajový nálev o objemu 150 ml připravený ze sáčku o hmotnosti 2 g obsahuje v průměru 80 mg extrahovaných katechinů. (Hara 2001) Katechiny jsou obsaženy kromě čaje také například v ovoci, zelenině či čokoládě nebo bylinných čajích. (Slanina a Táborská 2004; Teufl 2000)



Obrázek 6: *Struktury vybraných katechinů*

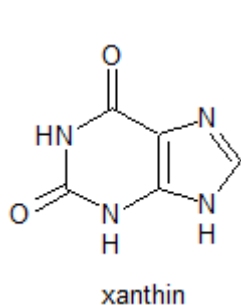
Z dalších flavonoidních látek obsahuje zelený čaj také fenolické kyseliny, z nich je zastoupena například kyselina kávová či chlorogenová, z flavanolů jsou zastoupeny například kvercetin, myricetin nebo kempferol. (Spilková a Siatka 2006)

3.2.2 PURINOVÉ ALKALOIDY

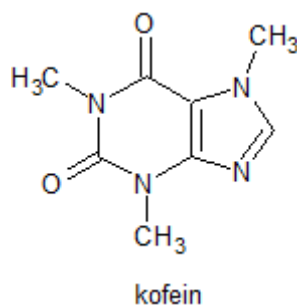
Mezi další obsahové látky v listech zeleného čaje lze zařadit purinové alkaloidy, látky odvozené od xanthinu (Obrázek 7), jako například kofein, chemickým názvem 1,3,5-trimethylxanthin (Obrázek 8), který se v sušině nachází ve dvou až čtyřech procentech. Právě kofein je odpovědný za povzbuzující účinky čaje. (Spilková a Siatka 2006) Dříve byl kofein v čaji označován nesprávným názvem thein, obě látky jsou ale chemicky identické. Na rozdíl od kávy, kofein uvolněný z čaje působí v organismu pomaleji díky vazbě na trísloviny. (Wachendorf 2007) Právě proto není absorbován již v žaludku (jak je tomu u kávy), ale vázaný na polyfenoly je absorbován až ve střevech. (Lübeck 2007) Stimuluje bdělost a snižuje pocit únavy. (Cabrera et al. 2006) Také podporuje prokrvení organismu rozšířením cév včetně periferních částí těla, podporuje

produkci žaludečních šťáv a spalování kalorií. (Teufl 2000) Kromě povzbuzujících účinků na organismus má kofein také mírně močopudné účinky.

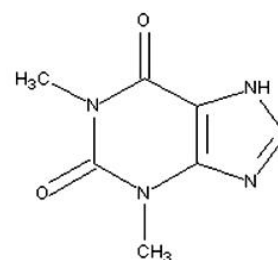
V malém množství (méně než 0,2 %) se v zeleném čaji nacházejí také theobromin a theofylin. (Preedy 2013; Spilková a Siatka 2006; Velíšek (3) 1999) Theofylin (Obrázek 9) má ionotropní a vazodilatační účinky a větší močopudný účinek než kofein. Také působí relaxaci dýchacích cest či uvolňuje křeče svalů. (Cabrera et al. 2006; Wachendorf 2007)



Obrázek 7: Struktura xanthinu



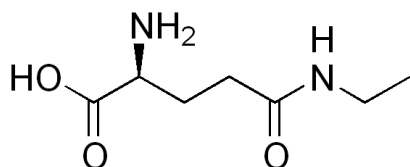
Obrázek 8: Struktura kofeinu



Obrázek 9: Struktura theofylinu

3.2.3 AMINOKYSELINY

V zeleném čaji dále nalezneme aminokyseliny, obsahují 1 – 4 % sušiny. Důležitou aminokyselinou je theanin (Obrázek 10), aminokyselina N-ethylglutamin, analog kyseliny glutamové, který přispívá k relaxačním účinkům zeleného čaje. (Preedy 2013; Velíšek (1) 1999) Theanin tvoří více než polovinu z celkového množství aminokyselin v zeleném čaji. (Hara 2001)



Obrázek 10: Struktura theaninu

3.2.4 DALŠÍ LÁTKY OBSAŽENÉ V ZELENÉM ČAJI

V zeleném čaji jsou také zastoupeny bílkoviny (15 - 20 % sušiny), sacharidy jako například celulóza, pektiny, glukosa, fruktosa nebo sacharosa (5 – 7 % sušiny), lipidy (linolové a linolenové kyseliny) nebo steroly. Obsahuje také pigmenty, jako jsou karotenoidy a chlorofyl, těkavé sloučeniny a až 150 rozličných aromatických látek, jako například některé alkoholy, estery, laktony či uhlovodíky a také vitamíny skupiny B či vitaminy C a E. (Cabrera et al. 2006; Preedy 2013; Teufl 2000)

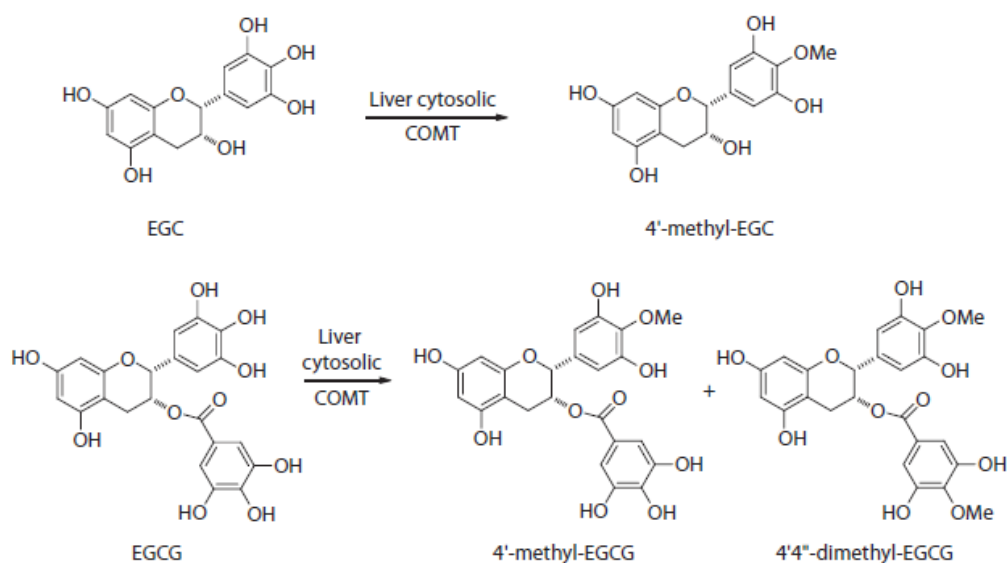
Dalšími důležitými složkami zeleného čaje jsou minerální látky a stopové prvky, které se vyskytují až v pěti procentech sušiny. Ze stopových prvků jsou zastoupeny například vápník, hořčík, chrom, mangan, železo, měď, zinek, molybden, selen, sodík, fosfor, kobalt, nikl, draslík, hliník a fluor. (Cabrera et al. 2006)

Obsahové složení zeleného čaje a jeho kvalita také velmi závisí na podmínkách růstu a životním prostředí dané rostliny i na faktorech jako je pěstování, sklizeň, skladování, zpracování čaje a jeho příprava. Právě tyto faktory ovlivní jak chemické složení nápoje, tak jeho vlastnosti, jako je například chuť či aroma. (Preedy 2013) Také stáří listů má vliv na množství obsahových látek v čaji. „Čím jsou čajové lístky starší, tím méně těchto látek mají.“ (Teufl 2000)

Při zpracování zeleného čaje se množství mnohých obsahových látek snižuje. Polyfenolové katechiny se v největším množství vyskytují právě v čerstvých listech. Během procesu zpracování zeleného čaje se jejich obsah snižuje a výsledný produkt obsahuje až o 15 % katechinů méně. Zpracování však deaktivuje enzymy podílející se na rozkladu katechinů, takže ve výsledném produktu se katechiny již odbourávají pomaleji. Naopak kofein je méně citlivý na vysoké teploty a jeho hladiny se v průběhu zpracování čaje nesnižují. Některé proteiny mohou být při výrobě čaje hydrolyzovány vysokými teplotami až na aminokyseliny. Během zpracování se tím také může zvyšovat množství theaninu. Množství chlorofylu může být díky vysokým teplotám, změně pH a hydrolyze sníženo v konečné podobě čaje až na polovinu. Také následné skladování zeleného čaje a reakce s okolní vlhkostí, světlem a teplotou mohou snížit množství obsahových látek v čaji. Pro zvýšení trvanlivosti je nutné čaj skladovat v uzavřených obalech v chladu a temnu. (Preedy 2013)

3.3 OSUD POLYFENOLŮ V LIDSKÉM ORGANISMU

Polyfenoly jsou přírodní fenolové sloučeniny. Běžnými polyfenoly jsou například flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany. Tyto látky často přijímáme ve stravě, jsou obsaženy v některých běžně užívaných potravinách, jako jsou například brambory (chlorogenová kyselina), rajčata (fenolové kyseliny), hořká čokoláda, červené víno či jablka (proantokyanidiny), nebo právě čaj (katechiny). Při pití čaje se polyfenoly vstřebávají částečně již z dutiny ústní, nejvíce však z tenkého střeva difuzí přes kartáčový lem či enzymatickou přeměnou a následně z tlustého střeva metabolizací střevními bakteriemi. Ve tkáních mohou být polyfenoly metabolizovány pomocí glukuronidace, sulfatace, konjugace s glycinem, metylací katechol-O-methyltransferasou (COMT) či vzájemnou kombinací těchto metabolických cest, díky čemuž v organismu dochází k tvorbě mnoha různých metabolitů. (Slanina a Táborská 2004) Právě volné katechiny, jako například EGC či EC mohou být snadno konjugované na glukuronidy či sulfáty. (Yang et al. 2000) Tyto metabolity ve formě konjugátů jsou z organismu vyloučeny nejčastěji močí či žlučí. (Slanina a Táborská 2004) Stejně tak katechiny podléhají metylaci COMT, při které vznikají mono a dimetylované metabolity (Obrázek 11). (Lekh 2013) Při porovnání eliminačního poločasu ($T_{1/2}$) některých katechinů bylo zjištěno, že EGCG má delší $T_{1/2}$ než například EGC nebo EC. Právě EGC a EC se vylučují močí, EGCG nikoli. (Yang et al. 2000) Celková biologická dostupnost polyfenolů u člověka je ovšem relativně nízká. (Lekh 2013)



Obrázek 11: Metylace EGC a EGCG enzymem COMT a výsledné metabolity (Lekh 2013)

3.4 POZITIVNÍ ÚČINKY ZELENÉHO ČAJE

Polyfenoly v zeleném čaji mají kromě antioxidačního působení také protizánětlivý, protirakovinný, antimutagenní, antialergický, antimikrobiální, anthelmintický účinek, snižují cholesterol a působí pozitivně při srdečních chorobách a diabetu (mají hypoglykemický účinek). Také působí proti průjmům. (Preedy 2013) Některé studie také naznačují, že zelený čaj by mohl mít prospěšný vliv na zvýšení kognitivních funkcí, density kostí, jako ochrana před zubním kazem a parodontózou či ledvinovými kameny. (Cabrera et al. 2006) Právě vliv na zvýšení density kostí a hustoty kostního minerálu může být způsoben nejen polyfenoly, ale také dalšími složkami zeleného čaje, jako je fluor nebo fytoestrogeny. (Yang et al. 2000)

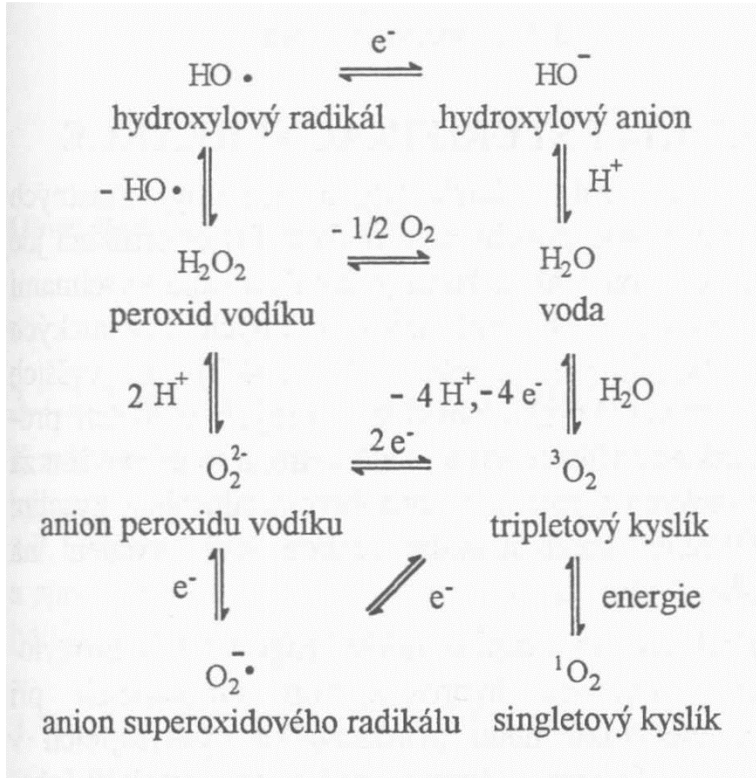
Zelený čaj je také schopen upravovat střevní mikroflóru a posílit růst prospěšných střevních bakterií, jako jsou *Lactobacillus* nebo *Bifidobacterium*. (Hara 2001) Pozitivní vliv by mohl mít i při léčbě dny, protože působí zásaditě na organismus a může pozitivně ovlivňovat hladiny kyseliny močové v krvi. Právě zásadotvornost katechinů v čaji pomáhá například i při pálení žáhy, jelikož dokáže neutralizovat nadměrné vylučování žaludečních kyselin. (Teufl 2000) Za zmínku stojí i dlouhodobé studie, které prokazují snížení radioaktivní zátěže díky polyfenolům, které jsou schopny na sebe v organismu vázat radioaktivní izotop stroncium 90. Organismus je schopen sloučeninu polyfenolu s izotopem vyloučit a snížit tak poškození z ozáření až o jednu třetinu. (Lübeck 2007)

Tradiční čínská medicína zelený čaj doporučuje při bolestech hlavy a celého těla, na trávení, deprese, na detoxikaci organismu a jako látku prodlužující život. (Cabrera et al. 2006) Již staří Číňané užívali zelený čaj nejen při únavě, poruchách zraku a soustředění, ale také jako lék při nemocech močového měchýře nebo revmatismu. (Wachendorf 2007) Všechny výše uvedené účinky zeleného čaje přispěly k jeho využití při přípravě nejrůznějších potravin, farmaceutických přípravků, zubních past a kosmetiky. (Cabrera et al. 2006)

3.4.1 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA ZELENÉHO ČAJE

V rostlinných a živočišných organismech probíhají při fotosyntéze a v dýchacím řetězci procesy, při kterých vznikají jako vedlejší produkty nežádoucí látky, například volné radikály, kovalentní sloučeniny či reaktivní formy kyslíku. Tyto látky jsou poté

zodpovědné za oxidaci lipidů, proteinů, DNA a dalších molekul v organismu. Vznik kyslíkových radikálů znázorňuje Obrázek 12. (Velíšek (1) 1999)



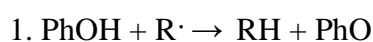
Obrázek 12: Metabolismus kyslíku a vznik kyslíkových radikálů (Velíšek (1) 1999)

Antioxidanty jsou látky, které chrání buňky před volnými kyslíkovými radikály. Jejich nadměrné množství v organismu vede k oxidačnímu stresu a poškození buněk. (Crespy a Williamson 2004) Následkem oxidačního stresu může dojít k rychlejšímu stárnutí organismu, oslabení imunitního systému či ke zhoršení pleti. (Lübeck 2007)

Flavonoidy jsou látky s velkým antioxidačním účinkem. Jejich účinek je silnější než některé vitaminy, například C a E. Katechiny jsou výbornými antioxidanty díky vysokému počtu hydroxylových skupin v molekule. (Cabrera et al. 2006; Procházková et al. 2011) Jejich schopnost vychytávat volné radikály klesá v pořadí ECG > EGCG > EGC > EC > katechin. (Zaveri 2006) Zhášení volných radikálů probíhá několika mechanismy. Flavonoidy mohou přímo vyhledávat reaktivní formy kyslíku (ROS), aktivně se podílejí na chelataci kovů (jako například železa či mědi), pomáhají inhibovat oxidační enzymy, jako jsou lipoxygenasy, cyklooxygenasy

či xanthin oxidasy, podporují aktivaci antioxidantních enzymů, například glutathion-S-oxidasy nebo superoxid dismutasy, zvyšují antioxidantní aktivitu nízkomolekulárních antioxidantů či zmírňují oxidační stres způsobený oxidem dusnatým. (Cabrera et al. 2006; Procházková et al. 2011) Některé studie tvrdí, že zelený čaj má vyšší antioxidantní aktivitu proti peroxylovým radikálům než některá zelenina, například česnek, kapusta nebo špenát. Zelený čaj má také vyšší antioxidantní kapacitu než čaj černý. (Cabrera et al. 2006)

Flavonoidy mohou s volnými radikály reagovat prostřednictvím dvou hlavních mechanismů. Prvním je reakce přenosu atomu vodíku, druhou je přenos elektronu v reakci.



(Preedy 2013)

Jelikož katechiny jsou v organismu rychle a rozsáhle metabolizovány, je otázkou, zdali je v živém organismu antioxidantní kapacita podobná jako v in vitro měřených studiích. Jiné studie naznačují, že po požití mírného množství zeleného čaje (1 až 6 šálků denně) se zvyšuje antioxidantní potenciál krve. (Cabrera et al. 2006)

3.4.2 ANTIMUTAGENNÍ A ANTIKANCEROGENNÍ AKTIVITA ZELENÉHO ČAJE

Rakovinu lze definovat jako abnormální či nekontrolovatelnou proliferaci buněk. (Lekh 2013) Na základě četných epidemiologických studií, včetně studií na zvířatech a buněčných kulturách, je zelený čaj užíván pro svůj preventivní antikancerogenní účinek. Může působit proti nádorovému bujení na kůži, v plicích, dutině ústní, jícnu, žaludku, játrech, ledvinách a dalších orgánech. Kromě inhibice kancerogeneze je zelený čaj také schopen zvyšovat apoptózu a snižovat proliferaci nádorových buněk. (Cabrera et al. 2006) Protože se katechiny v tenkém střevě zcela neabsorbují, jsou ve střevní lumen přítomny ve vysoké koncentraci a mohou tak ovlivnit apoptózu a proliferaci nádorů v tenkém a tlustém střevě. (Crespy a Williamson 2004) Studie také ukazují, že inhibiční aktivita proti nádorům je účinná při podávání čaje během zahájení, rozšíření i progresu rakovinného bujení. (Yang et al. 2000) Zejména EGCG má slibný

protirakovinný potenciál díky svým antioxidačním, chemoprotektivním a antimutagenním vlastnostem. (Cabrera et al. 2006) Bylo prokázáno, že EGCG má také antiangiogenní účinky, dokáže potlačit růst nádoru snížením tvorby nových cév. (Zaveri 2006) Dle některých studií mají katechiny také významný potenciál v léčení rakoviny prsu a prostaty. (Cabrera et al. 2006) Jedním z možných mechanismů protirakovinných účinků polyfenolů je také inaktivace některých virů, které způsobují rakovinu. (Hara 2001)

3.4.3 ÚČINEK ZELENÉHO ČAJE NA KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM

Kardiovaskulární onemocnění je definováno jako skupina chorob, které zahrnují dysfunkci srdce a krevního řečiště. Mezi tyto nemoci patří například vysoký krevní tlak, ateroskleróza, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, městnavé srdeční selhání či ischemická choroba srdeční. (Lekh 2013) Kardiovaskulární nemoci patří mezi nejčastější příčiny úmrtí u žen i mužů v západních zemích. (Crespy a Williamson 2004) Hlavními rizikovými faktory jsou nezdravá strava, nedostatek fyzické aktivity a také nadměrné užívání alkoholu a tabáku. (Lekh 2013)

Tradiční čínská medicína již dlouhou dobu věří, že zelený čaj má hypotenzivní účinky. Již i některé epidemiologické studie prokázaly, že pití zeleného čaje mírně snižuje krevní tlak a riziko kardiovaskulárních chorob prostřednictvím EC a EGCG, které mají díky svým antioxidačním vlastnostem vliv na inhibici oxidace LDL cholesterolu. Právě LDL cholesterol je spojován se zvýšeným rizikem aterosklerózy a srdečních onemocnění. (Cabrera et al. 2006) Katechiny také inhibují klíčové enzymy zapojené do biosyntézy lipidů a snižují intestinální absorpci lipidů. (Velayutham et al. 2009) EC a EGCG také přispívají ke snížení uvolňování triglyceridů a cholesterolu z micel a jeho následnou absorpci. (Crespy a Williamson 2004; Hara 2001) Polyfenoly v zeleném čaji také mohou zvyšovat hladiny HDL cholesterolu, který snižuje rozvoj aterosklerózy. Zvýšená koncentrace katechinů v plazmě také díky dilataci cév zlepšuje průtok krve. (Cabrera et al. 2006; Teufl 2000) Další možností, jak polyfenoly v zeleném čaji mohou snižovat krevní tlak je mírná inhibice ACE (angiotenzin konvertujícího enzymu). (Hara 2001)

3.4.4 ÚČINKY ZELENÉHO ČAJE V DUTINĚ ÚSTNÍ

Spotřeba zeleného čaje snižuje tvorbu zubního kazu a vznik parodontózy. Odvary ze zeleného čaje inhibují enzym amylasu v lidských slinách a tím snižují uvolňování maltosy v dutině ústní až o 70 %. Tento mechanismus chrání zuby před zubním kazem z potravin, které obsahují škroby (jako jsou sušenky, koláče a podobně). Zelený čaj je také přirozeným zdrojem fluoridů, obsahuje jich 300 až 2000 ppm jednotek. Fluoridy ze zeleného čaje vykazují vysokou vazebnou schopnost k tkáním dutiny ústní a pití čaje je tak zdrojem fluoridů, které mají příznivý vliv na posílení zubní skloviny a snížení tvorby zubního kazu, prevenci parodontózy či rakoviny dutiny ústní. Kromě fluoridů jsou látky v zeleném čaji díky svému antimikrobiálnímu účinku schopny inhibovat růst nežádoucích ústních bakterií, jako je například *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* nebo *Escherichia coli*. Tyto bakterie, a především *S. mutans*, produkují kyseliny a vytvářejí plak na zubní sklovině. (Cabrera et al. 2006; Hara 2001) Stejně tak je zelený čaj schopen hubit bakterie způsobující halitosis, zápach z dutiny ústní. Proto je vhodné si zejména po jídle vyplachovat ústa zeleným čajem, který je považován za velmi prospěšný pro hygienu ústní dutiny. (Lübeck 2007; Teufel 2000)

3.4.5 OCHRANA PŘED SLUNEČNÍM UV ZÁŘENÍM

Ztenčování ozonové vrstvy, růst průměrné délky života a měnící se stravovací návyky a životní styl jsou přispívajícími faktory, které zvyšují riziko kožních malignit. (Lekh 2013) Polyfenoly v zeleném čaji mají fotoprotektivní účinek, působí proti zánětlivým reakcím, imunosupresi a oxidačnímu stresu z ultrafialového záření (UV). Opakovaná či dlouhodobá expozice UV zářením může vést k vývoji kožních onemocnění. Polyfenoly tak mohou chránit před některými kožními onemocněními, které jsou vyvolané UV zářením, jako například melanomy, nemelanomové rakoviny kůže či pouhé stárnutí kůže z nadměrného ozáření. (Cabrera et al. 2006) Výzkumy také ukazují, že zelený čaj má pozitivní účinky při mírnění spálenin od slunce a regeneraci i zklidnění pokožky i při topickém použití. (Teufel 2000)

3.4.6 ZELENÝ ČAJ A OBEZITA

Obezita je definována jako fyzický stav, při kterém má jedinec body mass index (BMI) vyšší či roven třiceti kg/m^2 . BMI se stanoví z výšky a váhy daného jedince

výpočtem hmotnosti v kilogramech dělené výškou v metrech na druhou. (King 1996 – 2013) Pramení z vyššího příjmu kalorií, než je třeba pro fungování organismu. (Hara 2001) Kombinace podmínek, jako je obezita, hypertenze, inzulinová resistance a zvýšený cholesterol může vést až k metabolickému syndromu a kardiovaskulárním chorobám. Mezi primární determinanty metabolického syndromu jsou řazeny právě viscerální forma obezity a inzulinová resistance. (Nagao et al. 2007) V posledních letech ve světě prudce narůstá počet obézních pacientů. Obezita se tak stává celosvětovým problémem. (Cabrera et al. 2006) Z nedávných studií vyplývá, že tuková tkáň není pouze skladem energie, ale je aktivním endokrinním orgánem. (Lin et al. 2005)

Studie prokazují, že čajové extrakty obsahující 25 % katechinů mohou inhibovat gastrické lipázy a v menší míře také lipázy slinivky břišní a tímto mechanismem mohou snižovat lipolýzu. Zelený čaj může mít také termogenní účinky, které jsou vyvolány synergickým působením kofeinu a katechinů. (Cabrera et al. 2006) Některé studie prokazují snížení množství tělesného tuku a s ním také snížení cholesterolu a krevního tlaku po užívání výtažku ze zeleného čaje. (Nagao et al. 2007) Neslazený zelený čaj neobsahuje žádné kalorie a proto může být vhodným nápojem například při redukčních dietách. (Wachendorf 2007)

3.4.7 ANTIDIABETICKÝ ÚČINEK ZELENÉHO ČAJE

Epidemiologické a laboratorní studie prokazují, že výtažky ze zeleného čaje mají pozitivní vliv na glukózovou toleranci a citlivosti k inzulinu. (Cabrera et al. 2006) Výzkumy ukazují, že za tento účinek jsou zodpovědné katechiny společně s polysacharidy, které se v zeleném čaji nacházejí. Mohou tak přispět i k prevenci diabetu. (Lübeck 2007) Nejúčinnější látkou v zeleném čaji je EGCG, která může zvýšit činnost inzulinu a regulovat hladinu glukózy v krvi. (Cabrera et al. 2006) U diabetických pacientů je také dvakrát až šestkrát vyšší pravděpodobnost patogeneze cévních onemocnění, jako je ateroskleróza. Katechiny mají antitrombotické účinky, čímž mohou napomáhat prevenci u diabetiků. (Crespy a Williamson 2004)

3.4.8 ANTIBAKTERIÁLNÍ A ANTIVIROVÝ ÚČINEK ZELENÉHO ČAJE

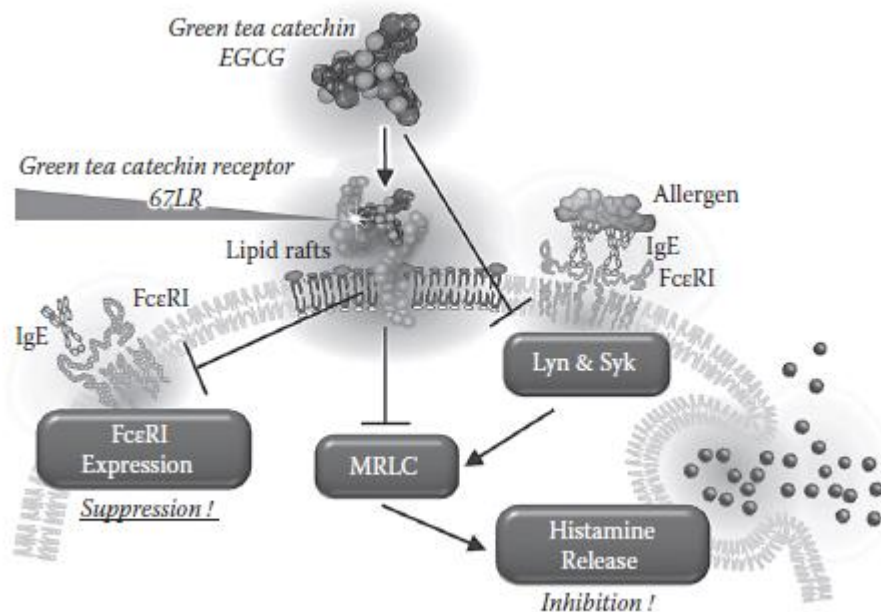
Katechiny v zeleném čaji mají antibakteriální a antivirový účinek. Inhibují růst a reprodukci mnohých bakterií, například druhů *Salmonella*, *Clostridium* či *Bacillus*. (Cabrera et al. 2006) Vysoká citlivost bakterií na katechiny byla pozorována také například k druhům *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio metchnikovii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Plesiomonas shigelloides* či *Aeromonas sobria*. (Hara 2001) Také byly zjištěny účinky katechinů proti infekci *Helicobacter pylori*. (Cabrera et al. 2006) Polyfenoly mohou působit také proti alimentárním patogenním bakteriím, které mohou způsobit až smrtelné otravy. (Hara 2001)

Jsou prokázány účinky zeleného čaje proti počáteční fázi viru chřipky, polyfenoly snižují infekčnost chřipky typu A a B a také viru Herpes simplex. (Cabrera et al. 2006) Výzkumy japonského institutu Aichi také prokázaly, že katechiny v zeleném čaji mohou inhibovat rozmnožování viru HIV. (Lübeck 2007)

Katechiny mají také antifungální účinky, působí proti *Candida albicans* a užití zeleného čaje společně s antimykotikem může snížit nežádoucí účinky antimykotik. Již od starověku byl zelený čaj užíván proti tyfu a jakémukoli typu průjmu. (Cabrera et al. 2006; Hara 2001)

3.4.9 ZELENÝ ČAJ A ALERGIE

Alergie je porucha imunitního systému. Mezi typy alergií patří astma, alergická rýma či ekzém. V krvi narůstá počet žírných buněk, eozinofilů a imunoglobulinu E (IgE). Degranulace žírných buněk způsobí uvolnění mediátorů zánětu, což nakonec může vyústit v zánět. Některé katechiny, konkrétně EGCG a ECG jsou schopny díky vazbě na specifické receptory inhibovat degranulaci žírných buněk a uvolňování mediátorů zánětu, jako například histaminu (Obrázek 13). (Lekh 2013)



Obrázek 13: Mechanismus inhibice uvolňování histaminu z žírných buněk (Lekh 2013)

3.5 NEGATIVNÍ ÚČINKY ZELENÉHO ČAJE

Konzumace zeleného čaje je bezpečná. Kromě všech pozitivních účinků zeleného čaje pro zdraví však existuje i několik nežádoucích účinků, které jsou s konzumací čaje spojeny. Tyto účinky mohou korelovat s obsahem kofeinu, přítomností hliníku v zeleném čaji či účinkem polyfenolů na sníženou biologickou dostupnost železa. (Cabrera et al. 2006; Lübeck 2007)

3.5.1 KOFEIN

Větší množství kofeinu může způsobit snížení kvality spánku. Zelený čaj obsahuje méně kofeinu než čaje fermentované, například čaj černý, ale i přesto není jeho konzumace vhodná například při větší citlivosti na xanthiny. (Cabrera et al. 2006) Také děti by neměly pít zelený čaj z důvodu vyšší citlivosti na povzbuzující látky, jako je kofein. (Lübeck 2007) Mezi nežádoucí účinky kofeinu patří nervozita, poruchy spánku, zvracení, bolesti hlavy či tachykardie. Obdobné nežádoucí účinky může způsobit i theofylin, ale pouze ve velmi vysokých dávkách. (Cabrera et al. 2006)

Kromě zvýšené citlivosti na kofein se může objevit alergická reakce také na další obsahové látky v zeleném čaji, například právě na polyfenoly. (Lübeck 2007)

3.5.2 HLINÍK

Zelený čaj má schopnost akumulovat v sobě vysoké dávky hliníku. Tato skutečnost je důležitá pro pacienty trpící renálním selháním, protože zvýšené množství hliníku v organismu může způsobit neurologická onemocnění. Množství hliníku v organismu se dává do spojitosti s výskytem neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba. (Cabrera et al. 2006)

3.5.3 INTERAKCE SE ŽELEZEM

Katechiny v zeleném čaji způsobují sníženou biologickou dostupnost železa z potravy. Tento účinek je platný převážně na nehemové železo při současném podání s čajem. Vstřebávání hemového železa například z vařeného masa čajem ovlivněno není. (Yang et al. 2000) Čaj by přesto neměl být často užíván pacienty trpící anémií z nedostatku železa. Snížení interakcí mezi čajem a železem lze zmírnit přidáním citronu do čaje, případně konzumací čaje mezi jídly. (Cabrera et al. 2006)

3.5.4 INTERAKCE S LÉČIVY

Zelený čaj by neměl být užíván současně s některými léčivy. Vstřebávání léčivých přípravků obsahujících železo či vápník může být zeleným čajem negativně ovlivněno, protože při současném podání s polyfenoly může docházet k interakcím s některými ionty. (Crespy a Williamson 2004; Lübeck 2007)

Existují další léčiva, u kterých je nevhodné současné užití se zeleným čajem. Mezi ně například patří:

Benzodiazepiny - kofein obsažený v zeleném čaji může snižovat sedativní účinky těchto léčiv.

Betablokátory, konkrétně metoprolol, propranolol - kofein obsažený v zeleném čaji může zvyšovat krevní tlak a tak snižovat účinky těchto léčiv.

Warfarin - zelený čaj obsahuje vitamin K, který antagonizuje účinky warfarinu a tak může snižovat jeho účinek.

Efedrin - užití společně se zeleným čajem může způsobit neklid, třes a nespavost.

Lithium - zelený čaj snižuje hladinu lithia v organismu, což může zapříčinit snížení účinku tohoto léku.

Inhibitory monoaminoxidasy (IMAO) - společné užití těchto léků, antidepresiv a zeleného čaje může způsobit zvýšení krevního tlaku až hypertenzní krizi.

Naopak zelený čaj může zvyšovat účinek některých antibiotik, například betalaktámových nebo chinolonových. (Ehrlich 2011)

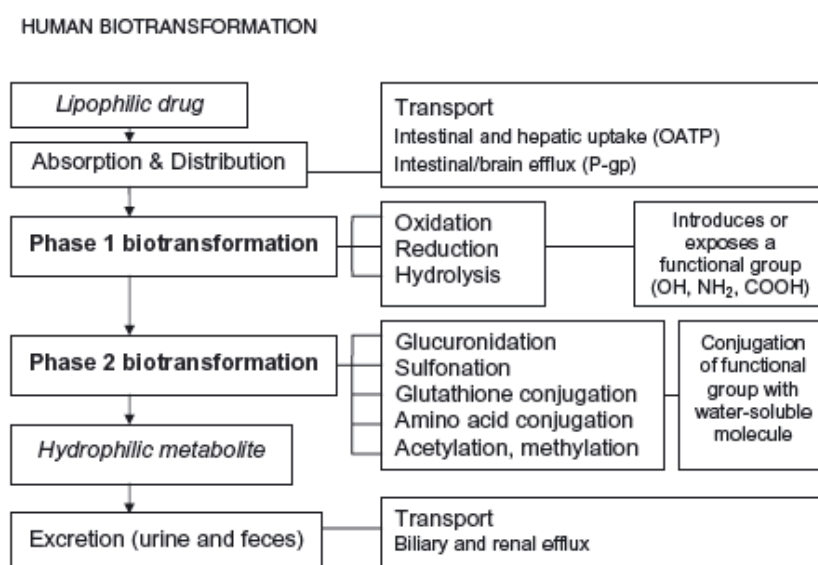
3.6 BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY

Biotransformace je proces chemické modifikace látek katalyzovaný enzymy. Chemická biotransformace zvyšuje rozpustnost látek ve vodě a tím je usnadněno jejich odstranění z organismu. (Nassar 2010) Biotransformační enzymy jsou enzymy, které metabolizují jak endogenní látky, tak také xenobiotika, což jsou cizorodé látky v organismu. Biotransformace je prováděna omezeným počtem enzymů, které mají širokou substrátovou specifitu. (Parkinson 2001)

Existují dvě fáze biotransformace. První fáze se nazývá konverze a enzymy, které ji metabolizují, mohou být oxidační, redukční a hydrolytické. Enzymy transformující druhou fázi metabolismu se nazývají konjugační. Mezi oxidační enzymy první fáze, při které enzym reaguje s funkčními skupinami substrátu, lze zařadit například cytochromy P450, flavinové monooxygenasy, peroxidasy, alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy, xanthinoxidasy, či monoaminoxidasy. Jako reduktasy se v organismu vyskytují například aldoketoreduktasy, nebo dehydrogenasy, jako například karbonylreduktasy. Mezi hydrolasy, které katalyzují hydrolytické štěpení, patří například esterasy nebo peptidasy. Právě enzymy první fáze svou konverzí připravují molekulu substrátu na druhou fázi, konjugaci. (Knejzlík et al. 2000)

Druhá fáze biotransformace probíhá po dodání energie za vzniku tzv. konjugátů. Konjugáty jsou většinou hydrofilnější než původní sloučeniny a tak se snadněji mohou eliminovat z organismu. Dle své struktury se sloučeniny mohou vázat s různými konjugačními enzymy. Mezi základní typy enzymatické přeměny druhé fáze biotransformace patří glukuronidace, sulfonace, konjugace s glutathionem, acetylace,

metylace či konjugace s aminokyselinami (jako je glycin, taurin či glutamová kyselina). (Nassar 2010; Skálová a Boušová 2011) Právě chemická struktura látek určuje, jaké enzymy se účastní jejich metabolismu. Některé látky mohou být metabolizovány i přímo konjugací bez účasti enzymů první fáze. A naopak některé již konjugované substráty mohou být metabolizovány enzymy první fáze. Obrázek 14 znázorňuje základní schéma hlavních cest biotransformace lipofilního substrátu v lidském organismu. Konjugovaný hydrofilní metabolit se vylučuje nejčastěji močí, žlučí či stolicí. (Nassar 2010)



Obrázek 14: Cesty biotransformace v lidském organismu (Nassar 2010)

Největší část biotransformačních enzymů se vyskytuje v játrech, kde také nejčastěji probíhá enzymatická přeměna. (Nassar 2010)

V následujících odstavcích přiblížím vybrané biotransformační enzymy, které byly vybrány pro náš experiment a u kterých byla měřena jejich aktivita v subcelulárních frakcích jater a tenkého střeva.

3.6.1 ALDOKETOREDUKTASY

Aldoketoreduktasy (AKR) jsou monomerní enzymy katalyzující první fázi metabolismu. (Mindnich a Penning 2009; Penning a Drury 2007) Do nadrodiny AKR

patří velké množství enzymů z 15 různých rodin (AKR1 až AKR15). Jejich kofaktorem je NADPH. Vyskytují se v cytosolu různých tkání organismu. Vykazují nízkou substrátovou selektivitu. Substrátem těchto enzymů jsou karbonylové sloučeniny, alifatické i aromatické aldehydy a ketony, které jsou redukovány na primární a sekundární alkoholy. Metabolizují ale také ketoprostaglandiny, ketosteroidy či retinoidy. (Mindnich a Penning 2009; Skálová a Boušová 2011) Vazba kofaktoru předchází vazbě karbonylu, následně se uvolní alkohol a NADP⁺. (Penning a Drury 2007)

Mezi tělu vlastní substráty patří například isokortikosteroidy či oxidované fosfolipidy, z xenobiotik je substrátem například akrolein, doxorubicin nebo naltrexon a také potenciální metabolity chemické karcinogeneze. Mezi lidské isoformy patří například AKR1A1, aldehydreduktasa, která se vyskytuje nejvíce v ledvinách tubulech. (Mindnich a Penning 2009; Penning a Drury 2007; Skálová a Boušová 2011)

3.6.2 KARBONYLREDUKTASY

Karbonylreduktasy (CBR) jsou monomerní enzymy patřící do nadrodiny dehydrogenas s krátkým řetězcem (SDR). (Skálová a Boušová 2011; Wermuth et al. 1988) Vykazují širokou substrátovou specifitu. (Škarydová a Wsól 2012) Vyskytují se v cytosolu a hladkém endoplazmatickém retikulu v různých tkáních organismu, například v játrech, ledvinách či mozkových tkáních. CBR katalyzují NADPH-dependentní redukční reakce. Substrátem bývají nejčastěji ketony a chinony. Také jsou schopny katalyzovat reakci některých aldehydů na primární alkoholy či ketonů na alkoholy sekundární. (Parkinson 2001; Skálová a Boušová 2011)

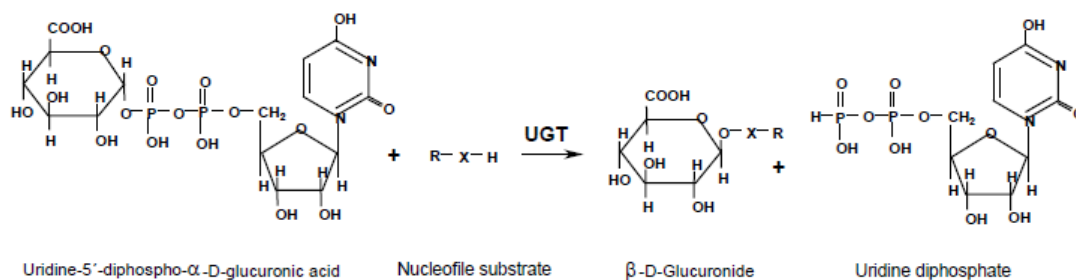
Mezi endogenní substráty patří některé steroidy, eikosanoidy, kofaktory či neurotransmitery, xenobiotické substráty jsou menadion, doxorubicin, haloperidol, warfarin a další. (Pílka et al. 2009; Skálová a Boušová 2011) Mezi nejznámější lidské karbonylreduktasy patří CBR1 a CBR3. (Škarydová a Wsól 2012)

3.6.3 UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASA

Glukuronidace je enzymatická konjugační reakce s kyselinou glukuronovou. Reakci zprostředkovává enzym UDP-glukuronosyltransferasa (UGT). Tato reakce je nejčastější biotransformační cestou druhé fáze u všech savců (kromě kočkovitých

šelem). (Skálová a Boušová 2011) U lidí je touto cestou metabolizováno přibližně 40 až 70 % léků. (Jancová et al. 2010) Kofaktorem této reakce je UDP- glukuronová kyselina (UDP-GA). Méně často se místo ní vyskytuje jako kofaktor UDP-glukosa, UDP-xylosa či UDP-galaktosa. Právě oxidací UDP-glukosy v cytosolu vzniká UDP-GA. (Nassar 2010; Skálová a Boušová 2011) UGT jsou integrální membránové proteiny, které jsou umístěny uvnitř endoplazmatického retikula. Vyskytují se v játrech, žaludku, střevech, ledvinách, nosní sliznici, v mozku i kůži. (Luukkanen 2005; Skálová a Boušová 2011)

Reakce probíhá přenosem elektronu, substrát obsahuje nukleofilní heteroatom s kyslíkem, dusíkem nebo sírou. Princip mechanismu reakce UGT se substrátem je přiblížen na Obrázku 15. Podle funkční skupiny mohou vznikat O-glukuronidy, N-glukuronidy, S-glukuronidy nebo také C-glukuronidy. Substrát O-glukuronidů ve své molekule obsahuje funkční skupiny, jako jsou alifatické alkoholy a fenoly či karboxylové kyseliny, u N-glukuronidů aminy či amidy, S-glukuronidů thioly.



Obrázek 15: Mechanismus přenosu elektronu enzymem UGT nukleofilního substrátu a vznik glukuronidu (Jancová et al. 2010)

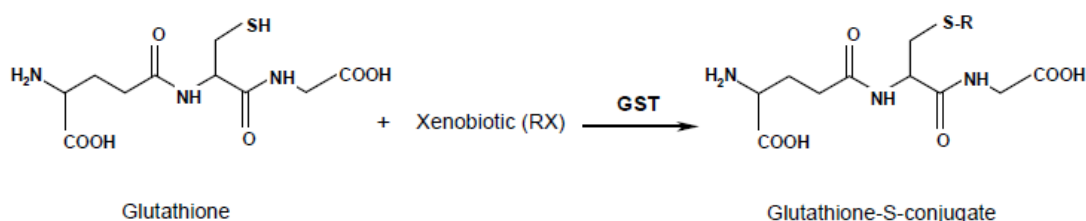
Reakcí vzniká hydrofilnější a méně biologicky aktivní metabolit, který je z organismu vylučován močí či žlučí v závislosti na molekulové hmotnosti metabolitu. Mezi tělu vlastní substráty patří například bilirubin, steroidní hormony či hormony štítné žlázy, z xenobiotik podléhá glukuronidaci například paracetamol, kodein, oxazepam, ibuprofen, diklofenak nebo polycyklické aromatické uhlovodíky. (Nassar 2010; Parkinson 2001; Skálová a Boušová 2011) Existuje více než 100 typů enzymů UGT v několika rodinách, pro člověka jsou důležité rodiny UGT 1 a 2,

v lidském organismu najdeme také rodiny UGT 3 a 8. (Jancová et al. 2010; Skálová a Boušová 2011)

3.6.4 GLUTATHION-S-TRANSFERASA

Reakce s glutathionem jako kofaktorem je konjugační reakcí pro některé endogenní látky i xenobiotika. Enzymem je glutathion-S-transferasa (GST). Glutathion je endogenní tripeptid syntetizovaný v organismu dvoufázovou reakcí z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Enzym GST se v organismu vyskytuje převážně v cytoplazmě jater, střev, ledvin, mozkové tkáni, kosterního svalstva, plicích či placentě.

Substráty jsou látky obsahující elektrofilní atom, jako například epoxidy, isokyanáty, alkyl a arylhalogenidy či nenasycené ketony. Díky vysoké koncentraci glutathionu v játrech může ke konjugaci docházet jak spontánně, tak enzymatickou reakcí, díky které se konjugace urychlí. (Parkinson 2001; Skálová a Boušová 2011) Reakce probíhá mezi atomem síry glutathionu a elektrofilním atomem substrátu. (Ioannides 2002) Biotransformací vznikají thioetherové konjugáty substrátu s glutathionem (Obrázek 16) rozpustné ve vodě a snadněji odbouratelné žlučí, nebo mohou vznikat deriváty merkapturové kyseliny, které jsou odbouratelné močí. (Jancová et al. 2010; Skálová a Boušová 2011)



Obrázek 16: Konjugace glutathionu s xenobiotikem a vznik konjugátu (Jancová et al. 2010)

Mezi endogenní substráty patří například menadion, leukotrieny, prostaglandiny či některé steroidy. Z exogenních látek glutathion konjuguje například cyklofosfamid, cisplatinu, morfin, simvastatin či spironolakton. (Parkinson 2001; Skálová a Boušová 2011) Existují dvě lidské nadrodiny GST, cytosolická a mikrosomální. Nadrodina

cytosolických GST se dělí do osmi tříd (Alfa, Kappa, Mí, Pí, Sigma, Théta, Zéta a Omega). (Jancová et al. 2010; Skálová a Boušová 2011)

4. CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- 1) Sledovat vliv podávání extraktu ze zeleného čaje (polyfenonu) na aktivity vybraných biotransformačních enzymů (GST, UGT, CBR, AKR) v subcelulárních frakcích homogenátu jater a tenkého střeva u obézních a normálních skupin myší.
- 2) Porovnat aktivity vybraných biotransformačních enzymů u myší normálních a myší obézních.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE

5.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Subcelulární frakce homogenátu jater a tenkého střeva myších samců

5.1.2 PŘÍSTROJE

- Snímač Tecan
- Třepačka Thermomixer Comfort Eppendorf
- Stolní centrifuga Eppendorf
- Centrifuga Heraeus
- Ultracentrifuga Beckman
- Analytické váhy Scaltec
- Magnetická míchačka IKA
- Přístroj na elektroforézu Bio-Rad
- Blotovací přístroj BioRad Trans Blot Turbo
- Digitální pH metr Sartorius
- Kývačka
- Třepačka na mikrozkuřavky IKA minishaker
- Mrazicí box Heraeus

5.1.3 POMŮCKY

Pipety, multikanálové pipety, pipetovací špičky, mikrozkuřavky, stojánky na mikrozkuřavky, lihový fix, nůžky, kádinky, falkonky, latexové rukavice, pinzeta, odměrné baňky, odměrné válce, lžička, skleněná tyčinka, nádoby na led, vyhříváná podložka, jehly, stříkačky, erlenmayerovy baňky, centrifugační kyvety, 96 - jamkové destičky Gama, nalévací stojánek, sklo, sklo se spacerem, spony, hřeben, filtrační papír,

plastové krabičky s víčkem, fotomisky, kazeta, RTG filmy, fotopinzeta, eurofolie, membrána

5.1.4 CHEMIKÁLIE

Glutamát sodný, chlorid sodný (Lachema), glycerol, NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA, 4% CuSO₄.6 H₂O, Na₂HPO₄ (Penta), NaH₂PO₄ (Penta), GSH, CDNB, p-nitrofenol (Fluka), UDP- glukuronová kyselina (Sigma), Slovasol (Lachema), trichloroctová kyselina, NaOH (Lachema), K₂HPO₄ (Penta), KH₂PO₄ (Penta), menadion (Sigma), NADPH (Serva), DL- glyceraldehyd, acenaftenol, NADP⁺ (Merck), akrylamid, bis- akrylamid, TRIS (Lach-Ner), SDS, bromfenolová modř, isobutanol, persíran amonný (Lachema), glycin, metanol (Penta), Tween 20 (Sigma), polyfenon (Sigma)

5.2 METODIKA

5.2.1 NAVOZENÍ OBEZITY U NMRI MYŠÍ GLUTAMÁTEM SODNÝM

K navození obezity byla využita metoda pomocí glutamátu sodného (monosodium glutamát, MSG) (Maletínská et al. 2006; Matyšková et al. 2008). Subkutánní aplikace MSG novorozeným myším způsobí vznik lézí v nucleus arcuatus hypothalami (ARC), což vede k narušení leptinové a insulinové signalizace v této oblasti mozku. Tato zvířata jsou obézní (zpomalení metabolismu způsobí zvýšení podílu tuku), ačkoliv přijímají spíše méně potravy. U samců i samic se rozvíjí leptinová rezistence (do dvou až čtyř měsíců), u samců navíc i insulinová rezistence. Výrazné smrštění ARC naruší produkci somatoliberinu (GHRH), čímž dojde ke zkrácení délky těla i ocasu, atrofii hypofýzy, gonád a optických nervů.



Obrázek 17: *Obézní myš s leptinovou i inzulinovou resistencí*

Použité roztoky:

MSG (10 mg/50 μ l » 1,07 M » 2,14 osm/l): Bylo naváženo 5 g MSG a doplněno do 25 ml aqua pro inj.

NaCl (10 mg/50 μ l » 2,14 osm/l): Bylo naváženo 1,5618 g NaCl a doplněno do 25 ml aqua pro inj.

Všechny roztoky byly rozpipetovány do mikrozkušavek po 1 ml a uchovávány v lednici.

Postup práce:

Myším byl podáván od druhého dne po narození roztok MSG nebo NaCl (se stejnou osmolalitou jako MSG), celkem dostaly 90 mg MSG nebo NaCl za 7 dní. Roztoky byly podávány subkutánně do kožní řasy na zádech. Místnost byla vyhřáta teplometem, roztoky předehřáty v thermomixeru na 37 °C. Výstelkou byly vyplněny dvě myší bedýnky. Z jedné byla myšata odebírána a do druhé byla k matce vracena. Každé myše bylo položeno na vyhřívanou podložku, aby neprochladlo, opatrně mu bylo vpíchnuto 50 μ l daného roztoku, přebytečná kapka roztoku byla otřena buničinou a poté bylo vráceno k matce do klece. Na jednu myší rodinu byla použita jedna jehla a jedna mikrozkušavka příslušného roztoku.

Myším bylo podáváno buď MSG 10 mg/50 μ l (skupiny obézních myší), nebo NaCl 10 mg/50 μ l (skupiny normálních myší) 2. - 8. den po narození.

K aplikaci byly použity jehly Terumo, Neolus (0,4 x 20 mm) a stříkačky Terumo o objemu 1 ml.



Obrázek 18: *Myši po podání MSG*

5.2.2 PŘÍPRAVA SUBCELULÁRNÍCH FRAKČÍ

Den před dekapitací myší bylo nahlášeno do vivaria, aby myši byly 12 hodin bez potravy.

Myši byly usmrceny v celkové anestezii dislokací krční páteře. Ihned po usmrcení jim byla odebrána krev z aorty a byla vyjmuta játra a střevo. Orgány byly promyty ledově vychlazeným roztokem PBS (střevo navíc byla propláchnuta roztokem PBS s přidavkem inhibitorů proteas), ihned zmrazeny v suchém ledu a následně uskladněny v hluboko mrazicím boxu při -80 °C.

Před přípravou subcelulárních frakcí bylo nutné připravit do chladicí místnosti, ve které celá práce probíhala: 0,1 M sodno-fosfátový pufr, pH 7,4 a stejný pufr s 20 % glycerolu, centrifugační kyvety – 2 x 8 ks (50 ml), homogenizátor 30 ml s pístem, nádobu s ledem a vodou, buničinu, 2x erlenmayerovu baňku (100 - 250 ml) na pufr a pufr s glycerolem, 1x injekční stříkačku (20 ml) + dlouhou jehlu, míchačku, míchadlo, kádinky (na cytosol a mikrosomy), stojánky s mikrozkuvkami, zamražovací stojánky, pipetu 5 ml, 1 ml, špičky, nůžky a pinzetu, skleněnou tyčinku na resuspendaci

mikrosomů, lihový fix, miskou s drceným ledem, malé mističky - 8 ks v krabičce s ledítkem.

Také byly vychlazeny rotory a centrifugy (Heraeus, Beckman).

Játra i střeva byla částečně rozmrazena, rozvážena do malých mističek (ležících na ledítku) po 5 g v sudém počtu (max. 8 dávek, což je kapacita centrifug). Játra i střeva byla rozstříhána na menší kousky, z jedné mističky byl biologický materiál přenesen do 30 ml homogenizátoru a bylo přilito 15 ml 0,1 M sodno-fosfátového pufru, pH 7,4. Směs se zhomogenizovala mísením nahoru a dolů (alespoň 3x), poté byla přelita do centrifugační kyvety stojící v ledu, píst a homogenizátor se vypláchl 15 ml pufru a ten byl také přilít do centrifugační kyvety.

Kyvety byly vloženy do centrifugy Heraeus, ve které byl rotor #3335. První centrifugace probíhala při 5000 g, 20 minut, 4 °C (program 3). Jako peleta zůstaly potrhané buněčné membrány, vazivo, cévy, jádra. Poté byl přelit supernatant do čistých kyvet a ve stejném rotoru probíhala druhá centrifugace při 20000 g, 60 minut, 4 °C (program 4). Jako peleta zůstaly mitochondrie. Supernatant byl opatrně a bez kalu slit do centrifugačních kyvet pro ultracentrifugu Beckman, kyvety byly plněny maximálně do tří čtvrtin, vždy byly dvě proti sobě vyváženy a uzavřeny víčkem. Byly vloženy do rotoru, víko rotoru bylo zašroubováno, zavřeno a centrifuga byla spuštěna na 105 000 g, 65 minut, 4 °C.

Pro získání cytosolu byl po ultracentrifugaci odebrán supernatant, který byl za stálého míchání rozpipetován do mikrozkuhavek a dán zamrazit.

Pro získání mikrosomů bylo nutno peletu získanou ultracentrifugací resuspendovat malým homogenizačním pístem v 5 ml pufru, doplnit kyvety a znovu stočit v ultracentrifuze. Po skončení točení byl supernatant vylit, peleta resuspendována malým homogenizačním pístem vždy v tolika mililitrech pufru s 20 % glycerolem, kolik gramů bylo jater či střev. Směs byla přelita do kádinky a byla zhomogenizována v ultrazvukové lázni. Nakonec byla za stálého míchání na míchačce rozpipetována do mikrozkuhavek a dána zamrazit.

5.2.3 STANOVENÍ BÍLKOVINY POMOCÍ BCA

Tato metoda (Smith et al. 1985) je založena na reakci proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^{1+} , která vytváří v prostředí kolem pH 10

stabilní modrofialový komplex s BCA (bicinchoninic acid). Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství bílkoviny (absorbance komplexu se měří při 562 nm).

Použité roztoky:

Roztok A: NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH

Roztok B: 4% CuSO₄.6 H₂O

Pracovní roztok C byl připraven smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1

Postup:

a) Kalibrační křivka:

Výchozí roztok hovězího sérového albuminu (BSA) byl 20 %, tzn. 0,5 ml 20 % BSA bylo doplněno do 10 ml redestilovanou vodou, čímž vznikl 1 % roztok BSA.

	Koncentrace	roztok 1 % BSA	destilovaná voda	roztok 0,1 % BSA	destilovaná voda
1	0 µg/ml	0 µl	500 µl	0 µl	100 µl
2	200 µg/ml	10 µl	490 µl	20 µl	80 µl
3	400 µg/ml	20 µl	480 µl	40 µl	60 µl
4	600 µg/ml	30 µl	470 µl	60 µl	40 µl
5	800 µg/ml	40 µl	460 µl	80 µl	20 µl
6	1000 µg/ml	50 µl	450 µl	100 µl	0 µl

b) Vlastní stanovení koncentrace proteinů:

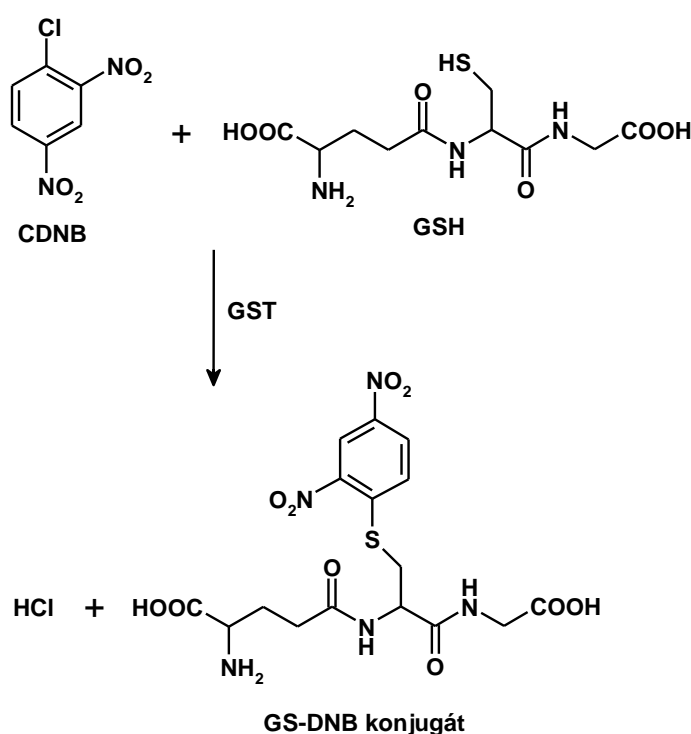
Mikrosomy nebo cytosol bylo nutno naředit 20x redestilovanou vodou u jater, 10x u střev, vždy byla provedena dvě ředění, z každého ředění byly použity 4 vzorky (2 x 4 paralelní měření pro jedny mikrosomy či cytosol).

Játra bylo nutno 20x naředit, bylo smíseno 10 mg bílkoviny se 190 mg redestilované vody. Střeva bylo nutno naředit 10x, bylo smíseno 10 mg bílkoviny s 90 mg redestilované vody.

K měření byly použity 96 - jamkové destičky (Gama), do každé jamky bylo pipetováno vždy 10 μ l vzorku bílkoviny (obsah bílkoviny 100 až 1000 μ g), 200 μ l pracovního roztoku C, jako slepý vzorek byla pipetována místo bílkoviny destilovaná voda. Destička se dobře promíchala a nechala inkubovat 30 minut při 37 °C. Poté byla na přístroji Tecan změřena absorbance při 562 nm proti destilované vodě. Od absorbance vzorků byl odečten průměr absorbancí slepých vzorků.

5.2.4 STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHION-S-TRANSFERASY

Měření aktivity GST (Ye a Zhang 2001) je založeno na tvorbě GSH-CDNB konjugátu, který má absorpční maximum při 340 nm (Obrázek 19).



Obrázek 19: Mechanismus vzniku GS-CDNB konjugátu (Ye a Zhang 2001)

Použité roztoky:

0,1 M sodno-fosfátový pufr (pH 6,5): Bylo naváženo 1,79 g Na_2HPO_4 do 50 ml odměrné baňky a doplněno redestilovanou vodou do jedné kádinky a 1,56 g NaH_2PO_4

do 100 ml odměrné baňky a doplněno redestilovanou vodou do druhé. Tyto roztoky byly smíchány přibližně v poměru 1:3 a bylo upraveno pH na 6,5.

Roztok GSH: 5,15 mM GSH v 0,1 M Na-fosfátovém pufru (pH 6,5) – na jednu destičku bylo naváženo 7,92 mg GSH a rozpuštěno v 5 ml 0,1 M sodno-fosfátovém pufru pH 6,5. Roztok byl uchováván v lednici.

Roztok CDNB: 51,5 mM CDNB v ethanolu – na jednu destičku bylo naváženo 5,22 mg CDNB a rozpuštěno v 0,5 ml ethanolu. Roztok byl uchováván v lednici.

Master mix: Byl připraven těsně před stanovením, na jednu destičku byly napipetovány 4 ml GSH, 0,4 ml CDNB a 15,6 ml 0,1 M sodno-fosfátového pufru a smíseny.

Průběh stanovení:

Měření probíhalo na přístroji Tecan. Stanovení probíhalo v 96 - jamkových destičkách s plochým dnem (Greiner).

Do šesti jamek v každém sloupci bylo napipetováno 6 μ l cytosolu (u jater 10x ředěných puftrem PBS s pH 7,4, u střev cytosol ředěn nebyl) a do dvou spodních jamek ve všech sloupcích bylo napipetováno 6 μ l pufru (blank). Do všech jamek bylo poté napipetováno 194 μ l master mixu multikanálovou pipetou (pipetováno po řádcích). Destička byla poté lehce protřepána, vložena do Tecanu a byla spuštěna metoda.

Přístroj měřil absorbanci 6x v minutových intervalech při 340 nm. Poměr konjugovaného substrátu byl vypočítán z odečtené absorbance po jedné minutě s použitím extinkčního koeficientu 9,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ při 340 nm (byla změřena výška roztoku v jamce). Jednotka enzymové aktivity U je definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu 1 μ mol S-2,4-dinitrofenyl-glutathionu za 1 minutu (použitím 1 mM GSH a 1 mM CDNB). Specifická aktivita je vyjádřena jako počet jednotek/ mg proteinu.

5.2.5 STANOVENÍ AKTIVITY UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASY

Stanovení je založeno na přeměně žlutě zbarveného p-nitrofenolu na bezbarvý glukuronid.

Zásobní roztoky:

Substrát: p-nitrofenol ($M_r=139$) 1 mM: 1,39 mg bylo rozpuštěno v 10 ml vody

Konjugační činidlo: UDP-GA ($M_r = 631$) 2 mM: 1,26 mg bylo rozpuštěno v 1 ml vody

Detergent: Slovasol: 50 mg bylo rozpuštěno v 1 ml vody

Tris/HCl pufr pH 7,4: 0,5 g Tris bylo rozpuštěno v 10 ml vody, bylo upraveno pH 1 M HCl na 7,4 a roztok byl doplněn do 15 ml

Deproteinizační roztok: 3% trichloroctová kyselina (TCA): 3 g TCA byly rozpuštěny ve 100 ml vody

Neutralizační roztok: 1 M NaOH

Průběh stanovení:

Do stojánku v ledu byly připraveny mikrozkušavky, každý vzorek byl připraven ve čtyřech paralelních měřeních + 2 slepé vzorky. Mikrosomy o známé koncentraci proteinů byly rozmrazeny, potřebné množství bylo odpipetováno a byl přidán objem roztoku detergentu, aby poměr detergent:protein byl 1:2. Směs byla promíchána a nechala se inkubovat 20 minut v lednici. Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno: 50 μ l pufru, 20 μ l UDP-GA (vzorek) nebo vody (slepý vzorek), 20 μ l p-nitrofenolu a 10 μ l mikrosomů s detergentem.

Inkubační směs byla promíchána a nechala se inkubovat v thermomixeru 30 minut při 37 °C a za mírného třepání. Mikrozkušavky byly přemístěny zpět do ledu a bylo přidáno 50 μ l TCA, promícháno a nechaly se stočit na stolní centrifuze (5000 ot/min, 5 minut). Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno do každé jamky 50 μ l roztoku NaOH (jamky podle počtu vzorků), do první jamky (A_1) destilovaná voda. Do jamek s NaOH bylo přeneseno vždy 50 μ l inkubační směsi. Na přístroji Tecan byla změřena absorbance při 415 nm a vypočítána koncentrace konjugovaného p-nitrofenolu z molárního absorpčního koeficientu ($\epsilon=18,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

5.2.6 STANOVENÍ AKTIVITY KARBONYLREDUKTASY POMOCÍ MENADIONU

Metoda (Maté et al. 2008) je založena na inkubaci subcelulární frakce se substrátem menadionem. Redukce menadionu karbonylreduktasou je doprovázena oxidací NADPH, což je fotometricky zaznamenáváno jako pokles absorbance. Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu $\text{NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas. Měření je prováděno na přístroji Tecan.

Zásobní roztoky:

pufr: 0,1 M draselno-fosfátový pufr, pH 7,4

K_2HPO_4 : 8,71 g bylo rozpuštěno v 500 ml vody

KH_2PO_4 : 2,72 g bylo rozpuštěno v 200 ml vody

Roztoky K_2HPO_4 a KH_2PO_4 byly míseny do dosažení pH 7,4.

menadion ($M=172,18$; 50 mM): 8,61 mg bylo rozpuštěno v 1 ml ethanolu

NADPH ($M=833$; 5 mM): 6,25 mg bylo rozpuštěno v 1,5 ml redestilované vody

Pipetované množství na jednu jamku: 178 μl pufru, 2 μl menadionu, 10 μl NADPH, 10 μl cytosolu

Koncentrace v jamce (celkový objem 200 μl): 500 μM menadionu, 250 μM NADPH

Průběh stanovení:

Do jamek 96 - jamkové destičky (Gama) bylo napipetováno 10 μl cytosolu (slepý vzorek – 0,1 M sodno-fosfátový pufr pH 7,4), každý vzorek byl napipetován 6x, 2x slepý vzorek a destička se nechala inkubovat 5 minut při 37 °C. Poté bylo přidáno 190 μl mastermixu.

Příprava mastermixu na jednu destičku:

- pufr 21,36 ml
- menadion 240 μ l
- NADPH 1200 μ l

Mastermix byl přidán multikanálovou pipetou, destička byla vložena do přístroje Tecan. Proběhlo měření poklesu absorbance po dobu 5 minut při 340 nm.

Vyhodnocení:

Průměrný pokles absorbance za minutu ($\Delta A/\text{min}$) byl zjištěn z oblasti lineárního poklesu. Od A/min vzorku byl odečten A/min slepého vzorku. Pomocí molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla vypočítána koncentrace spotřebovaného NADPH/min.

Výpočet aktivity:

$$\text{aktivita} = \frac{(\Delta A_{\text{vz}} - \Delta A_{\text{sl}}) \cdot V_i \cdot 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_s} \text{ [nmol/min/ml]}$$

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

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

V_s objem biologické frakce, tj. 0,010 ml

Jednotky aktivity byly přepočítány na mg proteinu.

5.2.7 STANOVENÍ AKTIVITY ALDEHYDREDUKTASY (AKR1A1) POMOCÍ GLYCERALDEHYDU

Stanovení aktivity redukčních enzymů (Ohara et al. 1995) je založeno na měření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25 °C). Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu $\text{NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas.

Jednotka enzymové aktivity (U) je definována jako oxidace 1 mol NADPH/min při 25 °C. Měření je prováděno na přístroji Tecan.

Zásobní roztoky:

Pufr (0,1 M draselno-fosfátový pufr, pH 6,0): Bylo smíšeno 0,1 M K_2HPO_4 s 0,1 M KH_2PO_4 tak, aby pH bylo 6,0

DL-glyceraldehyd (1 M), $M_r = 90,08$: 0,09008 g bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO

NADPH (4 mM), $M_r = 833,4$: 0,01665 g bylo rozpuštěno v 5 ml vody

Pipetované množství na jednu jamku: 170 μ l pufru, 2 μ l DL-glyceraldehydu, 10 μ l NADPH, 10 μ l cytosolu

Koncentrace v jamce (celkový objem 200 μ l): 10 mM DL-glyceraldehydu, 0,2 mM NADPH

Průběh stanovení:

Byly použity 96 - jamkové destičky (Gama). Do jamek bylo napipetováno 10 μ l cytosolu (u vzorku) či 10 μ l sodno-fosfátového pufru, pH 7,4 (u slepého vzorku) a multikanálovou pipetou bylo přidáno 190 μ l mastermixu.

Příprava mastermixu na jednu destičku:

- pufr 21,36 ml
- DL-glyceraldehyd 240 μ l
- NADPH 1200 μ l

Poté se destička vložila do přístroje Tecan a probíhalo měření poklesu absorbance po dobu 5 minut při 340 nm. Každý vzorek byl měřen ve čtyřech paralelních měřeních se dvěma jamkami slepého vzorku v každém sloupci.

Vyhodnocení:

Průměrný pokles absorbance za minutu ($\Delta A/\text{min}$) byl zjištěn z oblasti lineárního poklesu. Od hodnoty absorbance vzorku byla odečtena hodnota absorbance slepého

pokusu a pomocí molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla vypočítána koncentrace vzniklého NADPH/min. Jednotky aktivity byly přepočítány na mg proteinu.

Výpočet aktivity:

$$\text{aktivita} = \frac{(\Delta A_{\text{vz}} - \Delta A_{\text{sl}}) \cdot V_i \cdot 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_s} \text{ [nmol/min/ml]}$$

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

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

V_s objem biologické frakce, tj. 0,010 ml

5.2.8 STANOVENÍ AKTIVITY ALDOKETOREDUKTASY (AKR1C) POMOCÍ ACENAFTENOLU

Stanovení aktivity redukčních enzymů (Ohara et al. 1995) je založeno na měření vzrůstu absorbance způsobeném přeměnou NADP^+ na NADPH ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25 °C). Pomocí vzrůstu absorbance a molárního absorpčního koeficientu $\text{NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reductas. Jednotka enzymové aktivity (U) je definována jako oxidace 1 mol NADPH/min při 25 °C. Měření je prováděno na přístroji Tecan.

Zásobní roztoky:

puf (0,1 M TRIS/HCl puf, pH 8,9): 1,21 g TRIS bylo rozpuštěno v 70 ml redistilované vody, bylo upraveno pH na 8,9 a doplněno na 100 ml

acenaftenol (0,1 M): 17,02 mg bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO

NADP⁺ (20 mM): 23,6 mg bylo rozpuštěno v 1,5 ml redistilované vody

Pipetované množství na jednu jamku: 178 μ l pufru, 2 μ l acenaftenolu, 10 μ l NADP⁺, 10 μ l cytosolu

Koncentrace v jamce (celkový objem 200 μ l): 1 mM acenaftenolu, 1 mM NADP⁺

Průběh stanovení:

Byly použity 96 - jamkové destičky (Gama). Do jamek bylo napipetováno 10 μ l cytosolu (u slepého vzorku 10 μ l sodno-fosfátového pufru, pH 7,4) a multikanálovou pipetou přidáno 190 μ l mastermixu.

Příprava mastermixu na jednu destičku:

- pufr 21,36 ml
- acenaftenol 240 μ l
- NADP⁺ 1200 μ l

Destička byla vložena do přístroje Tecan, probíhalo měření vzrůstu absorbance po dobu 5 minut při 340 nm. Každý vzorek byl měřen ve čtyřech paralelních měřeních se dvěma jamkami slepého vzorku v každém sloupci.

Vyhodnocení:

Průměrný pokles absorbance za minutu ($\Delta A/\text{min}$) byl zjištěn z oblasti lineárního vzrůstu. Od A/min vzorku byl odečten A/min slepého vzorku. Pomocí molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla vypočítána koncentrace vzniklého NADPH/min. Jednotky aktivity byly přepočteny na mg proteinu.

Výpočet aktivity:

$$\text{aktivita} = \frac{(\Delta A_{\text{vz}} - \Delta A_{\text{sl}}) \cdot V_i \cdot 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_s} \text{ [nmol/min/ml]}$$

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

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

V_s objem biologické frakce, tj. 0,010 ml

5.2.9 STANOVENÍ AKTIVITY ALDOKETOREDUKTASY POMOCÍ 4-PYRIDINKARBOXALDEHYDU

Pyridinkarboxaldehyd je redukován v cytosolické frakci lidských jater aldehydreduktasou (AKR1A1). V dalších metabolických přeměnách mohou hrát roli dle novějších studií i AKR1C (Palackal et al. 2001). Stanovení aktivity redukčních enzymů (Ohara et al. 1995) je založeno na měření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25 °C). Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu $\text{NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reductas. Jednotka enzymové aktivity (U) je definována jako oxidace 1 mol NADPH/min při 25 °C. Měření je prováděno na přístroji Tecan.

Zásobní roztoky:

Pufr (0,1 M draselno-fosfátový puf, pH 6,0): bylo smíšeno 0,1 M K_2HPO_4 s 0,1 M KH_2PO_4 tak, aby pH bylo 6,0.

4-pyridinkarboxaldehyd (0,1 M), $M_r = 151,1$: 14 μl bylo rozpuštěno v 986 μl DMSO

NADPH (2 mM), $M_r = 833,4$: 4,33 mg bylo rozpuštěno ve 2,6 ml vody

Pipetované množství na jednu jamku: 170 μl pufu, 2 μl 4-pyridinkarboxaldehydu, 10 μl NADPH, 10 μl cytosolu

Koncentrace v jamce (celkový objem 200 μl): 10 mM 4-pyridinkarboxaldehydu, 0,2 mM NADPH

Průběh stanovení:

Byly použity 96 - jamkové destičky (Gama). Do jamek bylo napipetováno 10 μl cytosolu (u vzorku) či 10 μl sodno-fosfátového pufu, pH 7,4 (u slepého vzorku) a multikanálovou pipetou bylo přidáno 190 μl mastermixu.

Příprava mastermixu na jednu destičku:

- puf 21,36 ml
- 4- pyridinkarboxaldehyd 240 μl
- NADPH 1200 μl

Poté se destička vložila do přístroje Tecan a probíhalo měření poklesu absorbance po dobu 5 minut při 340 nm. Každý vzorek byl měřen ve čtyřech paralelních měřeních se dvěma jamkami slepého vzorku v každém sloupci.

Vyhodnocení:

Průměrný pokles absorbance za minutu ($\Delta A/\text{min}$) byl zjištěn z oblasti lineárního poklesu. Od hodnoty absorbance vzorku byla odečtena hodnota absorbance slepého pokusu a pomocí molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla vypočítána koncentrace vzniklého NADPH/min. Jednotky aktivity byly přepočítány na mg proteinu.

Výpočet aktivity:

$$\text{aktivita} = \frac{(\Delta A_{\text{vz}} - \Delta A_{\text{sl}}) \cdot V_i \cdot 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_s} \text{ [nmol/min/ml]}$$

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

l délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm

V_i objem reakční směsi, tj. 0,2 ml

V_s objem biologické frakce, tj. 0,010 ml

5.2.10 ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ NA POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Zásobní roztoky:

4M HCl: Do 150 ml redestilované vody bylo přidáno 88 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a doplněno vodou do odměrné baňky na 250 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

Zásobní roztok AA + bis AA: Při přípravě tohoto roztoku bylo nutno pracovat v rukavicích, s rouškou a s nejvyšší opatrností. Bylo naváženo 30 g akrylamidu (AA) a 0,8 g bis-akrylamidu (bis AA), které se rozpustily pomocí míchačky v malém

množství redestilované vody a doplnily vodou do odměrné baňky na 100 ml. Zásobní roztok byl uchováván v lednici pod argonovou atmosférou.

1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8: Bylo naváženo 18,5 g Trisu, přidáno 75 ml redestilované vody a mícháním se roztok rozpustil. pH bylo upraveno na 8,8 na pH metru pomocí 4 M HCl a doplněno v odměrné baňce na 100 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8: Bylo naváženo 6 g Trisu, přidáno 75 ml redestilované vody a mícháním se roztok rozpustil. pH bylo upraveno na 6,8 na pH metru pomocí 4 M HCl a doplněno v odměrné baňce na 100 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

10 % SDS: Bylo naváženo 10 g SDS, které se rozpustilo v 80 ml redestilované vody a bylo doplněno vodou do 100 ml odměrné baňky. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

Koncentrovaný elektrodový pufr: Bylo naváženo množství 72 g glycinu, 15 g Trisu a 5 g SDS, které se rozpustilo v 900 ml redestilované vody a pH roztoku se upravilo na pH metru na 8,3 pomocí 4 M HCl a roztok se doplnil do 1000 ml odměrné baňky. Byl rozplněn do 100 ml plastických nádobek a zamražen.

Zásobní roztoky na ředění vzorků:

4xSDS vzorkový pufr – roztok byl uchováván v mrazicím boxu

Složka (konečná koncentrace)	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetované množství
200 mM Tris/HCl, pH 6,8	1 M	4 ml
40 % glycerol	85 %	9,41 ml
6 % SDS	prášek	1,2 g
0,2 M DTT	prášek	0,617 g
0,1 g bromfenolová modř	prášek	špetka
redestilovaná H ₂ O		20 ml

Lyzační pufr – roztok byl uchováván v mrazicím boxu

Složka (konečná koncentrace)	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetované množství
50 mM Tris/HCl, pH 7,4	1 M	50 ml
150 mM NaCl	prášek	8,766 g
10 % glycerol	85 %	117,65 ml
1 % Triton X-100	100 %	10 ml
2 mM EDTA	prášek	0,58 g
2 mM EGTA	prášek	0,76 g
β-glycerolfosfát	prášek	8,52 g
50 mM fluorid sodný	prášek	2,09 g
10 mM pyrofosfát sodný	prášek	4,46 g
2 mM dithiotreitol	prášek	0,3085 g
200 μM vanadičnan sodný	prášek	0,03678 g

Před použitím lyzačního pufru bylo nutno přidat roztoky inhibitorů a takto upravený lyzační pufr byl skladován pouze v lednici. Ke 13 ml lyzačního pufru se přidalo 130 μl směsi inhibitorů (od Sigmy) či úměrně jiného inhibitoru a 130 μl fenylmethansulfonylfluoridu (PMSF).

Isobutanol nasycený vodou: Čistý isobutanol byl smíchán s redestilovanou vodou. V horní vrstvě byl isobutanol nasycený vodou. Byl uchováván v lednici.

Pracovní roztoky:

10 % APS: 25 mg persíranu amonného bylo rozpuštěno ve 250 μl redestilované vody. Roztok se připravoval těsně před použitím.

Elektrodový pufr: 70 ml zásobního elektrodového pufru bylo smícháno s 280 ml redestilované vody.

Ředění vzorku: Dle obsahu bílkoviny byl vzorek naředěn tak, aby měl koncentraci 1 μg/μl. Vzorek byl ředěn 4xSDS vzorkovým puftrem a lyzačním puftrem s roztokem inhibitorů tak, že SDS tvořilo ¼ celkového objemu.

Postup:

a) Příprava gelu:

Při přípravě gelu bylo nutno celou dobu pracovat v rukavicích.

Bylo nutno si připravit: nalévací stojánek, sklo, sklo se spacerem, spony, hřeben. Skla a hřeben bylo nutné důkladně umýt jarem, vodou, redestilovanou vodou a lihomethanolem a nechat ve svislé poloze oschnout. Skla byla přiložena na sebe a spojena sponami. Spojená skla byla postavena na gumovou podložku v nalévacím stojánku, přitlačena a přichycena vrchním kolíkem. V malé kádince byl namíchán roztok na spodní gel, byl lehce promíchán a ihned pipetou nalit mezi skla do výšky cca 4,5 cm od spodního okraje. Opatrně byl převrstven isobutanolem nasyceným vodou (cca 200 μ l) a nechal se polymerovat 30 – 60 minut. Poté byl isobutanol opatrně slit a prostor byl vysušen filtračním papírem (nesměl se dotknout gelu). V další malé kádince byl namíchán roztok na vrchní gel, byl lehce promíchán a ihned pipetou nalit mezi skla na spodní gel až po horní okraj. Do gelu byl po drážky zasunut hřeben a gel se nechal do druhého dne polymerovat v lednici.

Složení gelů:

Separční gel (spodní)

	7,5 % - 2 gely; 1,5 mm	10 % - 2 gely; 1,5 mm	12,5 % - 2 gely; 1,5 mm
redestilovaná voda	9,8 ml	8,1 ml	6,4 ml
pufr 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml
roztok AA + bis AA	5 ml	6,7 ml	8,4 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
-----iniciace polymerace-----			
roztok APS	200 μ l	200 μ l	200 μ l
TEMED (v digestoři)	16 μ l	16 μ l	16 μ l

Zaostřovací gel 4 % (horní)

	2 gely; 0,75 mm	2 gely; 1,5 mm
redestilovaná voda	3,05 ml	6,1 ml
pufr 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	2,5 ml
roztok AA + bis AA	0,65 ml	1,3 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,1 ml
-----iniciace polymerace-----		
roztok APS	100 µl	200 µl
TEMED (v digestoři)	8 µl	16 µl

b) Elektroforéza:

Předem byl dán předeřhát termoblok. Naředěné vzorky se daly povařit v předeřhátém termobloku 5 minut při 95 °C a poté chvíli zchladit na ledu (naředěné vzorky se daly použít opakovaně, skladovaly se v mrazicím boxu a před každým použitím bylo nutno je znovu zahřát). Gely byly vyndány ze stojánku a opatrně z nich byl vysunut hřeben. Jamky se opatrně opláchly destilovanou vodou. Byl připraven stojánek na elektroforézu, skla s gelem byla přitlačena z každé strany na těsnění, vnitřní část byla zasunuta do vnější části stojánku na elektroforézu a přitažena sponami (silná skla byla na vnější straně). Stojánek byl vložen do vaničky. Do vnitřního elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr (cca 125 ml – bylo nutné mít ponořen celý gel) a bylo zkontrolováno, zda nepodtéká. Do vnitřní části byl použit vždy nový elektrodový pufr a po skončení elektroforézy bylo nutno pufr z vnitřní části vylít. Do vnějšího elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr (cca 200 ml – hladina musela být nad drátkem). Elektrodový pufr z vnější části se dal použít opakovaně – vždy zase jen do vnější části.

Pomocí nanášecího bloku bylo pipetou s bílými špičkami napipetováno do každé jamky 10 µl vzorku pro 0,75 mm gel. Do první jamky bylo napipetováno 5 µl molekulárního standardu. Celá vanička byla ponořena do ledové lázně, přiklopena víčkem a připojena ke zdroji. Bylo nastaveno konstantní napětí 90 V a spuštěna elektroforéza. Zdroj byl vypnut v momentě, kdy čelo doběhlo na spodní okraj gelu. Poté se stojánek vyndal z vaničky, elektrodový pufr z vnitřní části byl vylit do výlevky,

elektrodotový pufr z vnější části byl uchován, byly povoleny spony a skla s gelem vyndána. Sklo bylo rozevřeno pomocí zelených klínek, gel byl odříznut od spacerů a zaostřovacího gelu. Nakonec bylo nutno všechny součásti elektroforézy důkladně umýt, osušit a uklidit.

5.2.11 IMUNOBLOTTING PO ELEKTROFORÉZE

Zásobní roztoky:

Blotovací pufr: bylo naváženo 6,06 g TRIS (25 mM) a 28,8 g glycinu (192 mM) a rozpuštěno v cca 500 ml redestilované vody. Poté bylo přidáno 400 ml methanolu a doplněno v odměrné baňce do 2000 ml. Roztok byl přelit do litrových lahví a uchováván v lednici.

Postup:

Po celou dobu bylo nutno pracovat v rukavicích. Separční gel byl oddělen od spodního skla a byl vložen do blotovacího pufru v plastové krabičce s víčkem. Do blotovacího pufru byla ponořena i nitrocelulósová membrána a dva kusy tlustého filtračního papíru. Vše bylo ponecháno v blotovacím pufru cca 20 minut. Na membránu byl předem napsán propiskou název proteinu, který byl detekován.

Blotování v přístroji BioRad Trans Blot Turbo:

Z přístroje byla vysunuta zásuvka a do ní byl vyskládán zespona směrem nahoru (protože proud putoval zeshora směrem dolů):

- 1 silný filtrační papír (popřípadě 3 tenké filtrační papíry)
- membrána
- gel: bylo nutné ho jemně uhladit, aby mezi membránou a gelem nebyly bubliny
- 1 silný filtrační papír: papír byl od středu uhlazován prsty kvůli odstranění bublinek

Poté bylo nutno opatrně položit víčko na blotovací zásuvku a pootočít kolečkem – tím se zásuvka uzavřela. Zásuvka byla vložena do přístroje a 20 minut probíhalo blotování.

Po skončení byla zásuvka vyndána, klíček odemknut a sundáno víko. Opatrně byl nadzvednut horní filtrační papír s gelem a bylo zkontrolováno, zda se barva z markeru přenesla na membránu. Zásuvky blotovacího přístroje bylo nutno opláchnout redestilovanou vodou a nechat usušit. Na membrány byly propiskou poznačeny nejmýraznější proužky markeru (tj. 25, 50 a 75 kDa, popřípadě 37 kDa).

5.2.12 DETEKCE PROTEINŮ

Metoda (Towbin et al. 1979) probíhá na základě reakce proteinu s primární a sekundární protilátkou.

Zásobní roztoky:

0,1 M TRIS pufr, pH 8,0: Bylo naváženo 12,11 g TRISu a rozpuštěno v 800 ml redestilované vody, pH upraveno na 8,0 pomocí 4 M HCl a doplněno redestilovanou vodou v odměrné baňce do 1000 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

TBST: Bylo naváženo 8,77 g NaCl, rozpuštěno v cca 300 ml redestilované vody, přidány 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru, pH 8,0. Doplněno v odměrné baňce do 1000 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

Primární protilátky: Zásobní protilátka byla zředěna dle instrukcí výrobce TBST pufrům s 1 % BSA (popřípadě mlékem). Byla skladována v mrazicím boxu. Před použitím bylo nutno ji včas vyndat a rozmrazit.

Sekundární protilátky: Zásobní protilátka byla zředěna dle instrukcí výrobce TBST pufrům s 1 % BSA (popřípadě mlékem). Byla skladována v mrazicím boxu. Před použitím bylo nutno ji včas vyndat a rozmrazit.

Postup:

Membránu bylo nutno pinzetou přenést do plastové misky s víčkem. Veškeré inkubace a oplachování bylo nutno provádět stále v té samé misce, membránu nebylo třeba vyndávat, roztoky se z krabičky vždy slily. Stříčkou byla nalita redestilovaná voda, krabička byla položena na kývačku, několikrát s ní bylo zakýváno a poté voda

vyлита. Tento postup byl opakován třikrát. Na membránu byl nalit roztok 5 % mléka v TBST pufru, krabička byla umístěna na kývačku a nechala se alespoň 2 hodiny blokovat. Následně bylo mléko slito a membrána byla opláchnuta redestilovanou vodou (opláchnutí není nutné). Následovala inkubace s primární protilátkou přes noc. Druhý den byla primární protilátka slita zpět do falkonky, zbytky přepipetovány a zamraženy pro opakované použití. Následovalo oplachování membrány s TBST puftrem (čtyřikrát 15 minut). Poté se membrána inkubovala 1 hodinu se sekundární protilátkou. Byly použity sekundární protilátky s křenovou peroxidasou (citlivější detekce). Následovalo oplachování membrány s TBST puftrem (čtyřikrát 15 minut).

5.2.13 CHEMILUMINISCENČNÍ DETEKCE

Zásobní roztoky:

Vývojka (negativní, Fomadon): byla naředěna destilovanou vodou z koncentrátu 1:14 (upravena podle údajů výrobce), asi do 500 ml

Ustalovač (univerzální, kyselý, Fomafix): byl naředěn destilovanou vodou z koncentrátu 1:4 (upraven podle údajů výrobce), asi do 1000 ml

Roztoky se mohly používat opakovaně, vývojka se rychle vyčerpala, ustalovač vydržel na více opakovaných použití.

Postup:

Pro detekci byl použit Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent. Při použití sekundárních protilátek s navázanou křenovou peroxidasou byl smíchán roztok A (luminol solution) a roztok B (peroxide solution) v poměru 1:1. Oba roztoky byly uchovávány v lednici.

V temné komoře byly připraveny fotomisky s vývojkou a ustalovačem (uchovávány v lednici), dvě krabičky s destilovanou vodou, kazeta, RTG filmy, fotopinzeta, nůžky, eurofolie.

Z krabičky s membránou byl slit TBST pufr, na povrch membrány bylo napipetováno cca 1,5 ml substrátu, tolik, aby byla pokryta celá membrána a dala se inkubovat 5 minut při tlumeném světle v chromatografavně. Membrána byla vyndána

ze substrátu, nechala se okapat a byla pinzetou vodotěsně zabalena do folie, byla osušena a přenesena do kazety. Zhaslo se světlo a nadále se pracovalo v temné komoře pod ochranným světlem. Byl vyndán potřebný počet filmů a nastříhán na potřebnou velikost, zbytek byl ihned uklizen. Filmy byly uchopeny za hrany, ploch se nesmělo dotýkat, nepokládaly se do vlhkosti ani na světlé plochy (nejlepší bylo položit filmy do kazety vedle membrány a kazetu přivřít). V kazetě byl film položen na zabalenou membránu, kazeta se zavřela a nechalo se exponovat. Doba osvitů se měnila podle aktuálních podmínek, začínalo se s 5 minutami, poté se případně čas měnil (3, 7, 10 minut apod.). Membrána svítila až několik hodin.

Ihned po expozici byl film ponořen do vývojky a za neustálého kývání (pinzetou) se sledovalo vyvíjení – muselo se včas zastavit. Když byl dostatečně vyvolaný film opláchnut v destilované vodě, byl ponořen do ustalovače a nechal se několik minut plavat. Poté byl dán opět na několik minut do destilované vody. Nakonec byl vyjmut, nechal se oschnout a byl uchováván v temnu. Bylo nutno pracovat opatrně, mokrý film se velmi snadno poničí.

Znovupoužití membrány:

Membránu po chemiluminiscenční detekci bylo nutno zabalit do potravinářské folie a dát do mrazicího boxu (vydržela i několik týdnů). Při opakovaném použití bylo nutno membránu asi 5 minut rozmrazovat, oplachovat čtyřikrát 15 minut v TBST, dát na 2 hodiny do mléka a poté pokračovat dále podle návodu (primární protilátka, sekundární protilátka atd.).

6. VÝSLEDKY

Byla měřena aktivita vybraných enzymů v subcelulárních frakcích homogenátu jater a tenkého střeva obézních (O) a normálních (N) myši po podávání výtažků ze zeleného čaje, konkrétně polyfenonu přidaného do krmiva.

Skupině O₁ a N₁ bylo podáváno upravené krmivo s 0,1 % polyfenonu v délce 28 dní

Skupině O₂ a N₂ bylo podáváno upravené krmivo s 0,01 % polyfenonu v délce 28 dní

Skupině O₃ a N₃ bylo podáváno upravené krmivo s 0,1 % polyfenonu v délce 3 dnů

Skupiny O_K a N_K byly tzv. kontrolní, podávalo se jim běžné krmivo bez přídavku polyfenonu v krmivu.

6.1 PRŮMĚRNÉ MNOŽSTVÍ SEŽRANÉHO KRMIVA

Množství sežraného krmiva bylo měřeno čtyři týdny během doby podávání polyfenonu v krmivu u normálních a obézních skupin myší. Naměřené hodnoty jsou uvedené v Tabulce 1.

Tabulka 1: Množství sežraného krmiva obsahující polyfenon u obézních a normálních myší (O_{1-2} obézní skupiny myší, N_{1-2} skupiny normálních myší, O_K , N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Množství sežraného krmiva							
	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	Průměr	Celkový průměr	Směrodatná odchylka
O_1	4,3	4,4	4,2	4,3	4,3	4,1	0,3
O_2	3,7	3,8	3,8	3,8	3,8		
O_K	4,2	4,4	4,4	4,4	4,3		
N_1	4,9	5,1	5	4,8	5	4,9	0,1
N_2	4,7	4,9	4,9	4,8	4,8		
N_K	5	5,1	4,9	4,9	5		

Z tabulky vyplývá, že při porovnání obézních a normálních skupin myší bylo množství sežraného krmiva signifikantně nižší u obézních skupin myší.

6.2 PRŮMĚRNÁ HMOTNOST JEDNOHO MYŠÍHO SAMCE

Průměrná hmotnost vztažená na jednoho myšího samce byla měřena na začátku a na konci experimentu podávání polyfenonu v krmivu u obézních a normálních skupin myší. Hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Průměrná hmotnost jednoho myšičího samce na začátku a na konci experimentu podávání polyfenonu v krmivu u normálních a obézních myší (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Průměrná hmotnost jednoho myšičího samce na začátku a na konci experimentu						
	Začátek experimentu			Konec experimentu		
	Hmotnost (g)	Průměr	Směrodatná odchylka	Hmotnost (g)	Průměr	Směrodatná odchylka
O ₁	66	65 ± 2		59	59 ± 3	
O ₂	63			55		
O _K	67			61		
N ₁	48	49 ± 1		43	44 ± 1	
N ₂	48			43		
N _K	48,5			44		

Z tabulky je patrné, že při porovnání hmotnosti myší před a po podávání polyfenonu v krmivu se snížila hmotnost u všech skupin myší. Při porovnání skupin kontrolních (bez polyfenonu v krmivu) a ostatních je patrné vyšší snížení hmotnosti u obézních skupin myší O₁₋₂ oproti kontrole.



Obrázek 20: Porovnání normálních a obézních myší

6.3 BIOCHEMICKÝ ROZBOR KRVE MYŠÍCH SAMCŮ

Hodnoty biochemického rozboru krevní plazmy myších samců po podávání polyfenonu v krmivu ve stáří 8 měsíců jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Biochemický rozbor obézních a normálních myších samců po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myši, N₁₋₂ skupiny normálních myši, O_K, N_K skupiny kontrolních myši bez podávání polyfenonu)

Biochemie myši								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
Glukosa (mM)	5,75	5,10	4,52	5,06	4,85	4,89	4,71	5,10
Cholesterol (mM)	3,48	4,20	2,73	3,76	2,61	2,77	2,80	2,94
HDL – cholesterol (mM)	2,89	3,31	2,34	3,20	2,21	2,29	2,34	2,55
LDL - cholesterol (mM)	0,35	0,48	0,25	0,43	0,19	0,18	0,35	0,24
Index ater. Klimov	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Triacylglyceroly (mM)	1,00	0,84	0,83	0,94	0,97	1,18	0,66	0,85
Inzulin (ng/ml)	1,77	1,65	1,22	2,26	0,51	0,44	0,23	0,31
Leptin (ng/ml)	19,56	20,95	16,38	19,97	0,74	0,78	0,76	0,72
HOMA	78,11	64,43	42,30	87,47	18,85	16,35	8,29	12,06

Z tabulky je patrné, že obézní skupiny myši mají oproti normálním skupinám myši signifikantně zvýšené hodnoty inzulinu, leptinu i HOMA. Skupiny obézních myši

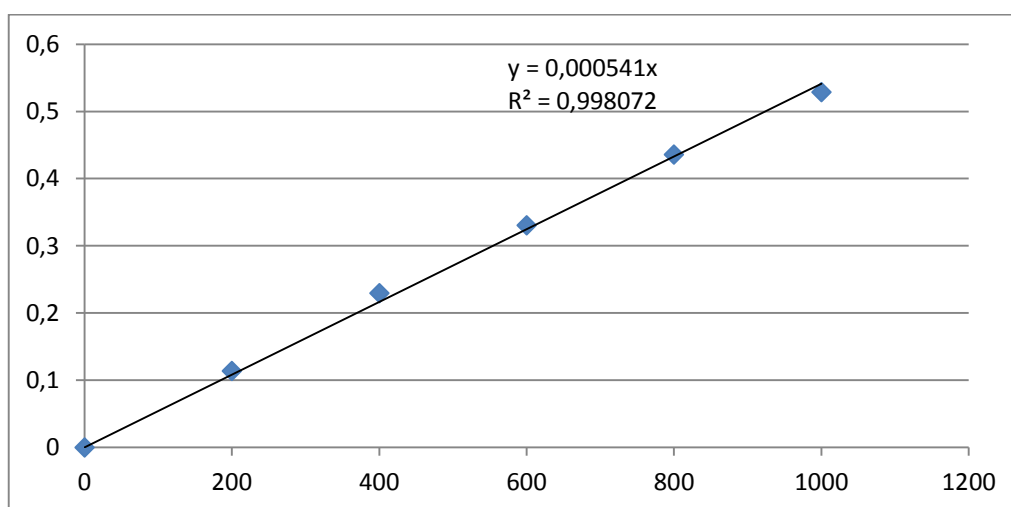
dostávající 0,1 % polyfenon ($O_{1,3}$) mají signifikantně snížené hodnoty LDL cholesterolu oproti kontrolní skupině O_K . V hodnotách ostatních parametrů není signifikantní rozdíl.

6.4 KONCENTRACE PROTEINU V CYTOSOLU JATER A TENKÉHO STŘEVA

Koncentrace proteinu v cytosolu jater a tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě dvou nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhaly vždy 4 paralelní měření u každého vzorku a byla stanovena kalibrační křivka, ze které byla vypočtena koncentrace proteinu. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4 a v Obrázku 21.

Tabulka 4: Koncentrace proteinu v cytosolu jater a tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O_{1-2} obézní skupiny myší, N_{1-2} skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

JÁTRA	O_1	O_2	O_3	O_K	N_1	N_2	N_3	N_K
mg/ml	15,3	15,9	14,9	15,1	16,9	15,0	17,1	15,6
Směrodatná odchylka	0,88	0,38	0,69	1,54	0,40	1,25	0,74	0,77
TENKÉ STŘEVO								
mg/ml	8,15	7,83	8,31	7,65	8,09	8,75	9,76	8,50
Směrodatná odchylka	0,37	0,47	0,32	0,37	0,45	0,52	0,80	0,58



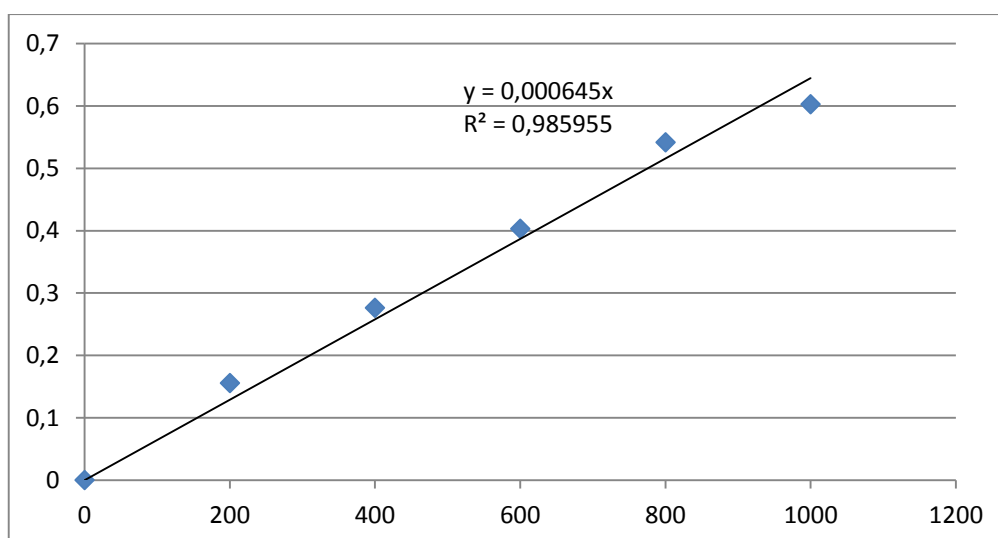
Obrázek 21: Kalibrační křivka koncentrace proteinu v cytosolu jater a tenkého střeva

6.5 KONCENTRACE PROTEINU V MIKROSOMECH JATER A TENKÉHO STŘEVA

Koncentrace proteinu v mikrosomech jater a tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě dvou nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhaly vždy 4 paralelní měření u každého vzorku a byla stanovena kalibrační křivka, ze které byla vypočtena koncentrace proteinu. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5 a v Obrázku 22.

Tabulka 5: Koncentrace proteinu v mikrosomech jater a tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

JÁTRA	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
mg/ml	8,67	10,7	13,1	8,90	9,67	8,16	11,7	8,51
Směrodatná odchylka	0,24	0,07	0,49	0,01	0,07	0,002	0,30	0,10
TENKÉ STŘEVO								
mg/ml	7,70	9,26	9,07	8,01	10,6	8,03	9,18	8,57
Směrodatná odchylka	1,53	0,13	1,30	0,87	0,23	1,44	2,10	0,39



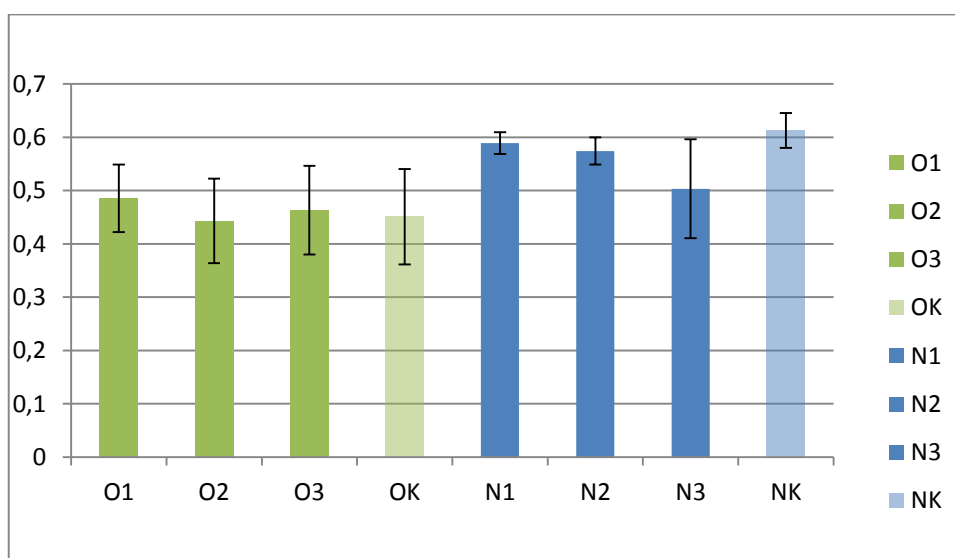
Obrázek 22: Kalibrační křivka koncentrace proteinu v mikrosomech jater a tenkého střeva

6.6 AKTIVITA GST V JATERNÍM CYTOSOLU

Aktivita GST v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě tří nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 6 a v Obrázku 23.

Tabulka 6: Aktivita enzymu GST v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
GST játra (nmol/min/mg proteinu)	0,49	0,44	0,46	0,45	0,59	0,57	0,50	0,61
Směrodatná odchylka	0,06	0,08	0,08	0,09	0,02	0,03	0,9	0,03



Obrázek 23: Aktivita enzymu GST v jaterním cytosolu u obézních a normálních skupin myší po podání polyfenonu v krmivu

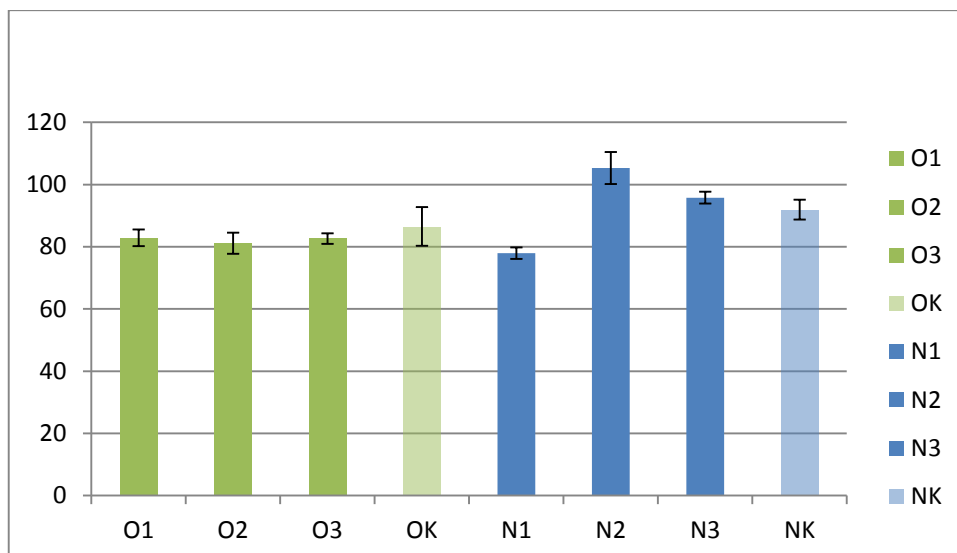
Z grafu je patrné, že myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny 1, 2, 3) nemají signifikantně změněnou aktivitu jaterních GST oproti kontrole (skupiny K). Při porovnání obézních a normálních myší je patrná snížená aktivita GST u všech skupin O oproti příslušným skupinám N, kromě skupin O₃ a N₃, kde není signifikantní rozdíl v aktivitě GST.

6.7 AKTIVITA GST V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA

Aktivita GST v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě tří nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 7 a v Obrázku 24.

Tabulka 7: Aktivita enzymu GST v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
GST tenké střevo (pmol/min/mg proteínu)	82,9	81,1	82,6	86,5	77,9	105,3	95,8	91,9
Směrodatná odchylka	2,70	3,39	1,67	6,22	1,82	5,16	1,87	3,19



Obrázek 24: Aktivita enzymu GST v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních skupin myši po podání polyfenonu v krmivu

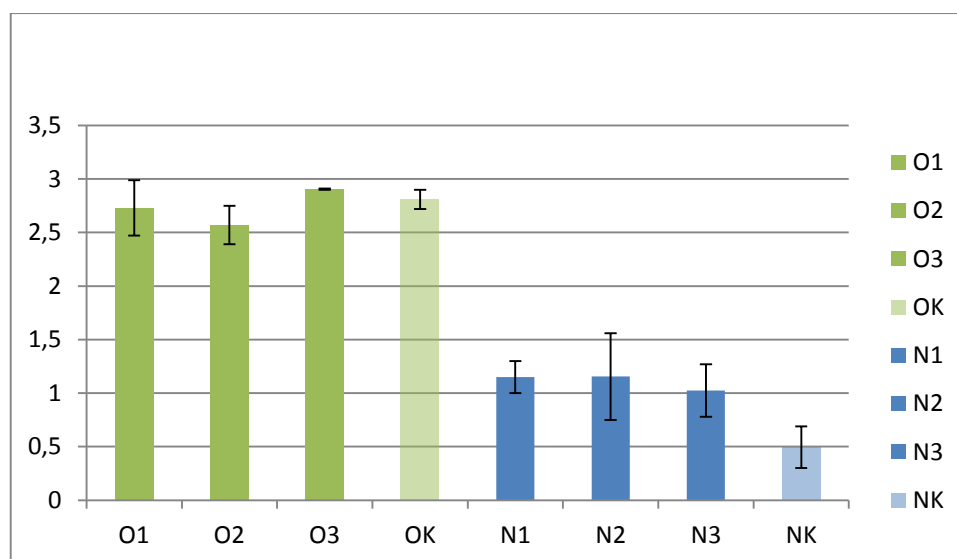
Z grafu je patrné, že myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny 1, 2, 3) nemají signifikantně změněnou aktivitu jaterních GST oproti kontrole (skupiny K). Při porovnání obézních a normálních myši není v aktivitě GST signifikantní rozdíl, kromě skupiny N₂, která má aktivitu oproti ostatním skupinám zvýšenou.

6.8 AKTIVITA UGT V JATERNÍCH MIKROSOMECH

Aktivita UGT v jaterních mikrosomech u obézních a normálních myši po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě dvou nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8 a v Obrázku 25.

Tabulka 8: Aktivita enzymu UGT v jaterních mikrosomech u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
UGT játra (nmol/min/mg proteinu)	2,7	2,6	2,9	2,8	1,2	1,2	1,0	0,5
Směrodatná odchylka	0,3	0,2	0,01	0,1	0,2	0,4	0,3	0,2



Obrázek 25: Aktivita enzymu UGT v jaterních mikrosomech u obézních a normálních skupin myší po podání polyfenonu v krmivu

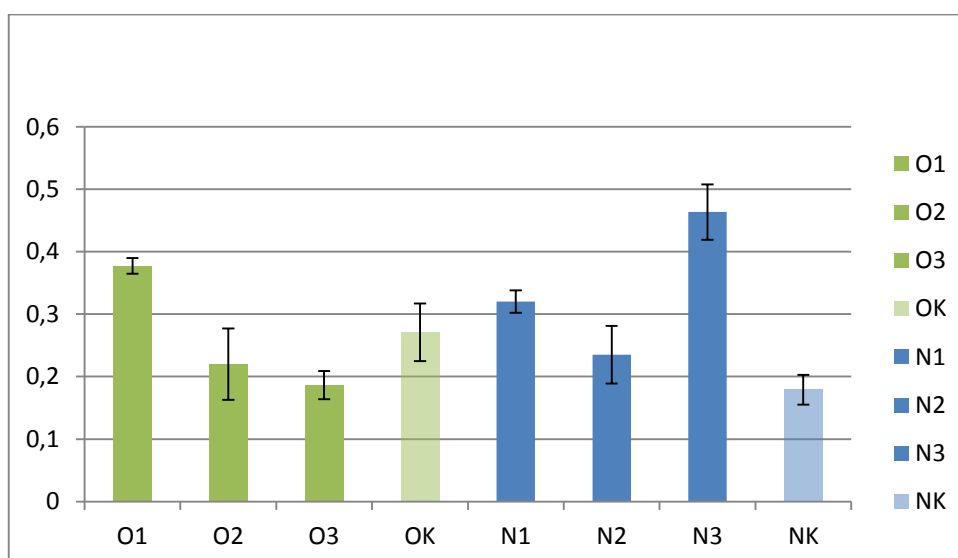
Z grafu je patrná signifikantně zvýšená aktivita enzymu UGT v jaterních mikrosomech u všech skupin O oproti příslušným skupinám N, včetně skupin kontrolních. Obézní myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny O_{1, 2, 3}) nemají signifikantně změněnou aktivitu jaterních UGT oproti kontrole (skupiny O_K). Naopak normální skupiny myší (N_{1, 2, 3}) mají vyšší aktivitu než kontrolní skupina N_K.

6.9 AKTIVITA UGT V MIKROSOMECH TENKÉHO STŘEVA

Aktivita UGT v mikrosomech tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě dvou nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9 a v Obrázku 26.

Tabulka 9: Aktivita enzymu UGT v mikrosomech tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
UGT tenké střevo (nmol/min/mg proteinu)	0,38	0,22	0,19	0,27	0,32	0,24	0,46	0,18
Směrodatná odchylka	0,01	0,06	0,02	0,05	0,02	0,04	0,04	0,02



Obrázek 26: Aktivita enzymu UGT v mikrosomech tenkého střeva u obézních a normálních skupin myší po podání polyfenonu v krmivu

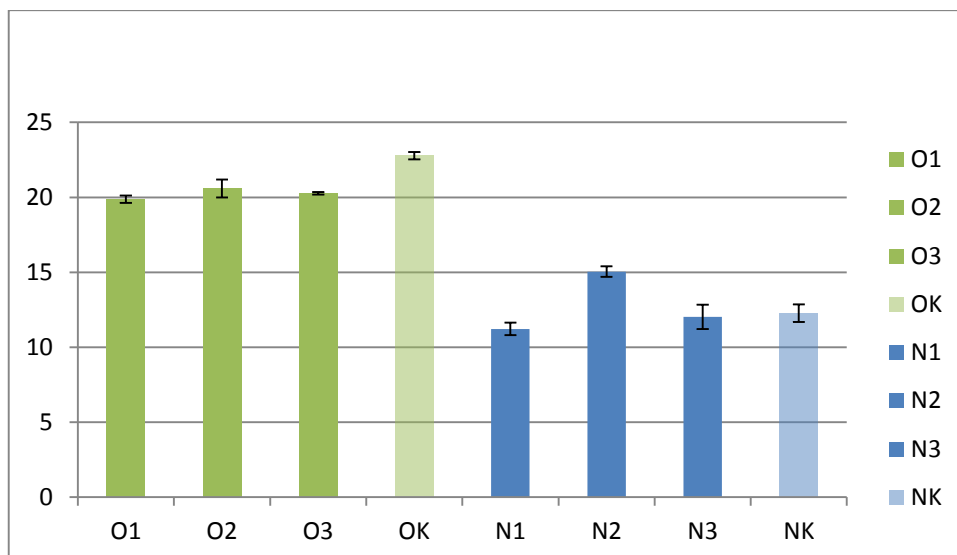
Z grafu je patrné, že normální myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny N_{1, 2, 3}) mají signifikantně zvýšenou aktivitu UGT v tenkém střevě oproti kontrole N_K. U obézních myší signifikantní změna zjištěna nebyla. Při porovnání obézních a normálních myší je patrná zvýšená aktivita UGT u skupin O₁ a N₃ oproti příslušným skupinám N₁ a O₃.

6.10 AKTIVITA CBR V JATERNÍM CYTOSOLU

Aktivita CBR v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě dvou nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10 a v Obrázku 27.

Tabulka 10: Aktivita enzymu CBR v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
CBR játra (nmol/min/mg proteinu)	19,9	20,6	20,3	22,8	11,2	15,0	12,0	12,3
Směrodatná odchylka	0,3	0,6	0,1	0,2	0,4	0,4	0,8	0,6



Obrázek 27: Aktivita enzymu CBR v jaterním cytosolu u obézních a normálních skupin myši po podání polyfenonu v krmivu

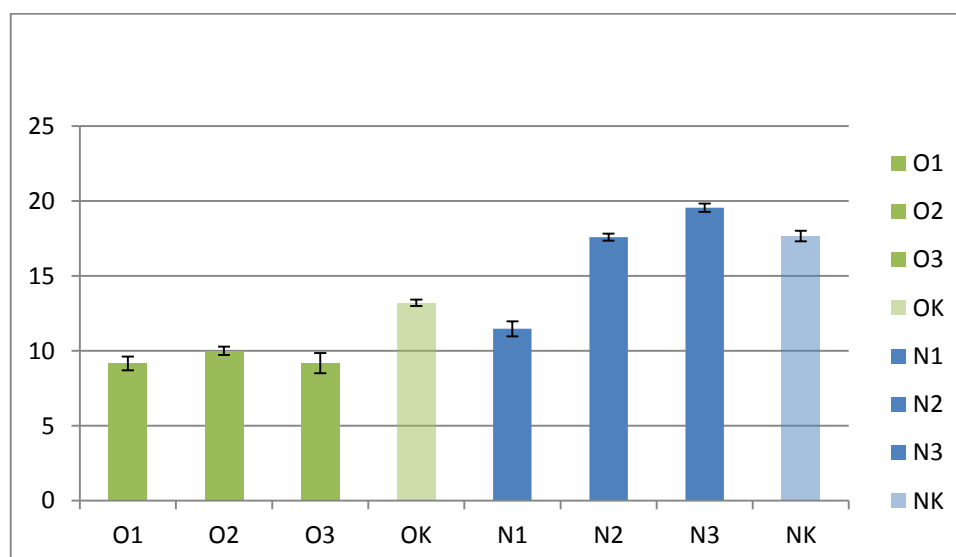
Z grafu je patrné, že obézní myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny O₁, 2, 3) mají signifikantně sníženou aktivitu jaterních CBR oproti kontrole (skupiny O_K). U normálních myši tento jev pozorován není. Při porovnání obézních a normálních skupin myši je patrná signifikantně zvýšená aktivita CBR u všech skupin O oproti příslušným skupinám N.

6.11 AKTIVITA CBR V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA

Aktivita CBR v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myši po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě dvou nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11 a v Obrázku 28.

Tabulka 11: Aktivita enzymu CBR v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
CBR tenké střevo (nmol/min/mg proteinu)	9,2	10,0	9,2	13,2	11,5	17,6	19,6	17,7
Směrodatná odchylka	0,5	0,3	0,7	0,2	0,5	0,2	0,3	0,4



Obrázek 28: Aktivita enzymu CBR v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních skupin myší po podání polyfenonu v krmivu

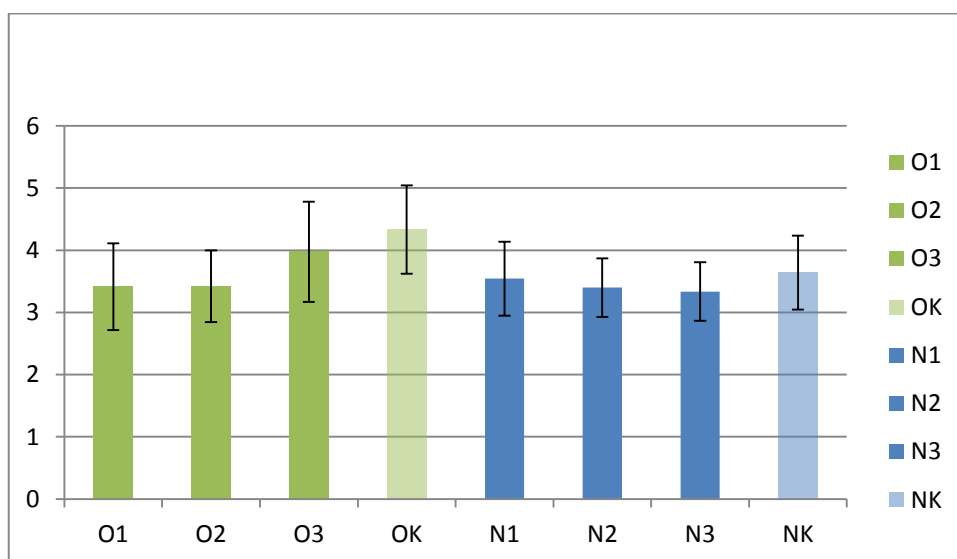
Z grafu je patrné, že obézní myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny O₁, 2, 3) mají sníženou aktivitu CBR v tenkém střevě oproti kontrole O_K. U skupin normálních myší tento jev pozorován není. Při porovnání obézních a normálních myší je patrná signifikantně snížená aktivita CBR u všech skupin O oproti příslušným skupinám N.

6.12 AKTIVITA AKR1A1 V JATERNÍM CYTOSOLU

Aktivita AKR1A1 v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě tří nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 12 a v Obrázku 29.

Tabulka 12: Aktivita enzymu AKR1A1 v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
AKR1A1 játra (nmol/min/mg proteinu)	3,4	3,4	4,0	4,3	3,5	3,4	3,3	3,6
Směrodatná odchylka	0,7	0,6	0,8	0,7	0,6	0,5	0,5	0,6



Obrázek 29: Aktivita enzymu AKR1A1 v jaterním cytosolu u obézních a normálních skupin myší po podání polyfenonu v krmivu

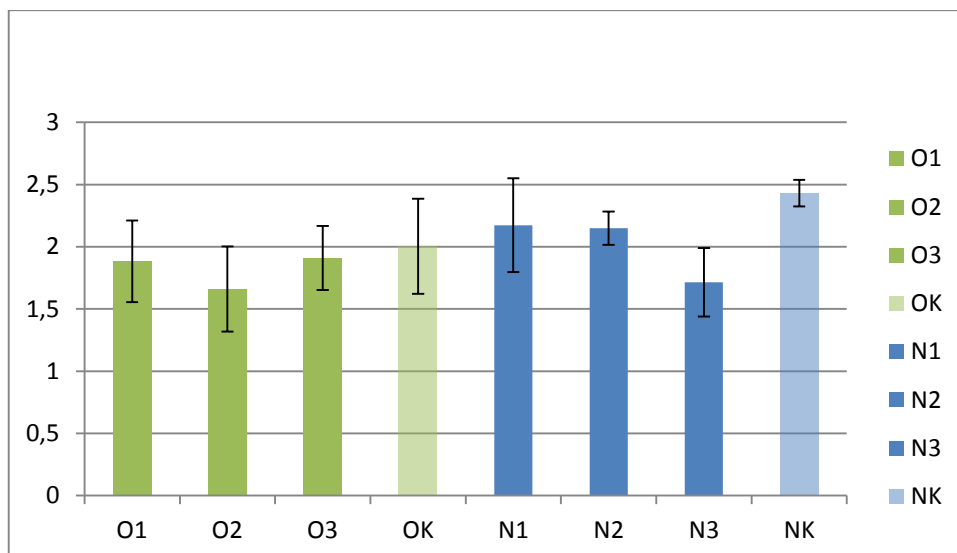
Z grafu je patrné, že myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny 1, 2, 3) mají signifikantně sníženou aktivitu jaterních AKR1A1 oproti kontrole (skupiny K). Při porovnání obézních a normálních skupin myši není patrná signifikantní změna aktivit AKR1A1 u všech skupin O oproti příslušným skupinám N.

6.13 AKTIVITA AKR1A1 V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA

Aktivita AKR1A1 v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myši po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě tří nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 13 a v Obrázku 30.

Tabulka 13: Aktivita enzymu AKR1A1 v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myši po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myši, N₁₋₂ skupiny normálních myši, O_K, N_K skupiny kontrolních myši bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
AKR1A1 tenké střevo (nmol/min/mg proteinu)	1,9	1,7	1,9	2,0	2,2	2,2	1,7	2,4
Směrodatná odchylka	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,1	0,3	0,1



Obrázek 30: Aktivita enzymu AKR1A1 v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních skupin myší po podání polyfenonu v krmivu

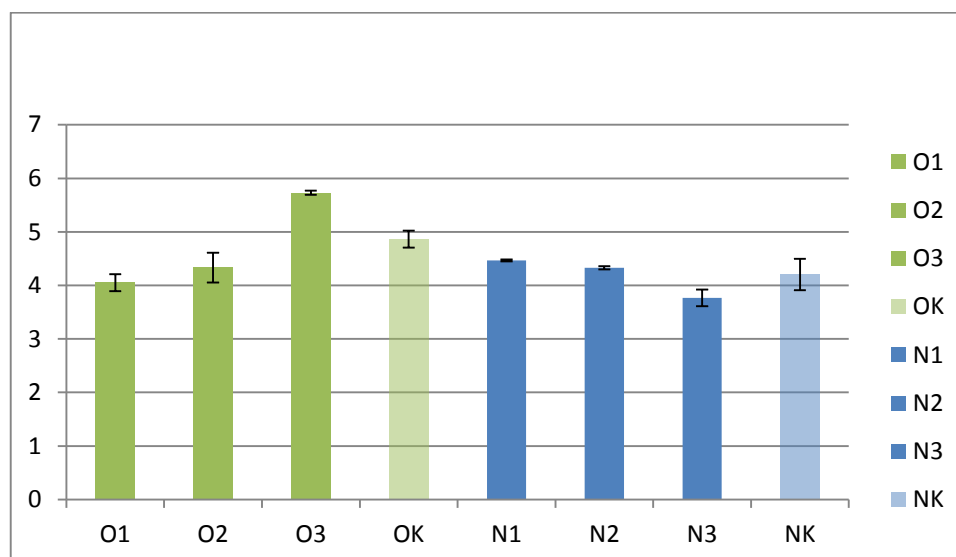
Z grafu je patrné, že myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny 1, 2, 3) mají sníženou aktivitu AKR1A1 v tenkém střevě oproti kontrole (skupiny K). Při porovnání obézních a normálních skupin myší je patrná signifikantně snížená aktivita AKR1A1 u všech skupin O oproti příslušným skupinám N, kromě skupin O₃ a N₃, u kterých je aktivita normální skupiny snížena.

6.14 AKTIVITA AKR1C V JATERNÍM CYTOSOLU

Aktivita AKR1C v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě tří nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 14 a v Obrázku 31.

Tabulka 14: Aktivita enzymu AKR1C v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
AKR1C játra (nmol/min/mg proteinu)	4,1	4,3	5,7	4,9	4,5	4,3	3,8	4,2
Směrodatná odchylka	0,2	0,3	0,4	0,2	0,02	0,02	0,2	0,3



Obrázek 31: Aktivita enzymu AKR1C v jaterním cytosolu u obézních a normálních skupin myší po podání polyfenonu v krmivu

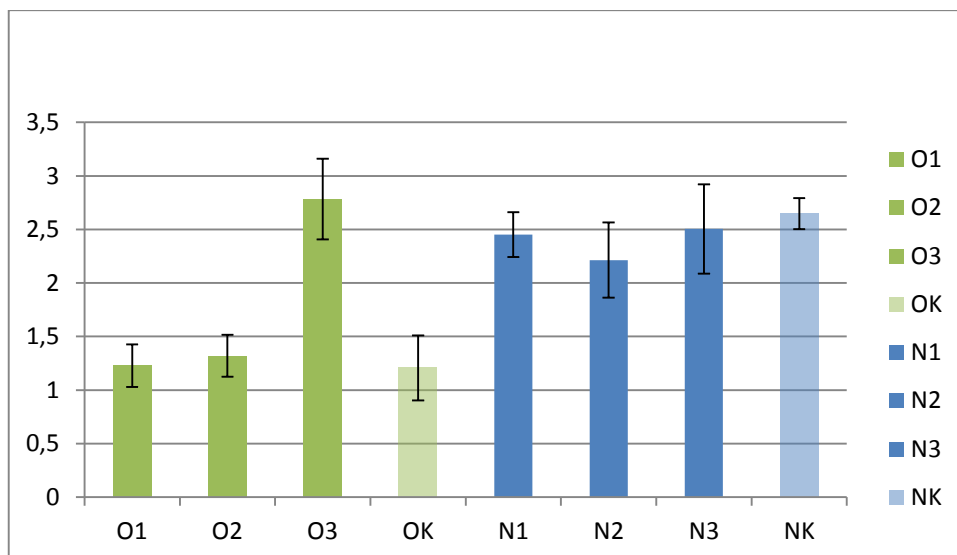
Z grafu je patrné, že myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny 1, 2, 3) nemají signifikantně změněnou aktivitu jaterních AKR1C oproti kontrole (skupiny K). Při porovnání obézních a normálních skupin myší je patrná signifikantně zvýšená aktivita AKR1C u skupiny obézních myší O₃ oproti příslušné skupině normálních myší N₃.

6.15 AKTIVITA AKR1C V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA

Aktivita AKR1C v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě tří nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15 a v Obrázku 32.

Tabulka 15: Aktivita enzymu AKR1C v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
AKR1C tenké střevo (nmol/min/mg proteinu)	1,2	1,3	2,8	1,2	2,5	2,2	2,5	2,7
Směrodatná odchylka	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4	0,4	0,2



Obrázek 32: Aktivita enzymu AKR1C v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních skupin myší po podání polyfenonu v krmivu

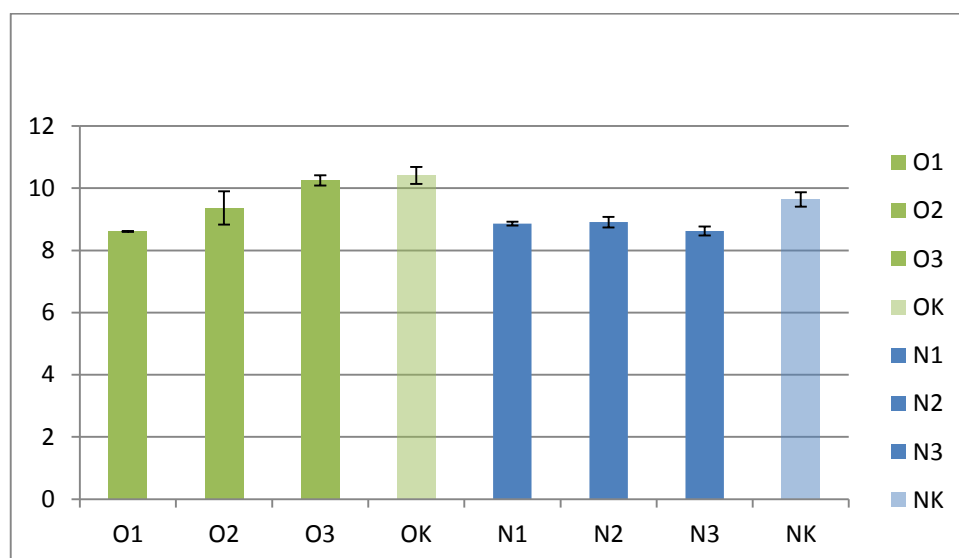
Z grafu je patrné, že normální myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny 1, 2, 3) nemají signifikantně změněnou aktivitu AKR1C v tenkém střevě oproti kontrole N_K. Skupina obézních myší O₃ má signifikantně zvýšenou aktivitu oproti kontrole O_K. Při porovnání obézních a normálních myší je patrná snížená aktivita AKR1C u skupin obézních myší O oproti příslušným skupinám normálních myší N, kromě skupiny O₃ oproti N₃, u které je aktivita obézních myší zvýšena.

6.16 AKTIVITA AKR1A/1C V CYTOSOLU JATER

Aktivita AKR1A/1C v cytosolu jater u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě dvou nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 16 a v Obrázku 33.

Tabulka 16: Aktivita enzymu AKR1A/1C v cytosolu jater u obézních a normálních myši po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myši, N₁₋₂ skupiny normálních myši, O_K, N_K skupiny kontrolních myši bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
AKR1A/1C játra (nmol/min/mg proteinu)	8,6	9,4	10,3	10,4	8,9	8,9	8,6	9,6
Směrodatná odchylka	0,01	0,5	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2



Obrázek 33: Aktivita enzymu AKR1A/1C v jaterním cytosolu u obézních a normálních skupin myši po podání polyfenonu v krmivu

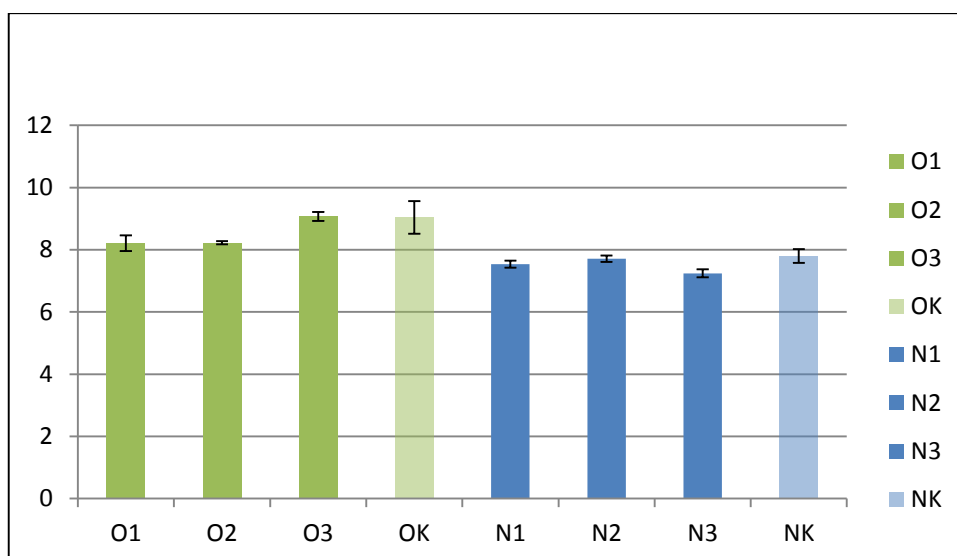
Z grafu je patrné, že myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny 1, 2, 3) mají mírně sníženou aktivitu jaterních AKR1A/1C oproti kontrole (skupiny K). Při porovnání obézních a normálních skupin myši je patrná zvýšená aktivita AKR1A/1C u všech skupin O oproti příslušným skupinám N, kromě skupin O₁ a N₁, kde není signifikantní rozdíl v aktivitě AKR1A/1C.

6.17 AKTIVITA AKR1A/1C V CYTOSOLU TENKÉHO STŘEVA

Aktivita AKR1A/1C v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu byla stanovena na základě dvou nezávislých experimentů. V každém experimentu probíhalo vždy 6 paralelních měření u každého vzorku a 2 paralelní měření u slepých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 17 a v Obrázku 34.

Tabulka 17: Aktivita enzymu AKR1A/1C v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních myší po podávání polyfenonu v krmivu (O₁₋₂ obézní skupiny myší, N₁₋₂ skupiny normálních myší, O_K, N_K skupiny kontrolních myší bez podávání polyfenonu)

Výsledky								
	O ₁	O ₂	O ₃	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	N _K
AKR1A/1C tenké střevo (nmol/min/mg proteinu)	8,2	8,2	9,1	9,0	7,5	7,7	7,2	7,8
Směrodatná odchylka	0,3	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1	0,2



Obrázek 34: Aktivita enzymu AKR1A/1C v cytosolu tenkého střeva u obézních a normálních skupin myši po podání polyfenonu v krmivu

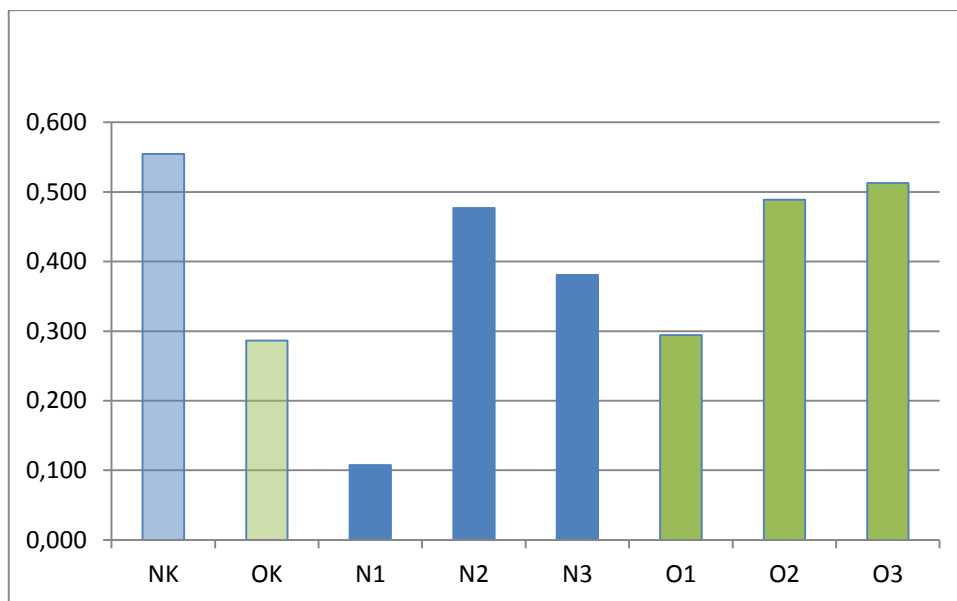
Z grafu je patrné, že myši s přidavkem polyfenonu v krmivu (skupiny 1, 2, 3) nemají signifikantně změněnou aktivitu AKR1A/1C v cytosolu tenkého střeva oproti kontrole (skupiny K). Při porovnání obézních a normálních myši je patrná zvýšená aktivita AKR1A/1C u všech skupin O oproti příslušným skupinám N.

6.18 DETEKCE PROTEINU CBR V JATERNÍM CYTOSOLU

Pro detekci proteinů enzymu CBR v jaterním cytosolu metodou Western blotting byla použita primární protilátka typu goat 1:3000 a sekundární protilátka anti-goat 1:3000. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 18 a v Obrázcích 35 a 36.

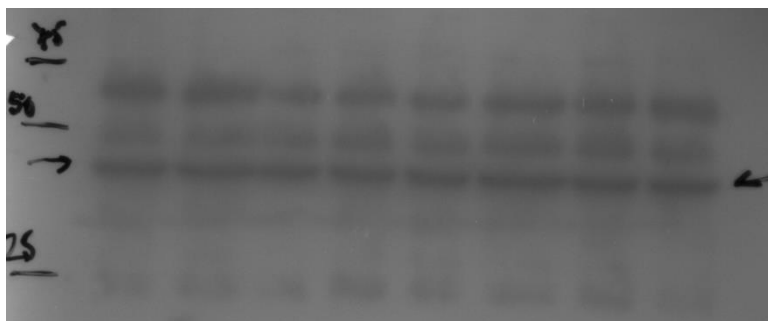
Tabulka 18: Množství proteinu ve vzorku jaterního cytosolu enzymu CBR (O₁₋₂ obézní skupiny myši, N₁₋₂ skupiny normálních myši, O_K, N_K skupiny kontrolních myši bez podávání polyfenonu)

CBR játra								
	N _K	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	O ₁	O ₂	O ₃
Signál	0,55	0,29	0,11	0,48	0,38	0,29	0,49	0,51



Obrázek 35: Množství proteinu v jaterním cytosolu u jednotlivých skupin obézních a normálních myši enzymu CBR

Z grafu je patrné, že u obézních skupin myši bylo naměřeno vyšší množství proteinu oproti myším normálním, kromě kontrolních skupin, u kterých bylo vyšší množství proteinu naměřeno u myši normálních.



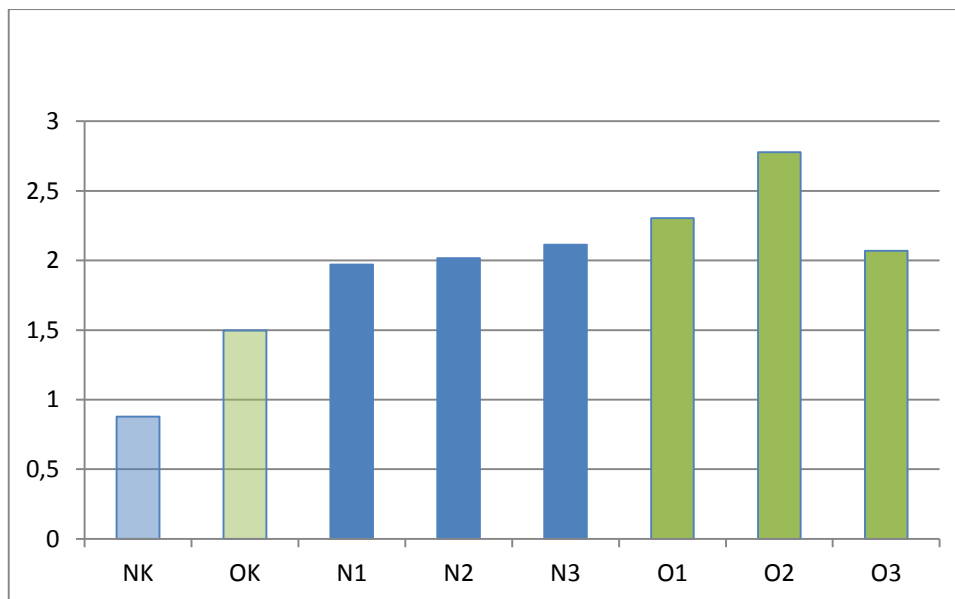
Obrázek 36: Detekce proteinu enzymu CBR v jaterním cytosolu, vyznačený proužek odpovídá 37 kDa

6.19 DETEKCE PROTEINU UGT V JATERNÍCH MIKROSOMECH

Pro detekci proteinů enzymu UGT v jaterních mikrosomech metodou Western blotting byla použita primární protilátka typu rabbit 1:10000 a sekundární protilátka anti-rabbit 1:10000. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 19 a v Obrázcích 37 a 38.

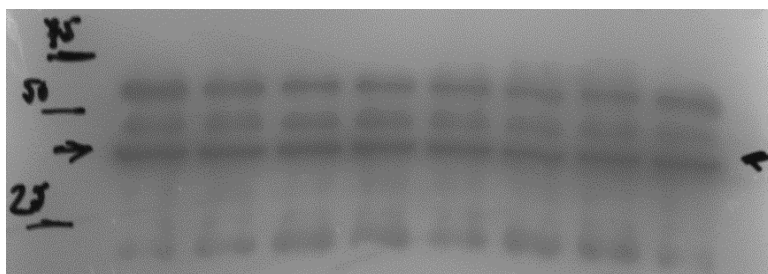
Tabulka 19: Množství proteinu ve vzorku jaterních mikrosomů enzymu UGT (O₁₋₃ obézní skupiny, N₁₋₃ normální skupiny, O_K, N_K kontrolní skupiny bez podávání polyfenonu)

UGT játra								
	N _K	O _K	N ₁	N ₂	N ₃	O ₁	O ₂	O ₃
Signál	0,88	1,50	1,97	2,02	2,11	2,31	2,78	2,07



Obrázek 37: Množství proteinu v jaterních mikrosomech u jednotlivých skupin obézních a normálních myši enzymu UGT

Z grafu je patrné, že množství proteinu je signifikantně vyšší u všech skupin obézních myši, kromě skupin N₃ a O₃, kde není v množství proteinu signifikantní rozdíl.



Obrázek 38: Detekce proteinu enzymu UGT v jaterních mikrosomech, vyznačený proužek odpovídá 37 kDa

7. DISKUSE

Zelený čaj se užívá ve světě již dlouhá staletí. Je zdrojem mnoha prospěšných látek pro náš organismus. Jeho pozitivní vlastnosti mohou být užitečné mimo jiné i při snižování hmotnosti. Látky obsažené v zeleném čaji, například polyfenoly, ale také mohou ovlivňovat expresi a aktivitu mnoha enzymů.

Cílem této práce bylo zjistit, zda a jakým způsobem ovlivňuje podávání výtažku ze zeleného čaje (polyfenonu) v krmivu vybrané biotransformační enzymy a zda jsou tyto enzymy ovlivněny rozdílně u normálních a obézních myší. Také bylo studováno, jaký vliv má samotná obezita na expresi a aktivitu těchto enzymů.

Bylo sledováno celkem osm skupin myší. Polovinu skupin tvořily myší samci s navozenou obezitou. Polyfenon v krmivu byl podáván šesti myším skupinám. Jedna skupina myší normálních a jedna skupina myší obézních byly ponechány jako skupiny kontrolní, bez podávání polyfenonu v krmivu. Koncentrace polyfenonu a délka jeho podávání je uvedena v popisu výsledků.

U myší bylo měřeno průměrné množství sežraného krmiva během čtyř týdnů. V průběhu této doby byl do krmiva vybraným skupinám myší přidáván polyfenon. Tento parametr není uveden pro skupiny O₃ a N₃, protože těmto skupinám byl polyfenon do krmiva přidáván pouze tři dny a tak by tato hodnota nebyla relevantní. Jak bylo předpokládáno, vyšší průměrné množství sežraného krmiva bylo naměřeno u normálních skupin myší. Dle Maletínské et al. 2006; Matyškové et al. 2008 mají obézní myši zpomalený metabolismus a přijímají méně potravy. Při porovnání jednotlivých skupin myší mají skupiny O₂ a N₂ oproti ostatním skupinám mírně snížen příjem potravy. Tyto skupiny myší přijímaly potravu s 0,01 % polyfenonem. Nižší koncentrace polyfenonu v krmivu tedy nejvíce snížila příjem potravy u myší bez vlivu obezity.

V závislosti na podávaném krmivu byla u myší také měřena jejich průměrná hmotnost. Tento parametr chybí opět u skupin O₃ a N₃. Vzhledem k třídenímu podávání potravy s přidaným polyfenonem se u těchto skupin výrazné změny nepředpokládaly. Na začátku experimentu měly obézní skupiny myší v průměru o 16 g vyšší hmotnost než skupiny normálních myší. Na konci experimentu se hmotnost snížila u všech skupin. Obézní skupiny myší měly hmotnost v průměru o 15 g vyšší

než skupiny normální. V porovnání s kontrolními skupinami nedošlo u myší krmených polyfenonem k významnému snížení hmotnosti. Z těchto hodnot lze předpokládat, že polyfenon v krmivu neměl vliv na snížení hmotnosti myší. Předpokladem snížení hmotnosti je tedy spíše vyšší věk subjektů, osm měsíců.

Myším byl také proveden rozbor krevní plazmy. Měřeny byly hodnoty glukosy, celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu, triacylglycerolů, indexu ater. Klimov, inzulinu, leptinu a HOMA, což je tzv. homeostasis model assessment, který udává procentuální hodnoty funkce beta buněk pankreatu a jejich citlivosti k inzulinu. (převzato z <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>) Index ater. Klimov je cholesterolový koeficient aterogeneze navržený Klimovem. Vypočítá se z celkového cholesterolu a množství cholesterolu v HDLP, pro jeho výpočet byl stanoven vzorec $K_{a,ch} = (C_{ch,tot} - C_{ch,hdlp}) / C_{ch,hdlp}$. Pokud je hodnota indexu < 3, riziko aterosklerózy je malé. (Sokolov 1994)

U obézních skupin myší byly naměřeny signifikantně zvýšené hodnoty inzulinu, leptinu i HOMA. Tyto hodnoty odpovídají rozvinuté leptinové i inzulinové resistenci u obézních myší. Pro náš experiment byli vybráni pouze myší samci právě pro pravděpodobnější vznik leptinové i inzulinové resistance (Maletínská et al. 2006; Matyšková et al. 2008). Při porovnání hodnot glukosy není patrný signifikantní rozdíl mezi obézními a normálními skupinami myší. U hodnot cholesterolu (celkový, LDL, HDL a triacylglyceroly) jsou již rozdíly patrné. Hodnoty celkového, LDL i HDL cholesterolu jsou až na výjimky vyšší u obézních skupin myší. Výjimkou jsou skupiny O₃ a N₃, u kterých jsou hodnoty vyšší u normální skupiny myší. Tyto hodnoty se mohly snížit u obézních myší vyšším působením krátkodobě podávaného polyfenonu. Patrné je také vyšší snížení cholesterolů oproti kontrole u skupin myší, kterým byl podáván polyfenon v koncentraci 0,1 % (O₁, N₁ a O₃ s výjimkou N₃). Tato koncentrace polyfenonu pravděpodobně pomohla snížit hodnotu celkového a LDL cholesterolu v plazmě. Naopak zvýšení HDL cholesterolu po užívání polyfenonu se neprokázalo. Některé výzkumy však tvrdí, že pravidelné podávání výtažků ze zeleného čaje hodnoty LDL cholesterolu snižuje a HDL cholesterol zvyšuje. (Cabrera et al. 2005)

Ze subcelulárních frakcí homogenátu jater a tenkého střeva byla následně měřena aktivita vybraných biotransformačních enzymů u jednotlivých skupin myší. Z biotransformačních enzymů první fáze byly studovány CBR a tři typy aldoketoreduktas, AKR1A1, AKR1C a AKR1A/1C. Z konjugačních enzymů byly

zkoumány GST a UGT. Aktivita těchto enzymů byla vztažena na mg proteinu, a proto bylo nutné stanovit koncentrace proteinu v cytosolu a mikrosomech homogenátu jater a tenkého střeva. Mezi obézními a normálními skupinami myší ani v porovnání s kontrolními skupinami myší nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v hodnotách koncentrace proteinu. Z toho vyplývá, že podávání polyfenonu ani obezita nemění množství proteinů.

U všech enzymů kromě enzymu CBR (kde byly hodnoty srovnatelné) byly naměřeny vyšší hodnoty aktivit v homogenátu jater oproti tenkému střevu, což odpovídá biologickému potenciálu jater. Při porovnání aktivit enzymu GST byla aktivita nižší u všech obézních skupin myší v cytosolu jater i tenkého střeva oproti skupinám normálním (kromě skupiny N₁ v cytosolu tenkého střeva). Myši s přídatkem polyfenonu v krmivu nemají signifikantně změněnou aktivitu GST oproti kontrolním skupinám. Snížení aktivity GST v cytosolu jater bylo způsobeno pravděpodobně obezitou a nikoli polyfenonem. Aktivita GST v cytosolu tenkého střeva nebyla obezitou signifikantně ovlivněna.

Aktivita enzymu UGT byla měřena v mikrosomálních frakcích jater a tenkého střeva. Jeho aktivita u obézních skupin myší je signifikantně zvýšená oproti skupinám myší normálních. Při porovnání obézních skupin s kontrolní skupinou O_K není aktivita signifikantně změněna. Naopak pokud porovnáme normální skupiny myší s kontrolou, aktivita v kontrolní skupině N_K je snížena. Z výsledků vyplývá, že signifikantně výrazně vyšší aktivita obézních skupin myší je pravděpodobně způsobena obezitou, ale protože i normální skupiny myší, kterým byl podáván polyfenon, mají oproti kontrole aktivitu zvýšenou, je pravděpodobné, že polyfenon aktivitu UGT v jaterních mikrosomech zvyšuje. Při porovnání aktivity UGT v tenkém střevě nenalezneme signifikantně změněnou aktivitu ani v porovnání s kontrolními skupinami, ani v porovnání obézních skupin myší se skupinami myší normálních. Za zmínku stojí porovnání aktivit skupin O₃ a N₃. Výrazně vyšší aktivita normální skupiny pravděpodobně určuje vyšší citlivost tkání ke tři dny podávanému polyfenonu, než je tomu u skupiny obézních myší.

Dalším měřením byl enzym CBR. U tohoto enzymu pozorujeme opačný účinek obezity v játrech a tenkém střevě. V játrech mají obézní skupiny myší signifikantně zvýšenou aktivitu, naopak v tenkém střevě je aktivita obézních myší snížena oproti normálním skupinám myší. Ve střevech i játrech je možno zpozorovat mírně sníženou aktivitu obézních skupin myší, kterým byl podáván polyfenon (O_{1,2,3}) oproti kontrole

O_K. Snížená aktivita je pravděpodobně způsobena inhibičním vlivem polyfenonu na tento enzym. Tento inhibiční vliv by mohl být vypořádan i u skupin N₁ a N₃. Tyto skupiny dostávaly krmivo s 0,1 % polyfenonem. V tenkém střevě se ale třídní podávání (skupina N₃) již inhibičním účinkem neprojevovalo. To je nejspíše způsobeno vyšší aktivitou enzymu v játrech oproti tenkému střevu.

Měřeny byly také tři typy aldoketoreduktas v cytosolu jater a tenkého střeva. Jejich společným znakem je zvýšená aktivita enzymů u skupin O₃ oproti příslušným skupinám N₃. U některých měření je tento rozdíl signifikantně znatelný, například u enzymu AKR1C v homogenátu jater i tenkého střeva. Tento jev může být způsoben vyšší citlivostí obézních myší k polyfenonu než myší normálních. Je pravděpodobné, že krátkodobé (třídní) podávání polyfenonu zvyšuje aktivitu měřené AKR1C. Naopak u AKR1A1 můžeme pozorovat ve všech skupinách myší podobný účinek polyfenonu jako u enzymu CBR. Aktivita všech skupin, jimž byl podáván polyfenon je oproti kontrolním skupinám snížena, což je způsobeno pravděpodobně následkem inhibičního vlivu polyfenonu na aktivitu AKR1A1. Tento jev můžeme pozorovat také v cytosolu jater u enzymu AKR1A/1C. V tenkém střevě již inhibiční účinek tak přesvědčivý není. U tohoto enzymu je dobře pozorovatelný vliv obezity zvyšující jeho aktivitu ve frakcích jater i tenkého střeva.

Z výše uvedeného je patrné, že aktivity jednotlivých enzymů byly ovlivněny jak stavem obezity, tak také podáváním polyfenonu v krmivu. Jednotlivé enzymy byly ovlivněny rozdílně. Zda enzymy ovlivnila spíše přítomnost obezity, u které je známé, že je schopna ovlivnit mnoho dějů v organismu, jak uvádí například Lin et al. 2005, či výtažek ze zeleného čaje polyfenon, který může například interagovat s některými léky či potravou (Lübeck 2007) není jisté. Pravděpodobně je aktivita enzymů ovlivněna kombinací těchto prostředků.

Následně bylo metodou Western blotting měřeno množství proteinu CBR a UGT v jaterních frakcích. Nejvyšší množství enzymu CBR v jaterním cytosolu bylo zaznamenáno u skupiny N_K, naopak nejnižší množství bylo naměřeno u skupiny N₁. Při porovnání normálních a obézních skupin myší krmených polyfenonem bylo vyšší množství CBR naměřeno u obézních skupin myší. U skupin kontrolních, které nedostávaly polyfenon, bylo naopak množství CBR vyšší u myší normálních než u myší obézních.

Enzym UGT byl stanovován v mikrosomálních frakcích jater. Vyšší množství UGT bylo zjištěno u obézních skupin myši oproti skupinám myši normálních. Při porovnání s kontrolními skupinami (O_K a N_K) byla hodnota tohoto proteinu vyšší u všech skupin myši, jimž byl podáván polyfenon. Polyfenon tedy zvyšuje množství proteinu UGT v játrech myši.

Výsledky této práce ukazují, že zelený čaj může v organismu ovlivňovat aktivitu a expresi různých enzymů. Také bylo zjištěno, že i sama obezita ovlivňuje expresi biotransformačních enzymů. Právě spojení obézního organismu s výtažkem ze zeleného čaje ovlivní enzymy v organismu znatelněji než jen působení jednoho faktoru. Z výsledků vyplývá, že zelený čaj v dlouhodobém podání metabolismus xenobiotik nezrychlí, spíše naopak některým enzymům aktivitu mírně sníží. Pro snižování obezity může být významný například inhibiční vliv zeleného čaje na některé lipázy (Cabrera et al. 2006) Také bylo pozorováno snížení LDL cholesterolu při podávání polyfenonu v koncentraci 0,1 % (Cabrera et al. 2006)

8. ZÁVĚR

- Třídenní podávání polyfenonu v koncentraci 0,1 % obézním skupinám myši signifikantně zvýšilo aktivitu enzymu AKR1C v cytosolu jater i tenkého střeva. Polyfenon podávaný 28 dní v koncentraci 0,1 % snižoval aktivity enzymů CBR, AKR1A1 a AKR1A/1C. Polyfenon také zvyšuje aktivitu jaterních UGT.
- Obézní myši vykazovaly vyšší aktivitu enzymů v jaterních UGT, CBR a AKR1A/1C v homogenátu jater i tenkého střeva, naopak nižší aktivita byla naměřena u enzymů GST v homogenátu jater a u enzymu CBR v homogenátu tenkého střeva oproti aktivitám u normálních skupin myši.

9. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Jana Skorkovská

Školitel: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Vliv polyfenonu na vybrané biotransformační enzymy u myší**

Zelený čaj se ve světě užívá již dlouhá století. Mezi hlavní látky v zeleném čaji patří polyfenolové sloučeniny, například katechiny. V poslední době jsou intenzivně studovány možné pozitivní účinky zeleného čaje a jeho obsahových látek na organismus. Mezi tyto účinky patří i možné snížení obezity a patologických stavů souvisejících s obezitou.

Cílem této diplomové práce bylo studovat vliv podávání extraktu ze zeleného čaje (polyfenonu) na aktivitu a expresi vybraných biotransformačních enzymů u normálních a obézních myší. Měření byla provedena v subcelulárních frakcích homogenátu jater a tenkého střeva myších sameců. Z 8 experimentálních skupin byly dvě skupiny kontrolní (skupina normálních a obézních myší bez podávání polyfenonu). Třem skupinám normálních myší a třem skupinám obézních myší by podáván polyfenon v krmivu v délce 3 nebo 28 dní ve dvou rozdílných koncentracích (0,1 a 0,01 %).

Výsledky ukázaly, že třídenní podávání polyfenonu (v koncentraci 0,1 % v dietě) signifikantně zvýšilo aktivitu enzymu AKR1C u obézních myší. Polyfenon podávaný 28 dní v koncentraci 0,1 % snižuje aktivity enzymů CBR, AKR1A1 a AKR1A/1C. Polyfenon v koncentraci 0,01 % signifikantně nemění aktivity enzymů.

10. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical sciences

Candidate: Jana Skorkovská

Supervisor: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: **Effect of polyphenon on selected biotransformation enzymes in mice**

The green tea has been used in the world for centuries. Main substances in green tea include polyphenol compounds, for example catechins. Lately, possible positive effects of green tea and its substances on organisms have been studied intensively. Reduction of obesity and obesity related pathological conditions belongs among these effects.

The aim of this diploma thesis was to study the effects of green tea extracts (polyphenon) on activity and expression of selected biotransformational enzymes in normal and in obese mice. Measuring was performed in subcellular fractions of liver and small intestine homogenates of male mice. Out of 8 experimental groups two were the control groups (a group of normal and a group of obese mice who had not polyphenon in diet). Three groups of normal mice and three groups of obese mice were fed (over 3 or 28 days) with diet containing polyphenon in two different concentrations (0,1 and 0,01 %).

Results showed that three-day administration of polyphenon (0,1 % concentration in diet) significantly increased the activity of AKR1C enzyme in obese mice. Polyphenon administered for 28 days in 0,1 % concentration decreases activities of CBR, AKR1A1 and AKR1A/1C enzymes. Polyphenon in 0,01 % concentration doesn't significantly change any enzyme activity.

11. POUŽITÉ ZKRATKY

- A Absorbance
- AA Akrylamid
- ACE Angiotenzin-konvertující enzym
- AKR Aldoketoreduktasa
- APS Persíran amonný
- ARC Nucleus arcuatus hypothalami
- BCA Bicinchoninic acid
- bis AA Bis akrylamid
- BMI Body mass index
- BSA Sérový albumin
- CBR Karbonylreduktasa
- COMT Katechol-O-methyltransferasa
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA Deoxyribonukleová kyselina
- DTT Dithiotreitol
- EC Epikatechin
- ECG Epikatechin galát
- EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid
- EGC Epigallokatechin
- EGCG Epigallokatechin galát
- EGTA Ethylene glycol tetraacetic acid
- GHRH Somatoliberin
- GSH Glutathion
- GST Glutathion-S-transferasa
- GST-CDNB GST- chlorodinitrobenzen
- HDL High density lipoproteins
- HIV Human immunodeficiency virus
- HOMA Homeostasis model assesment
- IgE Imunoglobulin E
- IMAO Inhibitory monoaminoxidasy

- LDL Low density lipoproteins
- MSG Monosodium glutamát
- N Normální myši
- NADP⁺ Oxidovaná forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
- NADPH Redukovaná forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
- O Obézní myši
- PBS Fosfátový pufr
- PMSF Fenylmethansulfonylfluorid
- ROS Reaktivní formy kyslíku
- SDS Sodium dodecyl sulfate
- T $\frac{1}{2}$ Eliminační poločas
- TBST Tris pufr obsahující chlorid sodný a Tween 20
- TCA Trichloroctová kyselina
- TEMED Tetramethylethylendiamin
- Tris Tris(hydroxymethyl)aminoethan
- U Jednotka enzymové aktivity
- UDP-GA UDP-glukuronová kyselina
- UGT UDP-glukuronosyl transferasa
- UV Ultrafialové záření
- ϵ Molární extinkční koeficient

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura 2H- chromenu

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/18/2H-Chromen.svg/149px-2H-Chromen.svg.png>

Obrázek 2: Struktura flavanu

<http://www.drobkysveta.estranky.cz/img/original/36/flavan.jpg>

Obrázek 3: Struktura kyseliny gallové

<http://www.wikiskripta.eu/images/7/74/Gallov%C3%A1.jpg>

Obrázek 4: Struktura kyseliny hexahydroxybifenylové

<http://www.wikiskripta.eu/images/8/83/Hexahydroxybifenylov%C3%A1.jpg>

Obrázek 5: Struktura kyseliny ellagové

<http://www.wikiskripta.eu/images/c/c4/Ellagov%C3%A1.jpg>

Obrázek 6: Struktury vybraných katechinů

<http://www.chempoint.cz/data/imgs/01300l.jpg>

Obrázek 7: Struktura xanthinu

http://www.studiumchemie.cz/materialy/img_pokusy/kofein_2.png

Obrázek 8: Struktura kofeinu

http://www.studiumchemie.cz/materialy/img_pokusy/kofein_3.png

Obrázek 9: Struktura theofylinu

<http://vygosh.cz/img/theofyllinstruktura.jpg>

Obrázek 10: Struktura theaninu

<http://teamania.ch/blog/wp-content/uploads/2013/08/Theanine.png>

Obrázek 11: Metylace EGC a EGCG enzymem COMT a výsledné metabolity

LEKH R. *Green tea polyphenols: nutraceuticals of modern life*. Hoboken: CRC Press, 2013. ISBN 978-143-9847-893.

Obrázek 12: Metabolismus kyslíku a vznik kyslíkových radikálů

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902-3912-9.

Obrázek 13: Mechanismus inhibice uvolňování histaminu z žírných buněk

LEKH R. *Green tea polyphenols: nutraceuticals of modern life*. Hoboken: CRC Press, 2013. ISBN 978-143-9847-893.

Obrázek 14: Cesty biotransformace v lidském organismu

NASSAR, Ala F. *Biotransformation and metabolite elucidation of xenobiotics*. Hoboken, N. J.: John Wiley, c2010, XI, 328 s. ISBN 978-047-0504-789.

Obrázek 15: Mechanismus přenosu elektronu enzymem UGT nukleofilního substrátu a vznik glukuronidu

JANCOVA, Petra, Pavel Anzenbacher a Eva Anzenbacherova. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers*. 2010-6-1, roč. 154, č. 2, s. 103-116. DOI: 10.5507/bp.2010.017.

Obrázek 16: Konjugace glutathionu s xenobiotikem a vznik konjugátu

JANCOVA, Petra, Pavel Anzenbacher a Eva Anzenbacherova. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers*. 2010-6-1, roč. 154, č. 2, s. 103-116. DOI: 10.5507/bp.2010.017.

Obrázek 17: Obézní myš s leptinovou a inzulinovou resistencí

Obrázek 18: Myši po podání MSG

Obrázek 19: Mechanismus vzniku GS-CDNB konjugátu

YE L and Zhang Y: *Carcinogenesis* 2001, roč. 22, č. 12, s. 1987-1992

- Obrázek 20:** Porovnání normálních a obézních myší
- Obrázek 21:** Kalibrační křivka koncentrace proteinu v cytosolu jater a tenkého střeva
- Obrázek 22:** Kalibrační křivka koncentrace proteinu v mikrosomech jater a tenkého střeva
- Obrázek 23:** Aktivita enzymu GST v jaterním cytosolu
- Obrázek 24:** Aktivita enzymu GST v cytosolu tenkého střeva
- Obrázek 25:** Aktivita enzymu UGT v jaterních mikrosomech
- Obrázek 26:** Aktivita enzymu UGT v mikrosomech tenkého střeva
- Obrázek 27:** Aktivita enzymu CBR v jaterním cytosolu
- Obrázek 28:** Aktivita enzymu CBR v cytosolu tenkého střeva
- Obrázek 29:** Aktivita enzymu AKR1A1 v jaterním cytosolu
- Obrázek 30:** Aktivita enzymu AKR1A1 v cytosolu tenkého střeva
- Obrázek 31:** Aktivita enzymu AKR1C v jaterním cytosolu
- Obrázek 32:** Aktivita enzymu AKR1C v cytosolu tenkého střeva
- Obrázek 33:** Aktivita enzymu AKR1A/1C v jaterním cytosolu
- Obrázek 34:** Aktivita enzymu AKR1A/1C v cytosolu tenkého střeva
- Obrázek 35:** Množství proteinu enzymu CBR v jaterním cytosolu
- Obrázek 36:** Detekce proteinu enzymu CBR v jaterním cytosolu
- Obrázek 37:** Množství proteinu enzymu UGT v jaterních mikrosomech
- Obrázek 38:** Detekce proteinu UGT v jaterních mikrosomech

13. POUŽITÁ LITERATURA

CABRERA, Carmen, Reyes Artacho a Giménez. Beneficial Effects of Green Tea - A Review. *Journal of the American College of Nutrition*. 2006, roč. 25, č. 2, s. 79-99.

CRESPY a WILLIAMSON. A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in In Vivo Animal Models. *American Society for Nutritional Sciences*. 2004, roč. 134, č. 12, s. 3431-3440.

EHRlich, Steven D. Green Tea. 2011. Dostupné z: <http://umm.edu/health/medical/altmed/herb/green-tea> [cit. 20. 3. 2014]

HARA, Yukihiro. *Green tea: health benefits and applications*. New York: Marcel Dekker, c2001, XVI, 252 s. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 106. ISBN 08-247-0470-3.

IOANNIDES, Costas. *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*. New York: J. Wiley, c2002, VIII, 578 s. ISBN 04-718-9466-4.

JANCOVA, Petra, Pavel Anzenbacher a Eva Anzenbacherova. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers*. 2010-6-1, roč. 154, č. 2, s. 103-116. DOI: 10.5507/bp.2010.017.

KING W. Michael. *The Medical Biochemistry Page: Obesity* c1996-2013 [online] [cit. 11. 3. 2014]

KNEJZLÍK, Zdeněk, Jan Káš a Tomáš Ruml. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy*. 2000, roč. 94, s. 913-918.

LEKH R. *Green tea polyphenols: nutraceuticals of modern life*. Hoboken: CRC Press, 2013. ISBN 978-143-9847-893.

LIN, Ji, Mary Anne Della-Fera a Clifton A. Baile. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity*. 2005, roč. 13, č. 6, s. 982-990. DOI: 10.1038/oby.2005.115.

LÜBECK, Walter. *Zelený čaj: [uzdravující požitek]*. Vyd. 1. Olomouc: Fontána, 2007, 141 s. ISBN 978-80-7336-413-7.

LUUKKANEN, L. Kinetic characterization of the 1A subfamily of recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition*. 2005-04-20, roč. 33, č. 7, s. 1017-1026. DOI: 10.1124/dmd.105.004093.

MALETÍNSKÁ L, Toma RS, Pirník Z, Kiss A, Slaninová J, Haluzík M, Železná B. Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. *Regul. Pept.* 2006, roč. 136(1-3), s. 58-63.

MATÉ L., Virkel G., Lifschitz A., Ballent M., Lanusse C.: Hepatic and extra-hepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep, *Biochemical Pharmacology* 2008, roč. 76, s. 773-783

MATYŠKOVÁ R, Maletínská L, Maixnerová J, Pirník Z, Kiss A, Železná B.: Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 and NMRI mice. *Physiol. Res.* 2008, roč. 57, č. 5., s. 727-34.

MINDNICH, Rebekka D. a Trevor M. PENNING. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *Hum Genomics*. 2009, roč. 3, č. 4, s. 362-370.

NAGAO, Tomonori, Tadashi Hase a Ichiro Tokimitsu. A Green Tea Extract High in Catechins Reduces Body Fat and Cardiovascular Risks in Humans. *Obesity*. 2007, roč. 15, č. 6, s. 1473-1483. DOI: 10.1038/oby.2007.176.

NASSAR, Ala F. *Biotransformation and metabolite elucidation of xenobiotics*. Hoboken, N. J.: John Wiley, c2010, XI, 328 s. ISBN 978-047-0504-789.

OHARA H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Kara A. (1995): Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver, *Biochemical Pharmacology* 50, s. 221 – 227

PENNING, Trevor M. a Jason E. DRURY. Human aldo–keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007, roč. 464, č. 2, s. 241-250. DOI: 10.1016/j.abb.2007.04.024.

PILKA, Ewa S., Frank H. Niesen, Wen Hwa LEE, Yasser El-Hawari, James E. Dunford, Grazyna Kochan, Vladimir Wsól, Hans-Joerg Martin, Edmund Maser, Udo Oppermann a Nick Gay. Structural Basis for Substrate Specificity in Human Monomeric Carbonyl Reductases. *PLoS ONE*. 2009-10-20, roč. 4, č. 10, DOI: 10.1371/journal.pone.0007113.

PREEDY, Victor R. *Tea in health and disease prevention*. Waltham, MA: Elsevier/Academic Press, c2013. ISBN 01-238-4937-3.

PROCHÁZKOVÁ, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*. *Fitoterapia* 2011,82(3): 513-523.

SKÁLOVÁ, Lenka a Iva BOUŠOVÁ. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2011, 160 s. ISBN 978-802-4619-170.

SLANINA, J; Táborská, E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy* 2004; roč. 98, s. 239-245.

SMITH PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 1985 roč. 150, s. 76-85.

SOKOLOV, E. I. *Emotions, hormones, and atherosclerosis*. Utrecht, Netherlands: VSP, 1994. ISBN 90-676-4167-7.

SPIPKOVÁ J. a T. SIATKA: Zelený čaj- zdroj cenných látek pro využití v terapii. *Praktické lékařství* 5/2006, s. 227-228.

ŠKARYDOVÁ, Lucie a Vladimír WSÓL. Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 2012, roč. 44, č. 2, s. 173-191. DOI: 10.3109/03602532.2011.638304.

TEUFL, Cornelia. *Zelený čaj - elixír zdraví*. Překlad Romana Barfussová. Praha: Metramedia, 2000, 95 s. ISBN 80-238-5536-0.

TOWBIN H et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350-4354

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902-3912-9.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 304 s. ISBN 80-902-3912-9.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902-3912-9.

WACHENDORF, Viola von. *Čaj*. Praha: Slovart, c2007, 96 s. ISBN 978-80-7209-922-1.

WATSON, Ronald R a Victor R PREEDY. *Botanical medicine in clinical practice*. Cambridge, MA: CABI, c2008, XVIII, 915 p. ISBN 978-184-5934-132.

WERMUTH, Benedicht, Kurt M. Bohren, Gabriela Heinemann, Wartburg a Gabbay. Human Carbonyl Reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1988, roč. 263, č. 31, s. 16185-1618.

WINKEL-SHIRLEY, Brenda. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant physiology*. 2001, s. 485-493.

YANG, Chung S. a Janelle M. LANDAU. Effects of Tea Consumption on Nutrition and Health. *The Journal of Nutrition*. 2000, roč. 130, č. 10, s. 2409-2412.

YE L and Zhang Y: *Carcinogenesis* 2001, roč. 22, č. 12, s. 1987-1992

ZAVERI, Nurulain T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*. 2006, roč. 78, č. 18, s. 2073-2080. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.12.006.

Internetový zdroj: převzato z <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/> [cit. 27. 3. 2014]