

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**ÚČINEK VYBRANÝCH SESKVITERPENŮ NA ANTIOXIDAČNÍ
ENZYMY U BUNĚČNÉ LINIE CACO-2**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Hana Svobodová, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Tomáš Janíček

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne

.....

Tomáš Janíček

PODĚKOVÁNÍ

Moc rád bych poděkoval mé milé školitelce PharmDr. Haně Svobodové, Ph.D. za čas a cenné rady, které mi věnovala; za její trpělivost, vstřícnost a povzbuzení. Dále patří dík Ing. Petře Matouškové, Ph.D., jež mi pomohla proniknout do jedné z metod, všem dalším pracovníkům z Katedry biochemických věd, kteří mě s vlídností snášeli, a kolegyni Martině Junkové. Nemohu opomenout mou rodinu a mé blízké, kteří mi byli oporou po celou dobu mých studií.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Tomáš Janíček

Školitel: PharmDr. Hana Svobodová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Účinek vybraných seskviterpenů na antioxidační enzymy u buněčné linie Caco-2**

Velmi častými zhoubnými novotvary jsou kolorektální karcinomy, přičemž Česká republika má v celosvětovém měřítku šestou nejvyšší incidenci tohoto onemocnění. Běžná chemoterapie není často ideální volbou a je snaha hledat látky, které by ji mohly pro svou účinnost nahradit či snížit její dávky, a tedy i nežádoucí účinky. Slibným zdrojem přírodních látek je čínský strom *Myrica rubra*, jehož extrakty inhibovaly proliferaci mnohých nádorových buněčných linií. Také na několika střevních nádorových buněčných liniích byla pozorována inhibice růstu po jejich kultivaci se silicí z listů *M. rubra* (SMR), přičemž linie Caco-2 byla nejcitlivější. I u hlavních seskviterpenů SMR β -karyofylenoxidu, α -humulenu (α -HUM), trans-nerolidolu (t-NER) a valencenu byl zjištěn antiproliferační účinek u této linie. α -HUM a t-NER vykazaly na střevních nádorových buňkách tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS). Cílem naší práce bylo dozvědět se, jakým způsobem ovlivňuje u Caco-2 buněk SMR, α -HUM a t-NER o koncentraci 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ aktivity antioxidačních enzymů, jejich transkripci a množství enzymových proteinů po 24 hodinách. Výsledky ukázaly v několika případech zvýšení aktivity glutathionreduktasy (GR), včetně zvýšení transkripce a množství GR proteinu oproti kontrolní linii. U glutathionperoxidasy (GPx) nebyla pozorována změna aktivity, avšak došlo ke snížení exprese genů její izoformy 7 (GPx7), která však postrádá glutathion peroxidasovou aktivitu a funguje v buňce jako stresový senzor. Množství detekovaného proteinu GPx7 bylo sníženo u poloviny zkoumaných vzorků. Aktivita glutathion-S-transferasy (GST), katalasy (CAT) a superoxidodismutasy (SOD) nebyla v podstatě změněna, stejně jako jejich transkripce a množství CAT proteinu. NAD(P)H Chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1) nevykazala detekovatelnou aktivitu ani u kontrolní, ani u ovlivněné linie.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Tomáš Janíček

Supervisor: PharmDr. Hana Svobodová, Ph.D.

Title of diploma thesis: **The effect of selected sesquiterpenes on antioxidant enzymes in Caco-2 cell line**

Colorectal carcinoma is a very frequent type of malignant neoplasms, while the Czech Republic has the sixth highest incidence of this disease globally. Current chemotherapy is often not an ideal option, and there is an effort to find substances that could replace it or reduce its dosage, and therefore its adverse effects. A promising source of natural substances is the Chinese tree *Myrica rubra*, whose extracts have inhibited the proliferation of many tumour cell lines. Also, in several colon carcinoma cell lines, the growth inhibition was observed after their cultivation with the essential oil from the *M. rubra*'s leaves (SMR), with the Caco-2 line being the most sensitive. The main sesquiterpenes of SMR β -caryophyllene, α -humulene (α -HUM), trans-nerolidol (t-NER) and valencene proved the antiproliferative effects on this cell line too. α -HUM and t-NER showed the formation of reactive oxygen species (ROS) on colon carcinoma cells. The aim of our work was to find out how SMR, α -HUM and t-NER at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$, influence the activity of antioxidant enzymes, their transcription and the enzyme protein abundance in Caco-2 after 24-hour incubation. Our results showed an increased activity of glutathione reductase (GR) in some cases, including an increase in transcription and in GR protein level in comparison with the control cell line. We did not observe any change in glutathione peroxidase's (GPx) activity, however, there was a reduced gene expression of its isoform 7 (GPx7), which lacks glutathione peroxidase activity and acts as a stress sensor. The quantity of detected protein GPx7 was decreased in half of the examined samples. The activity of glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) remained basically unchanged, as well as their transcription and the amount of CAT protein. NADP(H) quinone oxidoreductase 1 (NQO1) showed no detectable activity both in the control, and in the cells influenced by sesquiterpenes.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teorie.....	9
2.1	Caco-2 a kolorektální karcinom	9
2.2	Silice z <i>Myrica rubra</i> a vybrané seskviterpeny	11
2.2.1	<i>Myrica rubra</i>	11
2.2.2	Biologické účinky <i>M. rubra</i>	13
2.2.3	Seskviterpeny.....	18
2.2.3.1	Alfa-humulen (α -HUM).....	19
2.2.3.2	Trans-nerolidol (t-NER).....	22
2.3	Antioxidační enzymy	24
2.3.1	Glutathionperoxidasa (GPx)	25
2.3.2	Glutathionreduktasa (GR).....	25
2.3.3	Glutathion-S-transferasa (GST).....	26
2.3.4	Katalasa (CAT).....	27
2.3.5	NAD(P)H Chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1)	28
2.3.6	Superoxiddismutasa (SOD)	29
3	Cíl	30
4	Experimentální část	31
4.1	Materiál	31
4.1.1	Chemikálie	31
4.1.2	Přístroje.....	32
4.2	Metodika	32
4.2.1	Stanovení aktivit	32
4.2.1.1	Příprava subcelulárních frakcí.....	32
4.2.1.2	Stanovení celkové bílkoviny	33
4.2.1.3	Glutathionperoxidasa (GPx).....	34
4.2.1.4	Glutathionreduktasa (GR)	34
4.2.1.5	Glutathion-S-transferasa (GST)	35
4.2.1.6	Katalasa (CAT)	36
4.2.1.7	NAD(P)H Chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1).....	37
4.2.1.8	Superoxiddismutasa (SOD).....	37
4.2.2	Genová exprese.....	39
4.2.2.1	Příprava vzorků	39

4.2.2.2	Izolace RNA.....	39
4.2.2.3	Kontrola RNA	40
4.2.2.4	DNase treatment.....	41
4.2.2.5	Reverzní transkripce.....	42
4.2.2.6	Real-Time PCR	42
4.2.3	Detekce proteinů	45
4.2.3.1	Příprava vzorků	45
4.2.3.2	Elektroforéza proteinů.....	47
4.2.3.3	Western blotting (WB).....	48
4.2.4	Statistická analýza.....	50
5	Výsledky.....	51
5.1	Stanovení celkové bílkoviny	51
5.2	Aktivity enzymů.....	53
5.2.1	Glutathionperoxidasa (GPx)	53
5.2.2	Glutathionreduktasa (GR).....	54
5.2.3	Glutathion-S-transferasa (GST).....	55
5.2.4	Katalasa (CAT).....	56
5.2.5	NAD(P)H Chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1)	56
5.2.6	Superoxiddismutasa (SOD)	57
5.3	Ovlivnění genové exprese	58
5.3.1	Glutathionperoxidasa 7 (GPx 7)	58
5.3.2	Glutathionreduktasa (GR).....	59
5.3.3	Glutathion-S-transferasa π (GSTp).....	60
5.3.4	Katalasa (CAT).....	61
5.3.5	Superoxiddismutasa (SOD)	62
5.4	Detekce proteinů	63
5.4.1	Glutathionperoxidasa 7 (GPx 7)	63
5.4.2	Glutathionreduktasa (GR).....	64
5.4.3	Katalasa (CAT).....	65
6	Diskuse	66
7	Závěr.....	71
8	Použité zkratky	72
9	Literatura, zdroje	74

1 Úvod

Rakovina je ve vyspělých zemích druhou nejčastější příčinou úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocněních, přičemž velmi častými zhoubnými novotvory jsou kolorektální karcinomy. V celosvětovém měřítku má Česká republika šestou nejvyšší incidenci tohoto onemocnění. V roce 2014 bylo u nás hlášeno na 8 160 nových případů a zhruba polovina dotčených onemocnění podlela (ÚZISČR). Vzhledem k závažným nežádoucím účinkům běžné chemoterapie a k narůstající rezistenci nádorových buněk existuje snaha pátrat po nových alternativních látkách z přírodních zdrojů, které by se mohly použít k léčbě buď samostatně, nebo v kombinaci se současně existující terapií, a tak podpořit její účinnost a snížit její nežádoucí účinky.

Využití rostlinných molekul v profylaxi a léčbě nemocí může být dobrou strategií. Úspěšnými příklady je užití artemisininu jakožto léku proti malárii či taxolu v léčbě rakoviny. Rozmanité farmaceutické a biologické účinky, jako antibakteriální, antifungální, protirakovinné, protimutagenní, antidiabetické, antivirové, protizánětlivé či antiprotozoální bývají připisovány rostlinným silicím (Raut et Karuppayil 2014). Langhasova et al. (2014) zjistili u silice čínského stromu *Myrica rubra* významné antiproliferativní účinky u několika střevních nádorových buněčných linií, z nichž Caco-2 byla nejcitlivější. Ambrož et al. (2015) zkoumali antiproliferační účinky několika jednotlivých seskviterpenů obsažených v této silici, přičemž inhibičně na růst působil β -karyofylenoxid, α -humulen, trans-nerolidol a valencen. Klímová (2015) pak ve své diplomové práci zabývající se střevními nádorovými buňkami dospěla k tomu, že z výše zmíněných seskviterpenů α -humulen a trans-nerolidol zvyšovaly nejvíce tvorbu reaktivních forem kyslíku.

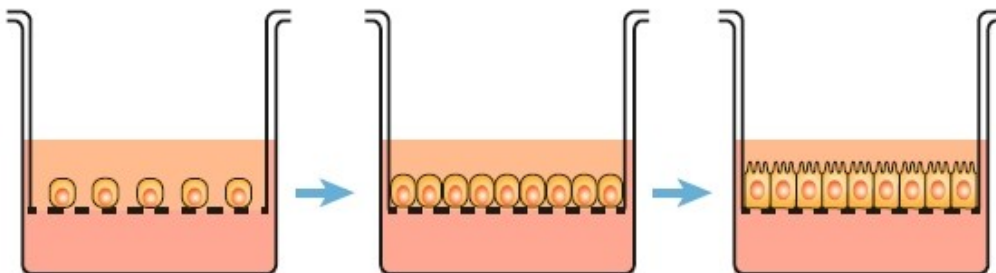
Tato zjištění nás vedla k tomu, abychom více prozkoumali tuto problematiku a dozvěděli se, zda silice z *M. rubra* a dva vybrané seskviterpeny α -humulen a trans-nerolidol ovlivňují také aktivitu antioxidantních obranných enzymů v nádorové buněčné linii Caco-2. Nutno dodat, že terpeny mnohokrát vykazaly antioxidantní účinky vůči normálním buňkám, zatímco vůči těm nádorovým působil prooxidálně; mohly by tak být nadějným zdrojem protirakovinných léků (Bartíková et al. 2014).

2 Teorie

2.1 Caco-2 a kolorektální karcinom

Buněčná linie Caco-2 (Cancer coli-2) byla získána z lidského dobře diferencovaného kolorektálního adenokarcinomu 72 letého muže bělošské rasy v roce 1977 Jorgenem Foghem ve Sloan-Kettering Cancer Research Institute (Fogh et al. 1977) a o několik let později se dočkala pro své výjimečné vlastnosti širokého využití.

Nediferencované proliferující buňky Caco-2, které jsme používali, slouží jako model střevního karcinomu. Mají širší plasticitu buněčné fyziologie a vyšší adaptaci na stres než polarizované enterocyty. Po vysazení je jejich růst exponenciální. Pokud však necháme Caco-2 kultivovat déle, začnou po dosažení konfluence (vytvoření husté, prakticky souvislé, vzájemně se dotýkající vrstvy buněk na kultivačním povrchu) spontánně vyvíjet typické vlastnosti epiteliálních buněk tenkého střeva, jako je cylindrický tvar buňky, hustý kartáčový lem mikrokloků na apikální straně a těsné spoje (tight junctions) mezi sousedními buňkami (Obr. 1). Navíc exprimují jak hydrolasy typické pro enterocyty (např. sacharasu-isomaltasu, laktasu, aminopeptidasu N či dipeptidylpeptidasu IV), tak přenašeče živin pro aminokyseliny, vitaminy a cukry. Transport živin a iontů pak probíhá především z apikální strany směrem k bazolaterální straně. Plně diferencované jsou buňky za 14-21 dní, přičemž jsou svým fenotypem bližší fetálním ileálním enterocytům než střevním buňkám kyčelníku dospělého člověka. Během procesu diferenciaci byla analyzována exprese 18149 genů. U Caco-2 však nebyla detekována žádná či téměř žádná aktivita cytochromu P-450, ovšem bylo zjištěno, že jeho hladiny mohou být indukovány inkubací s $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 , aktivním metabolitem vitamínu D (Bajak et al. 2015, Engle et al. 1998, Jahn et al. 2010, Sun H. et al. 2008, Verhoeckx et al. 2015, Vinholes et al. 2014).



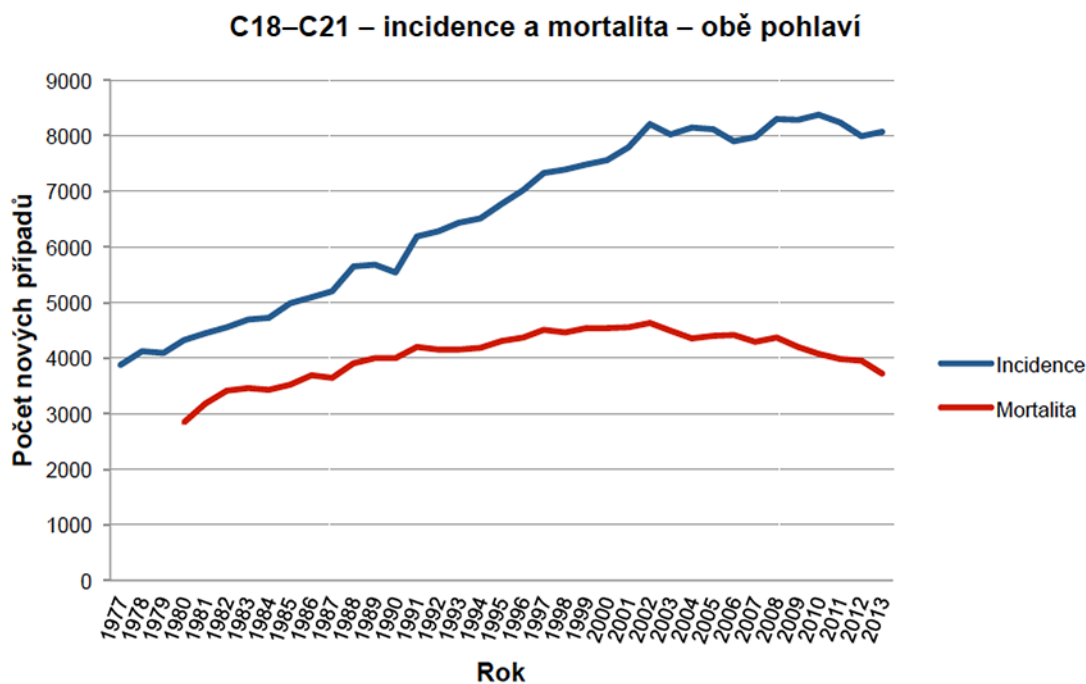
Obrázek 1 – vývoj Caco-2 buněk. Jakmile Caco-2 dosáhnou konfluence, vytvoření souvislé vrstvy (uprostřed), začnou se diferencovat (Verhoeckx et al. 2015).

Od devadesátých let jsou diferencované Caco-2 široce používány jako bližší fyziologický model pro studium intestinálního transportu a toxicity v akademických i průmyslových laboratořích (např. ke screeningu lékových kandidátů). Primární střevní epitelální buňky (enterocyty, pohárkové buňky, enteroendokrinní buňky, Panethovy buňky či M-buňky) byly pro studium příliš heterogenní jak do morfologie, tak i do funkce, a proto byla potřeba nalézt nádorové buňky diferencující ve více specializované buněčné typy. Některé buněčné linie sice mohly částečně diferencovat přidáním jistých syntetických či biologických faktorů do media, ale jedna z nich, právě Caco-2, se časem ukázala být unikátní a výhodnou pro spontánní diferenciaci. Ačkoliv data získaná z diferencovaných buněčných modelů Caco-2 nemohou být zcela přímo srovnávána se situací *in vivo*, více studií ukázalo na vysokou korelaci koeficientu permeability Caco-2 s daty o střevní absorpci u lidí, především co se týkalo pasivního paracelulárního transportního mechanismu. K monitoringu integrity buněčné vrstvy se pak využívá měření trans-epitelálního elektrického odporu po konfluenci, který koreluje také s množstvím vzniklých těsných spojů, a pro kontrolu morfologické diferenciaci elektronová transmisní mikroskopie (Tadjali et al. 2002, Verhoeckx et al. 2015).

Kolorektální karcinom, maligní nádor vznikající z buněk epitelu tlustého střeva a konečníku (pro jehož studium jsme použili model nediferencovaných Caco-2 buněk), patří mezi nejčastější onkologické diagnózy a jeho incidence ve všech vyspělých státech stále narůstá. Česká republika ke všemu v mezinárodním srovnání obsazuje přední místa. Podle dat GLOBOCAN z roku 2012 (Ferlay et al. 2013) jsou čeští muži v evropském přehledu na 3. místě za Slovenskem a Maďarskem a ženy obsazují 10. nejvyšší pozici v Evropě. Každoročně je v ČR nově diagnostikováno kolem osmi tisíc pacientů s tímto karcinomem a téměř polovina z nich na něj zemře. Celosvětově se odhaduje, že v roce 2012 bylo nově diagnostikováno 1 360 602 nádorů kolorekta, čímž se řadí mezi tři nejčastější zhoubné nádory (ZN). Odhadovaný počet úmrtí v r. 2012 ve spojitosti s tímto onemocněním byl 693 933 (8,5 % všech úmrtí na ZN a 4. místo mezi ZN jako příčinou úmrtí), z toho 214 866 v Evropě (12,2 % úmrtí na ZN, 2. místo mezi ZN jako příčinou úmrtí). Odhadovaná prevalence do 5 let od diagnózy ZN kolorekta pak byla pro rok 2012 celosvětově 3 543 582 (68,2 na 100 000 osob) a 1 203 943 v Evropě (192,3 na 100 000 osob).

Podle dostupných populačních dat o kolorektálním karcinomu je zřejmé, že v ČR je i nadále velmi vysoký podíl nových pacientů s tímto onemocněním

diagnostikován v klinickém stádiu III nebo vyšším, což se týká všech regionů ČR. Tím se samozřejmě výrazně zhoršují dosažitelné výsledky léčby a narůstají související náklady. Situace se žel nijak zvlášť v čase nelepší. Typický věk českého pacienta s kolorektálním karcinomem leží v intervalu 60–79 let, ovšem téměř 20 % všech nemocných je mladších než 60 let (www.kolorektum.cz).



Obrázek 2 – Incidence a mortalita na karcinomy tlustého střeva (C18-C20) v ČR v čase, obě pohlaví (zdroj: www.kolorektum.cz).

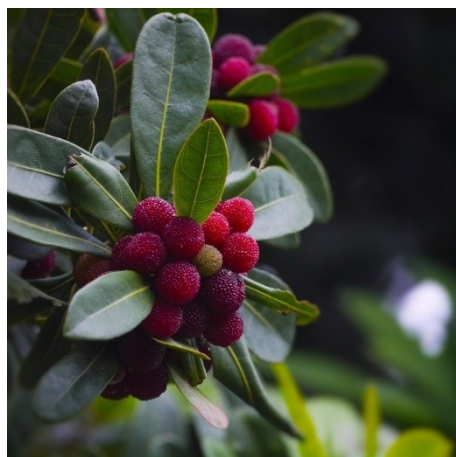
2.2 Silice z *Myrica rubra* a vybrané seskviterpeny

2.2.1 *Myrica rubra*

Myrica rubra (Sieb. et Zucc., Myricaceae), voskovník červený (anglicky Red Bayberry), je subtropický vždyzelený dvoudomý ovocný strom původem z jihovýchodní Číny, kde byl kultivován více jak 2000 let. Nejstarší záznamy ukazují, že v provincii Zhejiang byly plody konzumovány již před více jak 7000 lety. Strom má kulatou klenbu větví a dobře roste v málo úrodných půdách ve spojení s dusík-vázající bakterií *Actinomyces frankia* a na stinných místech. Optimum pro jeho růst je rozmezí teplot mezi 15 a 20°C, avšak snese i chladnou zimu s průměrnými teplotami nad 2°C a absolutní minimální teplotou kolem -9°C, důležitý je také dostatek vláhy (1 000 mm srážek za rok). Je ekonomicky nejvýznamnější rostlinou z čeledi Myricaceae pro své

plody bobule, jež mají nejen atraktivní barvu, ale i chuť. Ty ve většině čínských produkčních oblastí (provincie Zhejiang a Jiangsu) dozrávají v červnu a počátkem července, což je dříve než většina ostatních tamějších ovocných plodů, a patří zde mezi jedny z nejdůležitějších ovocí. Avšak čerstvé plody podléhají při skladování rychlé zkáze (při 0-2°C vydrží 9-12 dní, při 10-12°C 5-7 dní a při 20-22°C jen 3 dny), a tak kromě konzumace čerstvých bobulí z nich bývají připravovány džusy, zavařeniny, marmelády či vína. Plody a kořeny byly užívány také jako důležitá součást tradiční čínské medicíny již před Kristem. Bobule k dekongesci, k léčbě kašle, dále pro své adstringentní vlastnosti k terapii zažívacích problémů, jako jsou syndrom dráždivého tračníku, mukózní kolitida či průjem. Pasta z upráškované kořenové kůry působí mimo jiné také hojivě na rány a vředy. Ve velkých dávkách působí voskovník jako emetikum.

Komerční produkce je stále velmi omezena na Čínu, kde je strom dobře známý, na rozdíl od jiných zemí světa, a jeho pěstování zde stále narůstá. Kupříkladu v provincii Zhejiang bylo v roce 1959 vyprodukováno 26 500 t plodů na 4 400 ha půdy, v roce 1985 pak 46 200 t na 17 500 ha půdy a 129 750 t za rok 2000 v oblasti o rozloze 38 378 ha. Celková roční produkce se pohybuje kolem 300 000 t. Plodina se pěstuje také v části Thajska, ačkoliv kvalita plodů je nevalná, a v některých oblastech Japonska. Pro dosažení vysoké produkce plodů je třeba strom každý rok alespoň dvakrát prořezat. Pokud je strom pěstován v Americe či v Evropě, tak pouze za okrasným účelem. V Číně jej také vysazují pro zvýšení organické hmoty v půdě, redukci půdní eroze a zlepšení čínské krajiny. Často bývá sázen pospolu s existující vegetací, jako jsou borovice či jiné lesní stromy. Strom je odolný vůči smogu a oxidu siřičitému, a tak může růst i podél silnic a v průmyslových oblastech (He X. H. et al. 2004, Chen K. et al. 2004, Li et He 2006).



Obrázek 3 – plody čínského stromu *Myrica rubra* (www.freegreatpicture.com)

Co se týče množství existujících kultivarů tohoto stromu, je literatura celkem nejednotná. Chen (2000) rozdělil druh na dva kultivary (s plody o měkké dužině či o tvrdé), The Chinese Red Bayberry Cooperation Association zavedla tři typy podle období dozrávání plodů a podle barvy zralých plodů můžeme rozlišit kultivary čtyři: (a) divoký, který bývá využíván pro oddenky, má červené kyselé plody s malým množstvím dužiny, které dozrávají již na začátku června; (b) červený, jehož plody bývají obvykle větší a kvalitnější než u jiných typů; (c) černý, poskytující nejkvalitnější plody o červenočerném zbarvení s velkým množstvím dužiny, od níž lze lehce odloučit pecku; a poslední (d) bílý, jehož plody v průběhu dozrávání získávají rozdílné odstíny bílé a jehož výnosnost a kvalita plodů je nižší než u dvou předchozích typů, pro což není jeho pěstování moc rozšířeno. Zhang a Miao (1999) dokázali zase rozlišit v Číně na 268 kultivarů (Chen K. et al. 2004, Yang et al. 2011). Jinde je možné se dočíst o existenci více jak 300 kultivarů (He X. H. et al. 2004, Zhang X. et al. 2015).

Jak bylo řečeno výše, *M. rubra* byla mnohá staletí používána v čínské tradiční medicíně a snad i proto je předmětem mnohých studií i dnes. Extrakty z různých částí rostlin obsahují rozdílné sloučeniny. Listy a kůra jsou bohaté na flavonoidy, proanthokyanidiny, terpeny a diarylheptanoidy. Kůra se pro vysoký obsah taninů (10-27%) používá k barvení oblečení do žluta až hněda. Jádro bobule je dobrým zdrojem proteinů, nenasycených mastných kyselin, taninů, hořčičku, draslíku a vápníku. Bobule samotná je pak bohatým zdrojem cyanidin-3-O-glukosidu, zvláště co se týče černého kultivaru, kde jeho obsah dosahuje 85% oplodí, což je podobné množství jako v ostružinách. V plodu se dále hojně vyskytují flavonoly, fenolické kyseliny, cukry, organické kyseliny, proteiny, vitaminy, draslík ve vyšším množství a stopové prvky (Fe, Mn, Zn, Cu a Mg). V tmavých plodech se oproti světlým vyskytuje více antioxidantně účinných fenolických a flavonoidních látek (He X. H. et al. 2004, Zhang X. et al. 2015).

2.2.2 Biologické účinky *M. rubra*

Byly zjištěny značné antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, protialergické, antibakteriální (např. vůči *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*) (Zhong et al. 2013) a antidiabetické účinky extraktů tohoto stromu. U extraktů z kůry byly zjištěny také hypolipidemické účinky (He K. et al. 2016, Zhang Y. et al. 2017). Džus vyrobený z *M. rubra* snížil u myši arteriální tlak krve a srdeční frekvenci a také potlačil ADP-indukovanou agregaci krevních destiček (Alajmi et al. 2013). Antioxidační aktivita způsobena především obsahem vitamínu C, fenolických sloučenin

(anthokyanidinu cyanidin-3-O-glukosidu) a flavonoidů v plodech byla několika studii navržena jakožto klíčový mechanismus prevence chronických onemocnění, jako diabetes, rakovina či kardiovaskulární onemocnění. Co se týče protirakovinného účinku, extrakty z voskovníku prokazatelně inhibovaly růst linie lidského cervikálního karcinomu HeLa (kde jako pravděpodobné látky indukující apoptózu byly označeny epigallocatechin 3-O-galát a prodelfinidin A-2,3-O-galát), buněk lidského karcinomu prostaty PC3 a myší leukemické linie P-388 ve zkouškách *in vitro*; *in vivo* pak inhibovaly životaschopnost nádorových buněk u myši s P-388 nádorem. Prodelfinidin B-2 3,3'-di-O-galát a proanthocyanidin galát izolované z kůry indukovaly apoptózu u linie adenokarcinomu prsu MCF-7. V jiné studii prodelfinidin B-2 3,3'-di-O-galát inhiboval proliferaci buněk plicního karcinomu A-549 blokadou postupu buněčného cyklu v G0/G1 fázi a indukoval apoptózu. Diarylheptanoid rubanol izolovaný také z kůry prokázal cytotoxicitu proti buňkám lidského nádoru prsu Bre-04, lidského nádoru plic Lun-06 a lidského neuromu Neu-04. Dalších 6 fenolických sloučenin z kůry prokázalo inhibiční efekt na růst myších melanomových buněk. Antitumorózní účinky etanolických extraktů plodů voskovníku byly zkoumány na mnoha buněčných liniích a ve studiích na zvířatech. Extrakt bohatý na fenoly inhiboval vývoj nádoru tlustého střeva u myši (indukovaného podáváním 1,2-dimethylhydrazinu) (Sun C. et al. 2013, Jiao et Zhang 2016). Cyanidin-3-O-glukosid vykázal antitumorózní aktivitu (korelující s jeho antioxidační aktivitou) na žaludečních adenokarcinomových buňkách SGC7901, AGS a BGC823 snížením jejich proliferace, snížením buněčné přilnavosti a zvýšením apoptózy (Wang et al. 2016). Myricanol z kůry *M. rubra* inhiboval růst A-549 lidského karcinomu plic (Dai et al. 2014). Diarylheptanoidy mají hepatoprotektivní účinky, antiandrogenní aktivitu a inhibiční účinky na uvolnění beta-hexosaminidasy a produkce NO. Methanolový extrakt z kůry (v němž bylo charakterizováno deset cyklických diarylheptanoidů a dva flavonoidy) prokázal silný inhibiční účinek na melanogenesu (snížení množství melaninu) a zároveň nízkou toxicitu při testech na melanomových buňkách B16, dále se ukázal být silným pohlcovačem volných radikálů (Akazawa et al. 2010). Extrakt z listů inhiboval proliferaci buněk hepatocelulárního karcinomu HepG2 (Zhang Y. et al. 2016).

Byly zkoumány také antiproliferativní účinky silic z listů *M. rubra*. Silice (esenciální oleje) jsou komplexní směsi nízkomolekulárních sloučenin extrahovaných parní destilací a různými rozpouštědly. Terpenoidy (především monoterpeny,

seskviterpeny a jejich oxidované deriváty) a fenyylpropanoidy jsou jejich hlavní složky poskytující charakteristické aroma a biologické vlastnosti. Jsou tekuté, prchavé, čiré, zřídka barevné, rozpustné v tucích a organických rozpouštědlech s obecně nižší hustotou než voda. Jsou používány v tradiční medicíně k léčení rozličných obtíží po celém světě. Bývají jim připisovány rozmanité farmaceutické a biologické účinky, jako antibakteriální, antifungální, protirakovinné, protimutagenní, antidiabetické, antivirové, protizánětlivé či antiprotozoální. Svou důležitou roli hrají také v zemědělském průmyslu. Jsou běžně používané jako ochucovadla, aroma či konzervanty v potravinách, nápojích, parfémeh, lécích či kosmetice. Mezi komerčně důležité silice jich patří asi 300 a roční produkce se pohybuje kolem 40000-60000 tun ročně v hodnotě 700 000 000 USD. Složení silic a jejich biologické účinky ovlivňuje mnoho faktorů, jako genetická rozmanitost, množství a složení dostupných živin, opylování, geografická lokace, okolní klima, sezónní změny, stres během růstu, dozrávání, také sušení, uchovávání rostlin po sklizni, použitá část rostlin či metoda extrakce a volba rozpouštědla. Vzhledem k množství faktorů ovlivňujících výsledné složení silic je třeba standardizovat podmínky pěstování a extrakce. Většina komercializovaných silic je typizována plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Zpravidla jsou za jejich aktivitu zodpovědné jedna, dvě hlavní obsahové látky, ovšem v některých případech nelze výsledný efekt přisoudit konkrétní látce a pouze jejich kombinace může vykazat signifikantní účinek. V rostlinách se hromadí obvykle v olejových či pryskyřičných kanálcích, žlázách nebo trichomech (Bakkali et al. 2008, Raut et Karuppayil 2014).

Antiproliferativní účinky silic z listů *M. rubra* (SMR) byly studovány na lidských střevních nádorových buněčných liniích, z důvodu jednoduchého přístupu těchto látek k nádorům při terapii *per os*. Silice byla získána (v Zhejiang provincii prof. Ji-Dong Lou z China Jiliang University) z čerstvých listů v poměru 1:6 s vodou pomocí hydrodestilace, sbírána po 8 hodin s výnosem 0,65 ml oleje na 1 kg listů, poté byla silice vysušena bezvodým sulfátem sodným a rozpuštěna v DMSO. Langhasová et al. (2014) provedli analýzu jejího složení pomocí GC × GC-TOFMS (dvourozměrné plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií). Bylo zjištěno, že SMR je tvořen především seskviterpeny β -karyofylenem (43,2%), α -humulenem (α -HUM, 21,6%), β -karyofylenoxidem (2,6%), valencenem (6,0%), trans-nerolidolem (t-NER, 1,9%), a aromadendrenem (0,6%). Kompletní složení silice je uvedeno v tabulce č. 1.

Tabulka 1 – chemické složení silice z listů stromu *Myrica rubra* (seřazeno podle retenčních časů, Langhasová et al. 2014).

Název	Sumární vzorec	Relativní zastoupení (%)
(Z)-hex-3-en-1-ol	C ₆ H ₁₂ O	0,35
(1R)-(+)- α -pinen	C ₁₀ H ₁₆	0,03
(R)-(+)-limonen	C ₁₀ H ₁₆	0,01
(+/-)-linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0,05
nonanal	C ₉ H ₁₈ O	0,03
4-hexen-1-yl ester butanové kys.	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0,02
ionon	C ₁₃ H ₂₀ O	0,07
α -kubeben	C ₁₅ H ₂₄	0,07
ylangen	C ₁₅ H ₂₄	0,31
kopaen	C₁₅H₂₄	0,56
(-)- β -bourbonen	C ₁₅ H ₂₄	0,02
elemen	C ₁₅ H ₂₄	0,20
β-karyofylen	C₁₅H₂₄	43,24
(-)-germacren D	C ₁₅ H ₂₄	0,57
(+)-aromadendren	C ₁₅ H ₂₄	0,63
(E)- β -famesen	C ₁₅ H ₂₄	st. mn.
α-humulen (α-HUM)	C₁₅H₂₄	21,59
β -kopaen	C ₁₅ H ₂₄	0,05
γ-muurolen	C₁₅H₂₄	3,46
α -muurolen	C ₁₅ H ₂₄	0,37
α -kurkumen	C ₁₅ H ₂₂	0,02
epi-α-selinen	C₁₅H₂₄	5,87
valencen	C₁₅H₂₄	5,97
α -farnesen	C ₁₅ H ₂₄	0,03
β -bisabolen	C ₁₅ H ₂₄	st. mn.
(-)- α -panasinsen	C ₁₅ H ₂₄	0,10
α-ionen	C₁₃H₁₈	0,61
<i>cis</i> -(+)-nerolidol	C ₁₅ H ₂₄	0,04
α -kalakoren	C ₁₅ H ₂₀	0,18

trans-nerolidol (t-NER)	C₁₅H₂₆O	1,91
γ-elemen	C ₁₅ H ₂₄	st. mn.
1,2-dihydro-1,1,5-trimethyl-naftalen	C ₁₃ H ₁₆	st. mn.
(-)-spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0,31
(-)-β-karyofylenoxid	C₁₅H₂₄O	2,60
1,5,5,8-tetramethylcykloundeka-3,7-dien-1-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,33
humulen epoxid I	C₁₅H₂₄O	7,59
kubedol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,03
4,5,9,10-dehydroisolongifolen	C ₁₅ H ₂₀	0,02
(-)-globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,05
leden oxid-(II)	C ₁₅ H ₂₄ O	0,03
4,4-dimethyl-tetracyklo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridekan-9-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	0,44
τ-muurolol	C₁₅H₂₆O	0,67
α-kadinol	C₁₅H₂₆O	0,50
ledol	C₁₅H₂₆O	0,57
1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naftalen	C ₁₅ H ₁₈	0,03
karyofylenoxid	C ₁₅ H ₂₄ O	0, 31
6,10,14-trimethyl-2-pentadekanon	C ₁₈ H ₃₆ O	0, 02
4,4,5-trimethylhex-2-en	C ₉ H ₁₈	st. mn.
fytol	C ₂₀ H ₄₀ O	0,11

st. mn. = stopové množství

72 hodinová expozice SMR vedla k signifikantnímu poklesu životaschopnosti u střevních nádorových buněk HCT8, Caco-2, HT29, SW480 a SW620 (který je metastatickým derivátem SW480), přičemž první tři zmíněné byly o poznání senzitivnější než SW480 a SW620; Caco-2 byly nejzranitelnější (IC₅₀ se lišila podle použité metody: u end-point test NRU byla mezi 30-49 µg/ml, zatímco u xCelligence pak 1,5-5,9 µl/ml). Výhodou při použití SMR pro léčbu nádorů v gastrointestinálním traktu by mohla být jeho vysoká lipofilita. V porovnání s jinými silicemi s podobným složením, SMR prokázala dobrou účinnost v inhibici buněčné proliferace *in vitro*. SMR byla testována na myších hepatocytech s nezměněnou viabilitou buněk, čímž se zdá být netoxickou vůči normální nerakovinným buňkám (Langhasova et al. 2014). Jednou z možností protirakovinného účinku SMR jsou její prooxidační vlastnosti (Ambrož et al. 2016).

SMR byla také schopna snížit adhezi střevních nádorových buněk HT29 ke kolagenu. Kromě toho SMR, α -HUM a t-NER signifikantně potlačili adhezi HT29 (která je klíčovým počátečním bodem metastazování) v přítomnosti TNF α (tumor nekrotizujícího faktoru) pravděpodobně díky down-regulaci ICAM-1 (intercelulární adhesivní molekuly-1). Navíc by SMR a α -HUM mohly snížit nádorovou invazivitu a metastazování přes up-regulaci E-cadherinu (jenž způsobuje supresi buněčného kontaktu). SMR a t-NER indukovaly apoptózu nádorových buněk (snížením fosforylace nukleárního faktoru NF- κ B, který funguje jako regulátor genů kontrolujících buněčnou proliferaci a přežívání, a aktivací kaspáz). Účinek byl citelnější u SMR než u zvláště užitých α -HUM a t-NER, což indikuje synergismus či příspěvek dalších komponent (Hanušová et al. 2015).

Silice z blízkého druhu *Myrica gale* také prokázala protirakovinný účinek, a to proti lidskému karcinomu plic A-549 a adenocarcinomu tlustého střeva DLD-1, přičemž autoři předpokládali, že za účinkem stojí především seskviterpeny (Sylvestre et al. 2005).

2.2.3 Seskviterpeny

Seskviterpeny patří mezi terpeny, které jsou biosynteticky derivované z izoprenových pětiuhlíkatých jednotek. Základní vzorec terpenů je $(C_5H_8)_n$, kde n je číslo spojených izoprenových jednotek. Hlavními terpeny jsou mono- (C_{10}) a právě seskviterpeny (C_{15}), ovšem existují i hemi- (C_5), di- (C_{20}), tri- (C_{30}) a tetraterpeny (C_{40}); terpen obsahující kyslík (hydroxylové, karbonylové, ketonové či aldehydické skupiny) se nazývá terpenoid. Všeobecným zdrojem terpenoidních C_5 prekurzorů je isopentenylpyrofosfát (IPP) a dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) vznikající přes mevalonovou cestu (kdy tři molekuly acetyl-CoA jsou kondenzovány s 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA s následnou redukcí na mevalonát, který je pak konvertován na IPP a DMAPP). Ačkoliv nutno poznamenat, že byla objevena i na mevalonátu nezávislá Rohmerova dráha (Paduch et al. 2007).

Terpeny se nacházejí především ve vyšších rostlinách, ale i v houbách a bezobratlých živočiších. Mezi rostlinnými sekundárními metabolity představují nejrozmanitější skupinu látek s desítkami tisíc známých struktur. Jejich koncentrace v rostlinách je obecně vysoká v reprodukčních orgánech (květy, plody) a v listech během kvetení a těsně po něm. Jsou také hlavní složkou pryskyřic. Slouží jako feromony, juvenilní hormony nebo fytoalexiny v přímé rostlinné obraně nebo jako

signální molekuly v nepřímé obranné odpovědi. Jsou zodpovědně za typickou vůni mnoha květin a na hmyz tak působí buď jako atraktanty, nebo jako repelenty.

Seskviterpeny jsou společně s monoterpeny, diterpeny a fenylypropy nejčastějšími složkami rostlinných silic. Biosyntetické dráhy seskviterpenů se nacházejí v cytosolu, jejich přímým prekursorem je patnácti-uhlíkatý farnesyldifosfát. Za cyklizaci řetězce v mnohé strukturní typy jsou pravděpodobně odpovědné specifické cyklasy. Seskviterpeny se vyskytují v těchto základních typech: acyklické (např. cis/trans-nerolidol, farnesen), monocyklické (např. α -HUM, bisabolen, zingiberen, kurkumen), bicyklické (např. guaiazulen, α -kadinen) a tricyklické (kopaen, α -santalol). Existují také mnohé seskviterpenické laktony (bilobalid). Všechny seskviterpeny podstupují extensivní biotransformaci v organismu, v první fázi dominují oxidační reakce – především hydroxylace a epoxidace (Bakkali et al. 2008, Bartíková et al. 2014, Paduch et al. 2007 a Spilková et al. 2016).

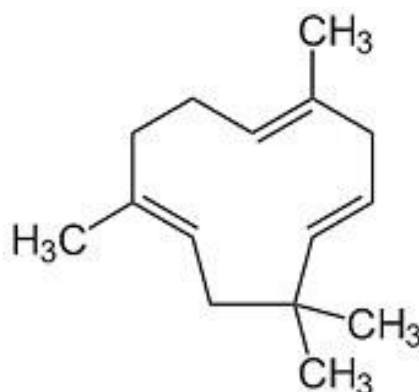
Většina účinků seskviterpenů (ať už pozitivních či nežádoucích) je založena na jejich antioxidačních a zároveň prooxidačních účincích a není jednoduché jednoznačně předpovědět jejich celkový dopad. Seskviterpeny mohou účinkovat jako antioxidanty, nebo mohou podporovat oxidativní stres, anebo mohou mít za určitých fyziologických či patofyziologických podmínek obojí roli (Bartíková et al. 2014).

Seskviterpeny β -karyofylen, β -karyofylenoxid, α -HUM, t-NER a valencen prokázaly signifikantní antiproliferativní účinky u několika střevních nádorových buněčných linií, z nichž Caco-2 byla nejcitlivější. Všechny tyto seskviterpeny kromě β -karyofylenu inhibovaly proliferaci rakovinných buněk v závislosti na jejich koncentraci, přičemž současně nedocházelo ke snížení životaschopnosti normálních hepatocytů (Ambrož et al. 2015). Klímová (2015) pak ve své diplomové práci zabývající se střevními nádorovými buňkami dospěla k tomu, že z výše zmíněných seskviterpenů α -HUM a t-NER zvyšovaly nejvíce tvorbu reaktivních forem kyslíku. Proto byly ke zkoumání vlivu na antioxidační enzymy námi zvoleny právě tyto dva seskviterpeny.

2.2.3.1 Alfa-humulen (α -HUM)

α -HUM, synonymem α -karyofylen, je 2,6,6,9-tetramethylcykloundeka-1,4-8-trien se sumárním vzorcem $C_{15}H_{24}$. Co se týče farmakokinetiky, maximální koncentrace v myší krvi byla dosažena po 15 min po podání *per os*, pak postupně klesala a po 12 h

byla téměř nedetekovatelná. Biodostupnost byla pouze 18%. α -HUM má také antioxidační účinky na normální buňky a jeho opakované *p.o.* podání vedlo k signifikantní indukci aktivity glutathion-S-transferasy v játrech a tenkém střevě myších samic. Naopak u nádorových buněk α -HUM indukoval snížení GSH v buňkách, což vedlo k akumulaci ROS a následné cytotoxicitě. α -HUM získaný z olejového balzámu jedle vykázal jako jediný obsažený seskviterpen antitumorózní aktivitu na buňky MCF-7, PC-3, A-549, DLD-1, M4BEU (melanomové nádorové buňky) a CT-26 (myší karcinom tračníku) i samostatně (Bartíková et al. 2014, Legault et al. 2003). Legault et Pichette (2007) potencovali účinek α -HUM na MCF-7 buňky β -karyofylenem. Loizzo et al. (2007) prokázali cytotoxickou aktivitu α -HUM také na LNCaP buňky (hormon-dependentní lidský karcinom prostaty), avšak uvádí, že tento seskviterpen nebyl aktivní vůči MCF-7. Prokázána byla také cytotoxicita α -HUM na lidské jaterní adenokarcinomové buňky ACHN a lidské amelanotické melanomové buňky C32 (Sperotto et al. 2013).



Obrázek 4 – struktura alfa-humulenu (zdroj: commons.wikimedia.org)

α -HUM prokázal antiproliferativní účinky na Caco-2, avšak pouze v nejvyšší testované koncentraci (1mM). Dále se ukázal být cytotoxickým vůči buňkám A-549, HeLa a HT29, zatímco u nenádorových buněk z opičích ledvin (Vero) a u makrofágů bylo třeba 4-5x vyšší koncentrace (Vinholes et al. 2014). Prokázal také antiproliferační účinek vůči buňkám lidského ovariálního karcinomu A2780 a SKOV3 (Žáková 2016). Jeho izomer γ -humulen významně snížil životaschopnost HT29 indukcí apoptózy přes death receptor 5 (DR5) (Lan et al. 2011).

α -HUM se vyskytuje v různých silicích. Třeba ta z *Casearia arborea* obsahující seskviterpeny bicyklogermakren (18.7%), germakren D (12.1%) a α -HUM (11.5%) ukázala silnou cytotoxickou aktivitu proti A549 (Pereira et al. 2017). Silice z listů

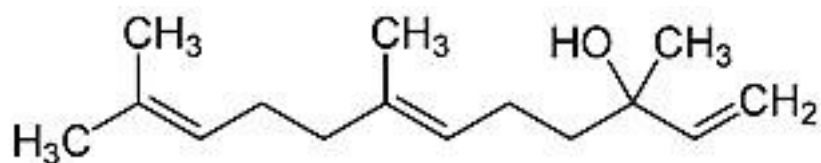
Phoebe formosana obsahující jako hlavní látky α -HUM (16,8%), tau-kadinol (8,9%), α -pinen (8,4%), α -kadinol (8,1%), β -karyofylen (8,0%), β -felandren (6,0%), a β -eudesmol (5,8%) prokázala cytotoxickou aktivitu proti rakovinným buňkám lidských plic, jater a ústní dutiny (Su et al. 2016). Silice z kůry a listů *Pinus eldarica* obsahující η -karyofylen (14,8%), germakren D (12,9%), α -terpinenyl acetát (8,15%), α -pinen (5,7%), a α -HUM (5,9%) snižovala životnost HeLa a MCF-7 buněk (Sarvmeili et al. 2016). Silice z *Machilus thunbergi* o složení n-dekanal (26,6%), β -karyofylen (15,8%), α -HUM (10,8%) a β -eudesmol (10,5%) vykazovala cytotoxickou aktivitu vůči lidským orálním, jaterním, střevním, melanomovým a leukemickým rakovinným buňkám. Prokázala mimo jiné také dobrou protiplísňovou aktivitu (Su et al. 2015). Silice *Salvia officinalis* vykazující cytotoxickou aktivitu vůči myším leukemickým buňkám RAW264.7 a buňkám lidského střevního karcinomu HCT-116 obsahuje jako hlavní složku také α -HUM (El Hadri et al. 2010). Silice *Mesua ferrea* s hlavními složkami β -karyofylenem (30,9%), β -karyofylenoxidem (17,9%) a α -HUM (6,0%) působila proti rakovinným KB buňkám dutiny ústní, MCF-7 buňkám a buňkám lidského plicního karcinomu NCI-H187 (Keawsa-ard et al. 2012). Mimo jiné silice z *Piper guadichaudianum* obsahující hlavně t-NER (22,4%), α -HUM (16,5%), trans-karyofylen (8,9%) a bicyklogermakren (7,4%) působila cytotoxicky na buňky křeččího plicního fibroblastu V79, a to zřejmě především díky generaci ROS (Péres et al. 2009).

α -HUM prokázal i jiné významné účinky, např. protizánětlivé. Na potkanech signifikantně inhiboval tvorbu mediátorů zánětu TNF α , interleukinu IL-1 β a prostagladinu PGE $_2$, a to přes inhibici NF- κ B (Bartíková et al. 2014). Na modelu tekutiny z bronchoalveolární laváže snížil migraci eozinofilů a tvorbu některých zánětlivých cytokinů. Prokázal zřetelné protizánětlivé účinky na myším modelu alergického zánětu dýchacích cest, což ukazuje na jeho potenciální užití k léčbě astmatu a spojených zánětlivých a alergických onemocnění (Rogerio et al. 2009). Silice z oddenku *Zingiber cernuum* obsahující jako hlavní sloučeniny trans-karyofylen, α -HUM a δ -3-karen vykazovala antibakteriální aktivitu jak proti grampozitivním, tak i proti gramnegativním bakteriím (Thambi et al. 2016). Silice *Syzygium zeylanicum* s hlavními komponentami α -HUM (37,5%) a β -elemenem (10,7%) prokázala larvicidní aktivitu vůči komárům *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* a *Culex tritaeniorhynchus* (Govindarajan et al. 2016). Mimo jiné α -HUM (podíl podle

variety kolísá mezi 5-45%) společně s monoterpenem myrcenem a β -karyofylenem jsou charakteristickou součástí chmelové silice, kde oxygenované seskviterpeny jsou nositeli chmelového aromatu (Steenacker et al. 2015).

2.2.3.2 *Trans-nerolidol (t-NER)*

Systematický název nerolidolu je 3,7,11-trimethyldodeka-1,6,10-trien-3-ol, bývá nazýván také melaleukol, methylvinyl homogerynyl karbinol či peruviol, se sumárním vzorcem $C_{15}H_{26}O$. Vyskytuje se ve čtyřech rozdílných izomerických formách, které zahrnují dva enantiomery a dva geometrické izomery. Za pokojové teploty jde o čirou světle žlutou až žlutou tekutinu vonící po růžích a jablku, vroucí při $276^{\circ}C$. Používá se jako voňavá ingredience především v kosmetických přípravcích, ale i v čistících prostředcích či detergentech. Na celém světě se ho spotřebuje 10-100 tun za rok. Vyskytuje se také v různých čajích, především tvoří hlavní složku oolong čaje, v němž je užíván jako indikátor vysoké kvality oolongové chuti. t-NER může být také chemicky syntetizován nebo biosyntetizován např. kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Vzhledem k jeho hydrofobicitě snadno prochází plazmatickou membránou a může interagovat s intracelulárními proteiny či uvnitř organel (Ferreira et al. 2012, Chan et al. 2016, Lapczynski et al. 2008, Sheibani et al. 2016).



Obrázek 5 – struktura *trans-nerolidolu* (zdroj: commons.wikimedia.org)

Mezi farmakologické a biologické účinky patří antioxidační, antimikrobiální, antiparasitické, insekticidní, antiulcerózní, protirakovinové, protizánětlivé, dále urychluje penetraci některých látek přes kůži a potlačuje nocicepci. t-NER inhiboval růst HeLa buněk, indukoval cytotoxický efekt u buněk myšího kožního melanomu B16-F10, a buněk HepG2, lidských promyelocytárních leukemických buněk HL-60 a lidských myeloidních leukemických buněk K562. Zároveň nebyl ve stejné studii vykázán žádný cytotoxický efekt na nenádorové krevní buňky. Nerolidol (izomerově nespec.) vykazoval silné cytotoxické účinky vůči lidskému karcinomu prsu BT-20. Také na HeLa buňkách byla demonstrována antitumorózní aktivita nerolidolu (směs *trans*- a *cis*-nerolidolu a jejich dihydroforem). U potkanů krmených t-NER došlo ke snížení incidence intestinálních neoplazií vyvolaných azoxymetanem (z 82% na 33%)

a ke snížení počtu nádorů na jednoho potkana (z 1,5 na 0,7). t-NER také indukoval apoptózu buněk HT29. t-NER extrahovaný ze silice *Comptonia peregrina* vykazoval silný cytotoxický efekt vůči buňkám A-549 a DLD-1 (Chan et al. 2016). t-NER, stejně jako α -HUM, působí cytotoxicky na nádorové buňky ACHN, LNCaP, C32, MCF-7 (Sperotto et al. 2013), A2780 (Zajdlová 2016) a Caco-2 (Ambrož et al. 2015). Izomer cis-nerolidol také vykázal antiproliferativní účinky na Caco-2 (Vinholes et al. 2014). Syntetický t-NER snižoval počet Jurkat buněk používaných ke studiu akutní T-buněčné leukemie v dávkách desetkrát nižších než byla cytotoxická dávka vůči normálním buňkám (Ryabchenko et al. 2008).

Díky své schopnosti pohlcovat některé typy volných radikálů jeho cis-isomer chránil diferencované Caco-2 před oxidativním stresem vyvolaným terc-butylhydroperoxidem. Byly také demonstrovány neuroprotektivní účinky izomerické směsi nerolidolu na dospělé myši vůči poškození nervů vyvolanému oxidativním stresem (Chan et al. 2016, Vinholes et al. 2014). Jak bylo popsáno výše, účinky seskviterpenů mohou být také prooxidační. Zmíněná silice z *Piper guadichaidianum* obsahující hlavně t-NER (22,4%) a α -HUM (16,5%) působila cytotoxicky na křeččí nenádorové buňky V79 generací ROS. U buněk se objevovala lipidová peroxidace a také zlomy DNA. t-NER prokázal prooxidační účinky také na vaječných žlutkových homogenátech (Péres et al. 2009). Tato silice i t-NER také vykazovaly významné cytotoxické účinky na *Saccharomyces cerevisiae*, které byly spojené s produkcí ROS a vznikem jednořetězcových zlomů DNA, nepůsobily však mutageně (Sperotto et al. 2013). Na mitochondriálních frakcích hepatocytů t-NER indukoval snížení ATPasové aktivity (snížení ATP a zvýšení ADP, v závislosti na koncentraci t-NER). Mohl by tedy negativně interferovat s hepatální mitochondriální funkcí (Ferreira et al. 2012).

V jiné studii bylo zjištěno, že t-NER fungoval jako zesilovač prostupu přes kůži hydrofilní látky 5-fluorouracilu. Spolu s dalšími seskviterpeny (farnesol, bisabolol a apriton) zvýšily buněčnou permeabilitu a citlivost k antibiotikům (Paduch et al. 2007). Silice z *Momordica charantia*, jejíž hlavní obsahovou látkou je t-NER, vykázala antifungální a antibakteriální aktivitu, přičemž nejcitlivější byl zlatý stafylokok s MIC <500 μ g/ml (Braca et al. 2008).

2.3 Antioxidační enzymy

Vzhledem ke zjištění, že SMR i jednotlivé seskviterpeny t-NER a α -HUM zvýšily tvorbu ROS u nádorových buněk (Klímová 2015), zajímalo nás, zda se u nádorových buněk změní i aktivita antioxidačních enzymů, které jsou za detoxikaci ROS zodpovědné.

Všichni živočichové potřebují pro efektivní produkci energie v mitochondriích kyslík. Faktem ovšem je, že kyslík je toxickým mutagenním plynem a aerobní organismy mohou přežít jen díky vyvinutým antioxidačním obranným systémům. ROS či reaktivní formy dusíku (dohromady zkracováno jako RONS) totiž vznikají především jako důsledek normálního aerobního metabolismu v mitochondriálním elektron-transportním řetězci, dále u fagocytů při oxidativním vzplanutí, při buněčné signalizaci či při metabolismu xenobiotik. Mezi ROS patří hydroxylový radikál, superoxidový aniont, peroxid vodíku, singletový kyslík, radikál oxidu dusnatého, chlornanový radikál a různé lipidové peroxidy. Všechny mohou reagovat s membránovými lipidy, nukleovými kyselinami, proteiny, enzymy a dalšími malými molekulami, což vede k poškození buňky a v konečném důsledku k buněčné smrti (Bartíková et al. 2014, El-Missiry 2012, Halliwell 2006).

Antioxidanty mohou být endogenního původu, např. antioxidační enzymy, bilirubin, NADPH a NADH či thioly, z nichž nejvýznamnějším je glutathion (GSH). GSH je tripeptid, jenž je v organismu syntetizován z aminokyselin glutamátu, cysteinu a glycinu ve dvou po sobě následujících krocích. Pro většinu organismů je GSH systém ve středu jejich buněčné redoxní kontroly, kde je GSH udržován vícero mechanismy: *de novo* syntézou, importem a redukcí oxidovaného glutathionu (GSSG) či exportem a sekvestrací GSSG. Antioxidanty mohou být ale také přijímány potravou (vitaminy C a E, flavonoidy,...). K antioxidantům patří též chelátory volných iontů kovů, jako např. ferritin, transferin či ceruloplazmin; ty chelatací kovových iontů brání jejich oxidaci, která může jinak dát vzniknout volným radikálům (např. Fentova reakce) (Skálová a Boušová 2011, Couto et al. 2016, El-Missiry 2012).

Jednou ze součástí ochranného systému před ROS, kterou buňky disponují, jsou již zmíněné antioxidační enzymy, jež katalyzují odstranění volných radikálů a reaktivních částic přímo či přes GSH. Nejdůležitější jsou popsány dále.

2.3.1 Glutathionperoxidasa (GPx)

GPx je široká rodina osmi strukturálně podobných izoenzymů. GPx1-4 a 6 jsou selenoenzymy, jejichž selenocystein se přímo účastní transferu elektronů na peroxidový substrát. GPx5, GPx7 a 8 selenocystein neobsahují, ale inkorporují místo něj do svých proteinů v pozdější fázi cysteinové zbytky; tyto pak prokázaly relativně nízkou peroxidační aktivitu. GPx7 a 8 postrádají navíc GSH vázající doménu. Selenocysteinové GPx se skládají ze čtyř identických podjednotek, z nichž každá obsahuje selenocystein, a mají kolem 80 kDa. GPx sdílí s katalasou substrát H₂O₂ (jenž redukuje na vodu a kyslík), ovšem jako jediná účinně reaguje s lipidovými a dalšími organickými hydroperoxidy za využití GSH, který se oxiduje na GSSG:



GPx1 je nejhojnější a je exprimována téměř ve všech tkáních. Vyskytuje se v především v cytosolu, dále v mitochondriích, chloroplastech a endoplazmatickém retikulu. Až na hepatocyty a erytrocyty je GPx exprimována v buňkách ve větší míře než katalasa. Množství GPx v těle je těsně spojeno s množstvím GSH a také hladina selenu reguluje transkripci a translaci GPx. Aktivita GPx je pak ovlivněna přítomností a funkcí glutathionreduktasy (El-Missiry 2012).

GPx4, z níž se vyvíjí GPx7 (jejíž expresi jsme sledovali), byla nalezena ve zvýšeném množství v lidských karcinomech tlustého střeva. Bylo zjištěno, že dysfunkce GPx7 v jícnových buňkách vede ke zvýšenému množství ROS a oxidativnímu poškození DNA, což jsou společné rizikové faktory Barrettova jícnu a jícnového adenokarcinomu (Guerriero et al. 2015). Chen et al. (2016) uvádějí, že GPx7 postrádá aktivitu jiných GPx a že funguje v buňce jako stresový senzor, který detekuje redoxní hladinu a přenáší ROS signály na redoxně sensitivní thiol-obsahující proteiny. Usnadňuje tedy stresovou signální transdukcí. U fenotypů s nedostatkem GPx7 se vyskytuje zvýšená incidence rakovin, autoimunitních onemocnění a obezity.

2.3.2 Glutathionreduktasa (GR)

GR je flavoproteinový enzym, jenž recykluje GSSG zpět na jeho redukovanou formu, sám podstupuje reversibilní oxidaci.



V rámci živých organismů je struktura GR velmi podobná. Obsahuje dvě domény, z nichž jedna váže FAD a redukovaný NADPH a druhá je mezifázová

dimerizační doména obsahující dva cysteiny, které tvoří disulfidické vazby se substrátem. Jak se dá předpokládat, GR se hromadí v buňce na místech, kde je vysoký eflux elektronů a kde se tedy tvoří reaktivní sloučeniny. Vyskytuje se v cytoplazmě, v jádře, mitochondriích či endoplazmatickém retikulu, a to ve dvou izoformách kódovaných stejným genem. Nedostatek redukováného GSH bývá nalézán u pacientů s diabetem mellitem, cystickou fibrózou či neurodegenerativními onemocněními. U pacientů s nedostatkem GR dochází také k brzkému výskytu šedého zákalu. V nádorových buňkách nacházíme naopak vyšší množství GSH způsobené vyšší aktivitou GR (Couto et al. 2016, Meister 1988).

2.3.3 Glutathion-S-transferasa (GST)

Tento enzym se nachází především v cytoplazmě buněk (dále pak v jádře, mitochondriích a endoplazmatickém retikulu – mikrosomální GST) a je známo několik jeho funkcí. GST katalyzuje redukci peroxidických sloučenin, přičemž tato peroxidasa aktivita je nezávislá na selenu a vyžaduje GSH. Jedná se o dvoukrokovou reakci, kdy v tom prvním dochází k enzymatické redukci peroxidu na alkohol, která je doprovázena vznikem hydroxylovaného glutathionu (GSOH). Ve druhém kroku pak spontánně reaguje GSOH s molekulou GSH za uvolnění vody a GSSG. Příkladem substrátů vstupujících do této reakce jsou hydroperoxydy mastných kyselin a fosfolipidů. Související reakcí je GSH-závislá redukce organických esterů dusičnanů na alkoholy a anorganické dusitany.

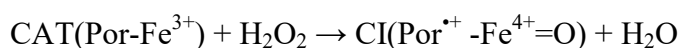
Dále se GST podílí na detoxikaci mnohých elektrofilních xenobiotických substrátů (karcinogenů, polutantů životního prostředí, protirakovinných chemoterapeutik) a stejně tak potenciálně škodlivých endogenních reaktivních sloučenin (vznikajících jako následek modifikace buněčných makromolekul působením ROS), především jejich konjugací s GSH. Tato reakce následuje zpravidla po první fázi metabolismu, která je často katalyzována cytochromem P450 (CYP); ovšem ne všechna xenobiotika, která jsou substráty GST, vyžadují předchozí aktivaci CYP. Produktem reakce jsou GSH konjugáty, které jsou typicky konvertovány na merkapturové kyseliny (odštěpením glutamylového a glycylového zbytku a následnou acetylací). Všechny cytosolické GST se vyskytují ve formě homodimerů nebo heterodimerů (48-56 kDa). Každý dimer má dvě aktivní centra, která mohou fungovat na sobě nezávisle a která obsahují minimálně dvě vazebná místa – jedno GSH specifické a druhé méně specifické vážící elektrofilní substrát. Dělí se na osm tříd (třída π je nejvíce rozšířenou)

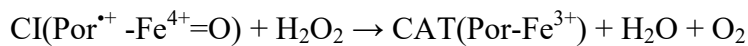
a jednotlivé izoformy se liší orgánovou distribucí. V lidském těle se vyskytuje především v jaterních buňkách, kde tvoří okolo 5% celkového cytosolického proteinu. Substrátová specifita jednotlivých GST se příliš neliší a určité xenobiotikum tak může být konjugováno působením mnoha izoform. Byly popsány ATP-dependentní efluxní pumpy, které následně přenášejí GSH konjugáty z buněk. Proliferující nádorové buňky se na rozdíl od plně diferencovaných buněk vyznačují zvýšenou expresí GSTp (třída π), která se pak mimo jiné podílí na detoxikaci alkylujících cytostatik a její selektivní inhibice by tak mohla zvýšit účinnost těchto látek. U člověka existuje značná polymorfie a nejběžnější je delece genu pro GSTM1, která detoxikuje polyaromatické uhlovodíky, a byla popsána u téměř 50% bělošské a 90% polynéské populace, což s sebou nese zvýšené riziko rozvoje rakoviny plic a větší náchylnost k poškození DNA.

GST hraje také významnou roli v izomerizaci mnohých důležitých molekul. Může katalyzovat cis-trans izomerizaci nebo posun dvojných vazeb v polycyklických molekulách (např. konverze 13-cis-retinové kyseliny na all-trans-retinovou). Mikrosomální GST nejsou v první řadě zapojeny do detoxikačních reakcí, ale podílejí se spíše na biosyntéze endogenních signálních molekul leukotrienů a prostanooidů. GST může fungovat i jako intracelulární transportér hydrofobních sloučenin (např. bilirubinu, hemu či steroidů), což ale často inhibuje její katalytickou aktivitu (Ioannides 2001, Skálová a Boušová 2011, Wilce a Parker 1994).

2.3.4 Katalasa (CAT)

Jelikož mezi katalasami existuje jistá rozmanitost, můžeme je rozdělit do čtyř skupin na monofunkční CAT, bifunkční katalasu-peroxidasu, nehemové CAT a minoritní CAT. Nejrozšířenější typická monofunkční katalasa je tetramerní hem-obsahující enzym zodpovědný za degradaci peroxidu vodíku (na kyslík a vodu). Skládá se ze čtyř identických podjednotek, každá o 60 kDa obsahující jeden Fe-protoporfyrin těsně vázající NADPH, který chrání CAT před jejím uvedením do inaktivního stavu peroxidem. Reakce probíhá ve dvou krocích. Jedna molekula H_2O_2 oxiduje hem na oxyferrylové sloučeniny (CI), přičemž dochází k tvorbě porfyrinového kationtového radikálu (jeden elektron je odňat z trojmocného železa a druhý z porfyrinového kruhu). Druhá molekula H_2O_2 působí jako redukční činidlo pro regeneraci enzymu zpět do klidového stavu za uvolnění molekuly kyslíku a vody. Souhrnná rovnice reakce je následující: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, podrobněji ve dvou krocích níže:





CAT nehraje nejdůležitější roli v odstraňování kyslíkových radikálů v kontextu toho, že v mitochondriích a chloroplastech, kde vzniká velké množství O_2^- (jež je pomocí superoxiddismutasy přeměno na H_2O_2), se CAT nachází málo nebo vůbec. Většina či všechna CAT se u rostlin a živočichů nachází v peroxisomech, kde zneškodňuje peroxid vodíku produkovaný oxidačními enzymy při β -oxidaci mastných kyselin, fotorespiraci, purinovém katabolismu a peroxid vznikající při stresových podmínkách. Má největší obrat ze všech enzymů, neboť jedna molekula CAT může přeměnit přibližně 6 milionů molekul H_2O_2 za minutu. Všechny ionty těžkých kovů působí jako nekompetitivní inhibitory. CAT je efektivní při degradaci peroxidu v koncentraci mmol.l^{-1} , zatímco GPx účinně peroxid degraduje v koncentracích nižších než $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$. CAT lidských erytrocytů, jež jsou vystavené podstatné koncentraci kyslíku, chrání hemoglobin odstraněním víc jak poloviny vznikajícího H_2O_2 . Jediným fyziologickým projevem akatalasie (absence CAT u lidí) je v 50% případů progresivní ústní gangréna jako důsledek infekce bakterií produkujících H_2O_2 , např. hemolytickým streptokokem. Její aktivita je obecně nižší v nádorových buňkách než ve zdravé tkáni (Halliwell 2006, El-Missiry 2012, Aksoy et al. 2004, Chelikani et al. 2005).

2.3.5 NAD(P)H Chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1)

Katalytické vlastnosti NQO1 byly zjištěny v roce 1958. Tento flavoenzym je obligátní dvou-elektronová reduktasa charakterizovaná schopností používat jako redukční kofaktor NADH i NADPH. Kofaktor a substrát sdílejí stejné vazebné místo a katalýza probíhá ping-pongovým mechanismem. NQO1 může chránit buňky před endo- i exogenními chinony, které redukuje na méně toxické hydrochinony v jediném dvou-elektronovém kroku obcházejíc potenciálně toxické semichinonové radikálové meziprodukty. Ty pak mohou být snadno konjugovány a exkretovány. Ovšem labilní redukované hydrochinony mohou reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku semichinonů a produkce reaktivních forem kyslíku. Navíc redukce chinonové skupiny může vést ke vzniku hydrochinonových sloučenin, které jsou schopné alkylovat nukleofilní místa včetně DNA (tento proces byl nazván bioreduktivní alkylace). NQO1 tedy působí buď jako detoxikační enzym, nebo jako aktivační enzym podle stability redukci vznikajícího hydrochinonu. Příkladem aktivace může být 4-nitrochinolin-1-oxid nacházející se ve vařeném jídle; bioaktivace pomocí NQO1 je však také využíváno klinicky u léčby některých nádorů např. pomocí mitomycinu C.

Z 90% se vyskytuje v cytosolu mnoha lidských tkání zahrnujících epiteliální buňky plic, prsu, tračnicku, vaskulární endotel, adipocyty, corneum, čočku, retinální pigment, optický nerv, další nervová vlákna a také většinu solidních tumorů. V játrech však nehraje žádnou větší roli, co se týče metabolismu xenobiotik. Existuje jako homodimer s jednou molekulou FAD na monomer. NQO1 je schopná redukovat široké spektrum sloučenin zahrnující ortho i para chinony, chinoniminy, glutathionyl-substituované naftochinony, dichlorofenolindolfenoly, methylenovou modř, azo- a nitrosloučeniny (u nichž je schopná čtyř-elektronové redukce). Metabolismus není limitován pouze chinony, ale enzym funguje účinně také jako nitro-reduktasa užívající substráty jako dinitropyreny, nitrofenylaziridiny a nitrobenzamidy (Ross et al. 2000, Siegel et al. 2012).

2.3.6 Superoxiddismutasa (SOD)

Objev enzymu SOD v roce 1967 byl průlomovým a způsobil, že se lékařští vědci začali vážněji zabývat problematikou volných radikálů. Význam tohoto enzymu byl objasněn při zkoumání různých aerobních buněčných či živočišných mutantů s fenotypickým deficitem jeho tvorby. U lidí existují tři formy SOD: cytosolická Cu/Zn-SOD, mitochondriální Mn-SOD a extracelulární SOD. Například defekt genu kódujícího Cu/Zn-SOD bývá spojován s amyotrofickou laterální sklerózou.

SOD patří mezi oxido-reduktasy a katalyzuje dismutaci vysoce reaktivního superoxidového aniontu na kyslík a méně reaktivní peroxid vodíku:



SOD zneškodňuje $\text{O}_2^{\bullet-}$ postupnou oxidací a redukcí iontů přechodného kovu ve svém aktivním místě asi desetisíckrát rychleji než probíhá spontánní dismutace. Cytosolická Cu/Zn-SOD, jejíž aktivita byla zkoumána, má dvě identické podjednotky okolo 32 kDa, z nichž každá obsahuje aktivní místo skládající se z atomů zinku a mědi přemostěných histaminovým zbytkem. Cu/Zn-SOD na rozdíl od Mn-SOD není pro život naprosto nezbytnou; Mn-SOD knock-outované myši umírají jen několik dní po narození, především z důvodu dilatované kardiomyopatie. Vzhledem k tomu, že SOD generuje peroxid vodíku, je nutná spolupráce s dalšími enzymy (CAT či GPx), které vzniklý H_2O_2 následně rozkládají. SOD, CAT a GPx tak tvoří vzájemně se doplňující obranný systém (Fridovich 1997, El-Missiry 2012).

3 Cíl

Cílem mé diplomové práce bylo:

- Stanovit aktivity antioxidantních enzymů proliferujících Caco-2 buněk v kontrolní skupině a ovlivnění těchto aktivit u buněk inkubovaných 24 h se silicemi z listů *Myrica rubra* (SMR) a z něj pocházejících seskviterpenů α -humulenu (α -HUM) a trans-nerolidolu (t-NER) ve dvou koncentracích (25 a 50 $\mu\text{g/ml}$).
- Zjistit ovlivnění genové exprese antioxidantních enzymů buněk Caco-2 kultivovaných 24 h s SMR, α -HUM a t-NER oproti kontrolní skupině.
- Detekovat množství proteinu vybraných antioxidantních enzymů v buňkách Caco-2 ovlivněných SMR, α -HUM a t-NER a v kontrolní skupině po dobu 24 h.

4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Bovinní sérový albumin – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Bicinchoninová kyselina – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Deoxyribonukleasa I – New England Biolabs (Hitchin, UK)

Deoxyribonukleosidtrifosfáty – Eurogentec (Seraing, Belgie)

Detekční substrát Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent – GE Health Care (Buckinghamshire, UK)

Diethylpyrokarbonát (DEPC) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

DNA polymerasa (Hotgoldstar enzym) – Eurogentec (Seraing, Belgie)

F, R primery – Generi biotech (Hradec Králové, ČR)

Glutathion – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Inhibitory proteáz – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

NADPH – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Oligo(dT)₁₈ – (Hradec Králové, ČR)

Primární protilátky: β -aktin a katalasa – Abcam (Cambridge, UK);

glutathionperoxidasa 7 a glutathionreduktasa – Novus Biologicals (Cambridge, UK)

Proteinový standard pro elektroforézu - BioRad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

qPCR kit (FastStart SYBR Green Master) - Roche (Basel, Švýcarsko)

Reversní transkriptáza (RT) – Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Sekundární protilátky s navázanou křenovou peroxidasou – Santa Cruz (Dallas, TX, USA)

Seskviterpeny α -humulen a trans-nerolidol – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Silice z *Myrica rubra* (SMR) – China Jiliang University (prof. Ji-Dong Lou)

TRI Reagent – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Ostatní běžné chemikálie byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Praha, ČR) v analytické či HPLC čistotě.

4.1.2 Přístroje

Agilent 2100 Bioanalyzer

Analytické digitální váhy – Scaltec SBC 22

BioRad Trans Blot Turbo

C-DiGit™ Blot Scanner (Li-Cor)

Centrifuga, rotor #3335 – Heraeus biofuge stratos + centrifugační kyvety

Centrifuga Thermo Scientific WX ULTRA 80

Homogenizátor Potter - Elvehjem

Hlubokomrazicí box – Jouan – Thermo Scientific

Laboratorní magnetická míchačka – IKA - Minishaker + Magnetická míchadla

NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, Thermo Scientific

pH – metr Boeco Germany BT-675

Stolní centrifuga 5415 D

Tecan Infinite M200

Termocyklér, Life Technologies, Quant Studio 6 Flex

4.2 Metodika

4.2.1 Stanovení aktivit

4.2.1.1 Příprava subcelulárních frakcí

Buňky byly nasazeny na Petriho misky (Ø 15 cm), a to vždy tři misky pro jednu ze sedmi skupin (viz níže). Po dosažení víc než 50% konfluence byly buňky ovlivněny

- 0,1% DMSO (kontrola)

nebo silicí či seskviterpeny šesti způsoby:

- buňky ovlivněné silicemi z *Myrica rubra* o koncentraci 25 µg/ml (MR25)

- buňky ovlivněné silicemi z *Myrica rubra* o koncentraci 50 µg/ml (MR50)
- buňky ovlivněné α -humulenem o koncentraci 25 µg/ml (α -HUM25)
- buňky ovlivněné α -humulenem o koncentraci 50 µg/ml (α -HUM50)
- buňky ovlivněné trans-nerolidolem o koncentraci 25 µg/ml (t-NER25)
- buňky ovlivněné trans-nerolidolem o koncentraci 50 µg/ml (t-NER50)

Následně byly buňky inkubovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C (5% CO₂). Poté bylo odsáto veškeré médium, buňky byly opláchnuty ledovým fosfátovým pufrům (PBS), jež jsme posléze odsáli. Byl přidán 1 ml 0,1M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 a obsah ze tří Petriho misek ovlivněných stejnou látkou byl seškrabán škrabkou do 15 ml zkumavky. Seškrabané vzorky se zamrazily v hluboko mrazicím boxu na -80°C do přípravy subcelulárních frakcí. Celý postup byl opakován dvakrát a byl proveden na Lékařské fakultě UK v Hradci Králové.

Po rozmrazení a přelití do 15 ml kyvet byly vzorky zhomogenizovány sonikací ultrazvukovou jehlou (sonikace v pulzech) po dobu 25 s, což bylo zopakováno dvakrát. Kyvety byly vloženy do centrifugy Heraeus (stočeny na 20 000 g 65 min. při 4°C).

Supernatant obsahující cytosol byl přelit do centrifugačních kyvet a znovu stočen centrifugou na 105 000 g po dobu 60 min. při 4°C a poté rozpipetován do několika mikrozkuvek pro další využití. Pelety z tohoto točení obsahující mikrosomy nebyly využity.

4.2.1.2 Stanovení celkové bílkoviny

Aby bylo možné vztáhnout aktivity antioxidantních enzymů na množství proteinu, bylo nutné stanovit nejdříve množství celkové bílkoviny v jednotlivých vzorcích. Za tímto účelem byla stanovena bílkovina metodou s bicinchoninovou kyselinou (BCA), kterou načrtli Smith et al. v roce 1985. Principem stanovení je reakce proteinů s mědnatými ionty v alkalickém prostředí kolem pH 10, kde ionty Cu²⁺ přecházejí na ionty mědné Cu⁺ a vytvářejí stabilní modrofialový komplex s BCA. Intenzita zbarvení je pak přímo úměrná množství bílkoviny, kterou můžeme snadno zjistit pomocí absorbance komplexu změřené při 562 nm.

Nejprve bylo potřeba sestavit kalibrační křivku, k níž byly vztaženy jednotlivé vzorky. K tomu posloužil roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentracích 0 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml a 1000 µg/ml.

Poté byly vzorky z předchozí přípravy pětkrát zředěny destilovanou vodou. Byla provedena dvě ředění vždy po čtyřech vzorcích. 10 μ l vzorku bílkoviny bylo smícháno s 200 μ l pracovního roztoku vzniklého smísením roztoku A obsahujícím NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH a roztoku B se 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v poměru 50:1.

Nakonec byla přístrojem Tecan změřena absorbance při 562 nm proti destilované vodě. Od vzorků byl odečten průměr slepých vzorků, které místo bílkoviny obsahovaly 10 μ l destilované vody.

4.2.1.3 *Glutathionperoxidasa (GPx)*

Aktivita GPx byla stanovena metodou, jak ji navrhl Flohé a Günzler (1984). V průběhu reakce GSH s peroxidem katalyzované GPx je GSH oxidován na GSSG, jež je okamžitě a průběžně redukován nadbytkem GR, jež zajišťuje konstantní hladinu GSH. Při této redukci GSSG na GSH dochází zároveň k oxidaci NADPH, již můžeme sledovat fotometricky poklesem absorbance při 340 nm.

Do 96 jamkové GAMA destičky bylo vždy napipetováno 50 μ l cytosolové frakce či 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4), který posloužil jako slepý vzorek. K tomu byl multikanálovou pipetou přidán master-mix v množství 130 μ l. Ten promnožství odpovídajícímu použití pro jednu destičku obsahoval 10,8 ml 0,1 M K-fosfátového pufru (pH 7,0), 1,2 ml ethylendiamintetraoctové kyseliny (20 mM), 1,2 ml GR (10 U/ml pufru) a 2,4 ml GSH (3,07 mg/ml). Destička pak byla preinkubována po dobu 10 min při teplotě 37°C. Poté bylo do každé jamky přidáno 10 μ l NADPH, načež byla po dobu 5 min přístrojem Tecan sledována spotřeba NADPH nezávislá na hydroperoxidu, vyjádřená jako změna absorbance. Následně byla nastartována výše zmíněná reakce přidáním 10 μ l 70% t-butyl hydroperoxidu a přístrojem Tecan se sledoval po dobu 5 min pokles absorbance při 340 nm.

Pro výpočet aktivity bylo nutné využít hodnoty $\Delta A/\text{min}$ z oblasti lineárního poklesu. Pomocí molárního extinkčního koeficientu ϵ_{NADPH} ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla zjištěna koncentrace spotřebovaného NADPH/min. Aktivita GPx pak byla vyjádřena v jednotkách U, kdy 1 U katalyzuje oxidaci 1 μ molu GSH na GSSG za 1 min při pH 7,0. Nakonec jsme vyjádřili specifickou aktivitu vztaženou na mg proteinu ve vzorku.

4.2.1.4 *Glutathionreduktasa (GR)*

Zjištění aktivity GR bylo provedeno metodou, kterou představili Carlberg a Mannervik (1985). Principem metody je přeměna GSSG na redukováný GSH, jež je

doprovázena oxidací NADPH, což se projeví úbytkem absorbance při 340 nm, který byl měřen.

Do jamek GAMA destiček bylo napipetováno vždy 50 μ l frakce cytosolu či 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4; slepý vzorek). Následně bylo multikanálovou pipetou přidáno 150 μ l master-mixu, jenž se v množství pro jednu destičku skládal z 6 ml 0,1 M K-fosfátového pufru (pH 7,0), 4,8 ml ethylendiamintetraoctové kyseliny (5 mM), 6 ml GSSG (4 mM) a 1,2 ml NADPH (2,5 mM). Ihned byl měřen pokles absorbance pomocí přístroje Tecan při 340 nm po dobu 6 min.

Pro výpočet aktivity byly podobně jako u stanovení enzymu GPx využity hodnoty $\Delta A/\text{min}$ z oblasti lineárního poklesu. Pomocí molárního extinkčního koeficientu ϵ_{NADPH} ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) se zjistila koncentrace spotřebovaného NADPH/min. Aktivita GR byla pak vyjádřena v jednotkách U, kdy 1 U katalyzuje redukci 1 μ molu GSSG na GSH za 1 min při pH 7,0. Nakonec byla aktivita přepočítána na mg proteinu ve vzorku.

4.2.1.5 *Glutathion-S-transferasa (GST)*

Stanovení aktivity GST bylo provedeno, jak ji ve své práci představili Ye a Zhang (2001). Principem měření je tvorba konjugátu GSH s 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (CDNB), který pak má absorpční maximum při 340 nm. Do 96 jamkových destiček Greiner s plochým dnem byl každý vzorek rozpipetován po 6 μ l a 0,1 M Na-fosfátový pufr (pH 7,4) jako slepý vzorek.

Do všech jamek byl pak multikanálovou pipetou doplněn do 200 μ l master-mix připravený těsně před stanovením, jenž se pro jednu destičku skládal ze:

- 4 ml roztoku GSH (5,15 mM GSH v 0,1 M Na-fosfátovém pufru (pH 6,5)),
- 0,4 ml roztoku CDNB (51,5 mM CDNB v ethanolu 96%),
- 15,6 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 6,5).

Destička byla lehce protřepána a pomocí přístroje Tecan byla měřena šestkrát absorbance v minutových intervalech při výše zmíněné vlnové délce 340 nm. Množství konjugovaného substrátu bylo následně vypočítáno ze zjištěné absorbance po 1 min s použitím extinkčního koeficientu $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ při 340 nm. Jednotka enzymové aktivity (U) je definována jako množství enzymu katalyzujícího za 1 minutu přeměnu 1 μ mol substrátu (konjugátu S-2,4-dinitrofenyl-glutathionu). Následně byla vyjádřena specifická aktivita na mg proteinu ve vzorku.

4.2.1.6 Katalasa (CAT)

Stanovení aktivity CAT bylo provedeno podle návrhu Gótha (1991). Přidáním molybdenanu amonného ((NH₄)₆ Mo₇O₂₄ · 4 H₂O) dojde k zastavení enzymatické reakce rozkládající H₂O₂ na vodu a kyslík. Molybdenan amonný pak s H₂O₂ dává vzniknout žlutému komplexu, jenž lze měřit spektrofotometricky při 405 nm.

Pro zjištění aktivity CAT ve vzorcích bylo třeba připravit 3 slepé vzorky a postupovat podle následujícího schématu (vše kromě frakcí bylo přidáno multikanálovou pipetou):

Tabulka 2 – příprava vzorku a slepých vzorků pro stanovení aktivity CAT

Vzorek	Blank 1	Blank 2	Blank 3
100 µl H ₂ O ₂ (6,5 mM)	100 µl H ₂ O ₂ (6,5 mM)	100 µl H ₂ O ₂ (6,5 mM)	100 µl sodno- draselného fosfátového pufru (60 mM pH 7,4)
20 µl frakce	100 µl (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O (32,4 mM)	20 µl sodno- draselného fosfátového pufru (60 mM pH 7,4)	20 µl sodno- draselného fosfátového pufru (60 mM pH 7,4)
Inkubace 1 min při 37°C za třepání			
100 µl (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O (32,4 mM)	-	100 µl (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O (32,4 mM)	100 µl (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O (32,4 mM)
1 min nechat stát			
-	20 µl frakce	-	-
Ihned změřit absorbanci při 405 nm			

Aktivita katalasy v 1 ml biologického materiálu byla vypočítána podle vzorce:

$$\text{Aktivita CAT (U/ml)} = 32,5 \cdot \text{zředění (1)} \cdot \frac{A_{\text{blank 1}} - A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{blank 2}} - A_{\text{blank 3}}}$$

Platí, že jednotka U je definována jako µmol/min, kdy 1 U rozloží 1,0 µmol H₂O₂ za 1 minutu. Na základě množství celkové bílkoviny ve vzorku byla spočítána specifická aktivita.

4.2.1.7 *NAD(P)H Chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1)*

Metoda stanovení aktivity NQO1 je založena na práci Fitzsimmonse et al. (1996), jejímž principem je redukce cytochromu c v přítomnosti NADH a menadionu (akceptor elektronů). Nárůst redukovaného cytochromu c je spektrofotometricky zaznamenáván při 550 nm. Aktivita NQO1 koreluje s aktivitou inhibovanou dikumarolem (známým inhibítoem tohoto enzymu).

Měření bylo prováděno v GAMA destičkách, do nichž bylo napipetováno 10 μ l cytosolové frakce (slepý vzorek obsahoval místo frakce 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4). Byl připraven master-mix s inhibítoem (dikumarolem) a bez inhibítoem (pouze s DMSO). Množství jednotlivých složek master-mixu pro jednu destičku udává následující tabulka:

Tabulka 3 – master-mix pro stanovení NQO1

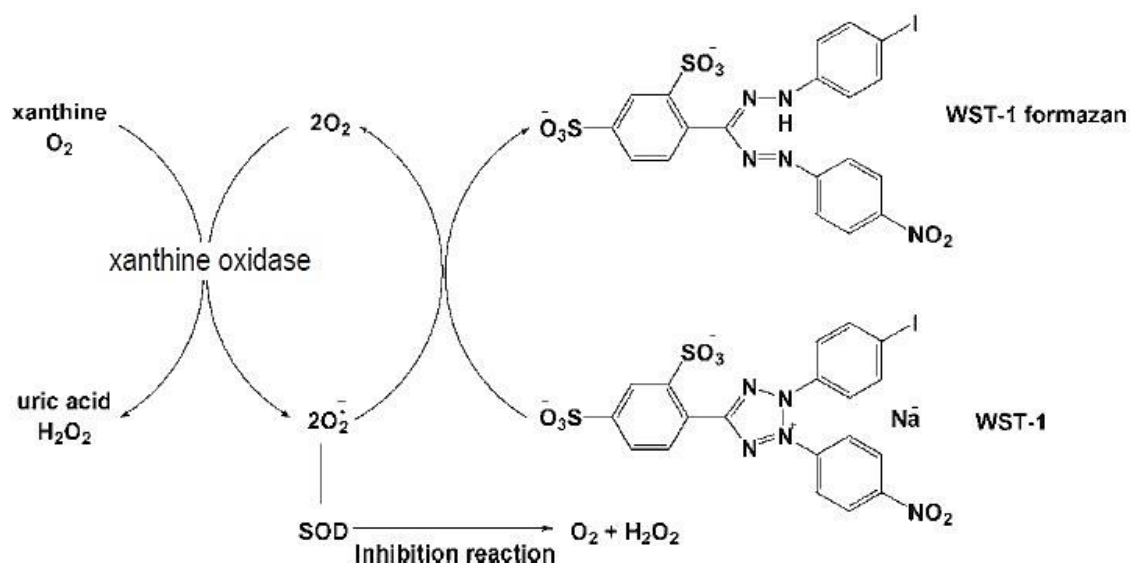
obsah master-mixu	bez inhibítoem	s inhibítoem
TRIS/HCl pufr, 50 mM, pH 7,5 + BSA (0,2188%)	7,68 ml	7,68 ml
Cytochrom c (308 μ M)	3 ml	3 ml
NADH (4 mM) / NADPH (4 mM)	600 μ l	600 μ l
Menadion (2 mM)	60 μ l	60 μ l
Dikumarol (2 mM)	-	60 μ l
DMSO	60 μ l	-

Master-mix byl pak přidán v množství 190 μ l na jamku a ihned byla měřena absorbance přístrojem Tecan. Vyhodnotil se rozdíl absorbance za minutu. Pomocí extinkčního koeficientu redukovaného cytochromu c ($\epsilon=28 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla spočítána aktivita, která byla následně vztažena na množství celkové bílkoviny v cytosolu. Aktivita NQO1 se vypočte jako rozdíl aktivity neinhibované reakce (DMSO) a inhibované reakce (s dikumarolem).

4.2.1.8 *Superoxiddismutasa (SOD)*

Zjištění aktivity SOD bylo provedeno podle technického manuálu SOD Assay Kit – WST (2011). Jedná se o nepřímou metodu stanovení, kdy sodná sůl 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) je redukována na ve vodě rozpustné WST-1 formazanové barvivo za současné oxidace

superoxidového aniontu ($O_2^{\cdot-}$). Poměr redukce WST-1 s $O_2^{\cdot-}$ je přímo úměrný aktivitě xanthinoxidasy, přičemž tato oxidačně redukční reakce je inhibována SOD, díky čemuž můžeme stanovit kolorimetricky její aktivitu (Obr. 6).



Obrázek 6 – princip stanovení aktivity SOD pomocí Assay Kit – WST.

Pro stanovení aktivity SOD bylo potřeba připravit jednotlivé vzorky a tři slepé vzorky podle následující tabulky:

Tabulka 4 – příprava vzorku a slepých vzorků pro stanovení aktivity SOD

	Vzorek	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Roztok vzorku	20 μ l	-	20 μ l	-
Redestilovaná H_2O	-	20 μ l	-	20 μ l
WST pracovní roztok	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Pufř	-	-	20 μ l	20 μ l
Enzymatický prac. roztok	20 μ l	20 μ l	-	-

WST pracovní roztok byl připraven naředěním 1 ml WST v 19 ml pufovacího roztoku. Enzymatický pracovní roztok pak vznikl z 15 μ l enzymatického roztoku ve 2,5 ml ředícího pufru. WST a enzymatický roztok, včetně pufrů jsou dodávány výrobcem v kitu. Měření probíhalo na 96 jamkových GAMA destičkách a roztoky byly přidány v pořadí, jak je uvedeno v tabulce. Po napipetování enzymatického pracovního roztoku byla destička inkubována při 37°C po dobu 20 min a následně byla změřena absorbance při 450 nm.

Při vyhodnocení byl následující rozdíl absorbancí ($A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}} - (A_{\text{vzorek}} - A_{\text{blank2}})$), vyjadřující množství formazanu, jehož vzniku zabránila aktivita SOD, vynásoben molárním extinkčním koeficientem formazanu ($\epsilon=37000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), a tak následně zjištěna aktivita SOD. Podle celkového množství bílkoviny ve vzorku pak byla spočítána specifická aktivita.

4.2.2 Genová exprese

Pro zjištění ovlivnění genové exprese (kvantifikace mRNA) bylo postupováno pomocí metody Real-Time PCR (4.2.5.6), přes izolaci RNA (4.2.5.2), kontrolu kvality RNA (4.2.5.3), DNase treatment (4.2.5.4) a reverzní transkripci (4.2.5.5) do cDNA (Nolan et al. 2006).

4.2.2.1 Příprava vzorků

Buňky byly nasazeny na Petriho misky (\varnothing 6 cm), a to vždy tři misky pro jednu ze sedmi skupin. Po dosažení víc než 50% konfluence byly buňky ovlivněny seskviterpeny (stejně jako v kapitole 4.2.1.1) a inkubovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C (5% CO₂). Následně bylo odsáto veškeré médium, buňky byly opláchnuty ledovým fosfátovým pufrům (PBS). Obsah každé misky byl seškrabán zvlášť do zkumavky s 200 μ l TRIzol. Postup byl proveden na Lékařské fakultě UK v Hradci Králové.

4.2.2.2 Izolace RNA

Separace RNA byla provedena metodou s TRIzolem podle Simmse et al. (1993) vhodnou pro malé množství tkání (50 – 100 mg) či buněk (5×10^6). TRIzol je monofázická směs fenolu a guanidin isothiokyanátu, která při homogenizaci tkáně udržuje integritu RNA, zatímco narušuje buňku a rozpouští buněčné komponenty. Umožňuje tedy selektivní izolaci celkové RNA. Přidání chloroformu a následná centrifugace rozděluje směs na vodnou a organickou fázi, přičemž RNA se nachází ve fázi vodné, z níž je precipitována isopropanolem. DNA s proteiny pak zůstává v organické fázi.

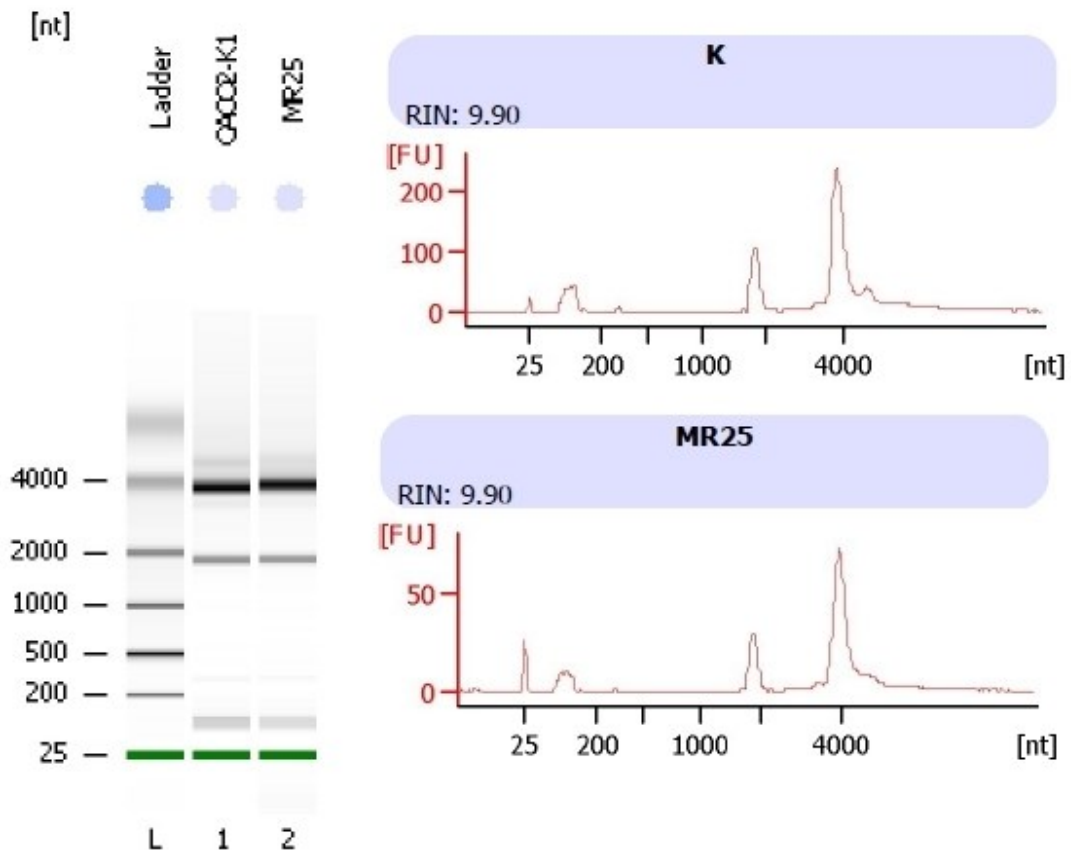
Vzorky byly lyzovány a homogenizovány celkově v 400 μ l TRIzolu. Po 5min inkubaci při pokojové teplotě, umožňující úplnou disociaci nukleoproteinových komplexů, bylo přidáno 80 μ l chloroformu. Vzorky byly protřepány a posléze stočeny 15 min v centrifuze na 12 000 g při 4°C. Následně byla odpipetována horní vodná bezbarvá fáze, k níž bylo přidáno 200 μ l isopropanolu. Po promíchání byla směs

ponechána 10 min při pokojové teplotě a poté centrifugována 10 min při 4°C na 12 000 g. Byl odstraněn supernatant a peleta byla promyta 75% ethanolem, který byl pak po 5min centrifugaci (7 500 g, 4°C) odsán. Peleta se usušila na vzduchu a rozpustila se ve 100 µl vody ošetřené diethylpyrokarbonátem (DEPC voda). Vzorky byly dány k ledu.

Aby bylo možné později naměřené hodnoty mezi sebou porovnat, bylo třeba stanovit koncentrace RNA v daných vzorcích. To bylo provedeno pomocí přístroje Nanodrop, kam byly pipetovány k přeměření vzorky 10x zředěné v DEPC vodě. Přístroj pak kromě koncentrace vzorků vyhodnotil také možnou kontaminaci frakcí proteiny (poměr absorbcí 260/280) či fenolem (poměr absorbcí 260/230, viz. NanoDrop Products: T042-TECHNICAL BULLETIN). Pro lepší manipulaci s RNA byly následně vzorky naředěny na koncentraci 1 µg/µl.

4.2.2.3 *Kontrola RNA*

Kvalita a integrita RNA byla kontrolována elektroforeticky pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer a příslušných čipů, které umožňují výrazně snížit čas separace a spotřebu vzorků oproti gelové elektroforéze. Čipy s 16 jamkami jsou vyrobeny ze skla a tvoří vzájemně propojenou síť, která po naplnění vzorky tvoří jednotný elektrický okruh. Nabité molekuly RNA, s interkalovanými molekulami barviva, pak postupují podle elektrického gradientu (podobně jako u běžné elektroforézy). Detekce je založena na laserem indukované fluorescenci. Kvantifikace probíhá pomocí vnějšího standardu, přičemž systém automaticky třídí a kvantifikuje zjištěná data a podle čísla integrity RNA (RIN), díky němuž je zřetelná přítomnost nebo nepřítomnost degradačních produktů a vyhodnotí, zda zkoumaná RNA vyhovuje (Agilent 2100 Bioanalyzer: 2100 Expert User's Guide). Pro představu lze vyhodnocení dvou našich vyhovujících vzorků vidět na obrázku 7.



Obrázek 7 – vyhodnocení elektroforézy pomocí Agilent 2100 Bioanalyzer u kontrolního vzorku a vzorku MR25 (ladder = vnější standard s molekulami o známé velikosti). Vlevo gelu podobný obrázek (proužky) a vpravo elektroferogramy (píky vyjadřující časový záznam signál detektoru).

4.2.2.4 DNase treatment

Před reverzní transkripcí (kdy dochází k převedení RNA na cDNA) bylo potřeba provést DNase treatment. Jedná se o ošetření vzorků RNA pomocí enzymu deoxyribonukleasy I (DNAsy I). Jde o endonukleasu, která nesespecificky, ale selektivně štěpí DNA na mono- a oligonukleotidy s 5' fosforylovaným a 3' hydroxylovým koncem. Degraduje jedno- i dvouřetězcovou DNA, chromatin a RNA-DNA hybridy a zajistí tedy, aby pozdější výsledky nebyly zkresleny možnou kontaminací DNA z předchozí přípravy vzorků (www.neb.com).

Byl připraven master-mix obsahující v množství pro jeden vzorek 3 μ l DNase pufru, 1 μ l enzymu DNAsy a DEPC vody do objemu 30 μ l (nutno počítat i se vzorkem). Master-mix byl rozpipetován do zkumavek a k němu přidáno 10 μ g RNA. Za třepání

byly zkumavky inkubovány 25 min při 37°C. Poté bylo přidáno 1,5 µl 0,1M EDTA o pH 8,0 a inkubováno 10 min při 75°C, čímž se deaktivovala funkce DNAsy. K vzorkům bylo přidáno 18,5 µl DEPC vody, čímž byla získána ošetřená RNA o koncentraci 0,2 µg/µl.

4.2.2.5 *Reverzní transkripce*

RNA je reverzní transkriptasou (RT) převedena na jednořetězcovou cDNA (complementary DNA). RT je totiž enzym, který zajišťuje retrovirům po průniku do cytoplazmy hostitelské buňky začlenění své genetické informace (zapsané v RNA) do DNA hostitelské buňky. Reverzní transkripce byla uskutečněna pomocí oligo(dT)₁₈ primeru, který nasedá na poly(A) sekvenci na 3' konci mRNA a umožní tak celý její přepis (Coffin et al. 1997, Nam et al. 2002).

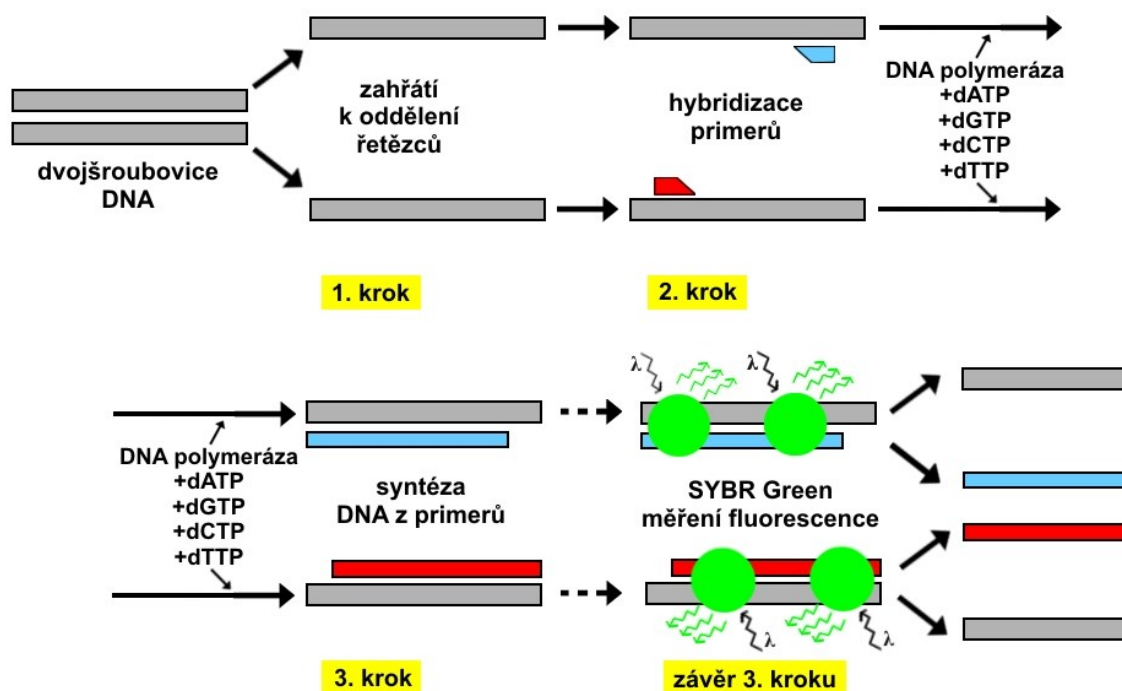
Byly připraveny dvě paralelní sady RNA vzorků smíšením 5 µl RNA (ředěné na koncentraci 0,2 µg/µl) s 1 µl oligo(dT)₁₈ a následně v PCR cykléru zahřáty 5 min na 65°C. Po ochlazení a mírném stočení bylo do jedné ze sad přidáno 14 µl master-mixu obsahujícího RT a do druhé ze sad master-mix bez RT (jakožto kontrola = noRT). Master-mix dále obsahoval dodávaný reakční pufr, deoxynukleosidtrifosáty (dNTP, o 5mM), dithiothreitol (DTT) a DEPC vodu. Reakční směs byla zahřata v PCR cykléru (BioRad iQ5) 50 min na 42°C (kdy docházelo k syntéze cDNA) a poté 5 min na 80°C (kdy se denaturovala RT). Nakonec bylo přidáno 80 µl redestilované vody, přičemž jsme se dostali na koncentraci 10 ng/µl.

4.2.2.6 *Real-Time PCR*

Jde o metodu kvantitativní PCR (Polymerase Chain Reaction = polymerasová řetězová reakce) v reálném čase, jenž umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktů v průběhu reakce. PCR obecně umožňuje rychle a vysoce selektivně namnožit konkrétní nukleotidovou sekvenci z malého vzorku DNA a je založena na využití (termostabilní) DNA-polymerasy pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Syntéza DNA je řízena primery (chemicky syntetizované krátké oligonukleotidy pro známý úsek DNA), které se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA.

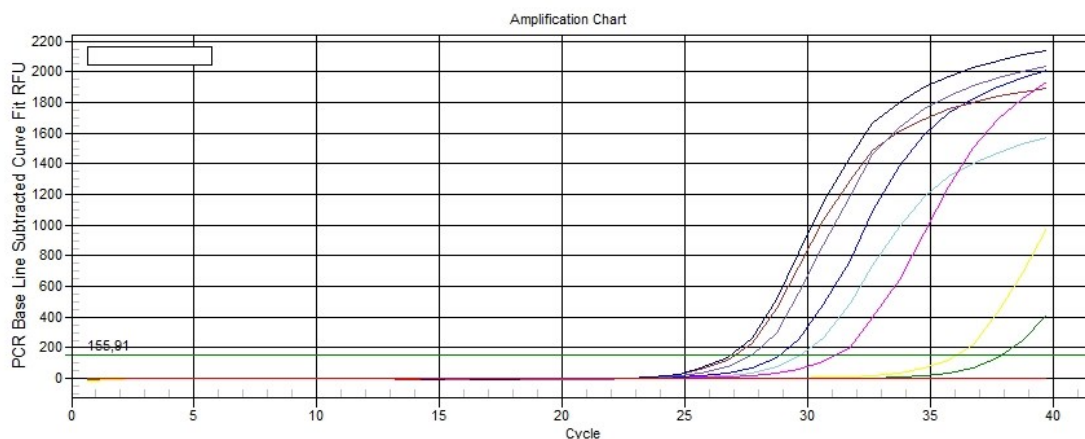
Real-Time PCR probíhá ve třech krocích (viz. Obr. 8), které se opakují v několika cyklech. Nejprve je teplota po dobu 10 min zvýšena na 95°C a dochází k denaturaci DNA dvoušroubovice a řetězce se rozvolňují. Poté jsou ve 2. kroku vzorky

ochlazeny na 60°C (annealing temperature) a vzhledem k přítomnosti velkého nadbytku obou primerů nasedají tyto primery na obě komplementární sekvence DNA. Ve 3. kroku je pak směs zahřata na 72°C, čímž dochází k aktivaci DNA-polymerasy, která za přítomnosti všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátů syntetizuje nové řetězce DNA (fáze amplifikace). Na konci tohoto kroku se detekuje fluorescence barviva SYBR Green, které po interkalaci do syntetizované dvouvláknové DNA emituje silný fluorescenční signál. Po každém cyklu je tedy množství klonovaných úseků dvojnásobné a znovu se opakuje krok 1.



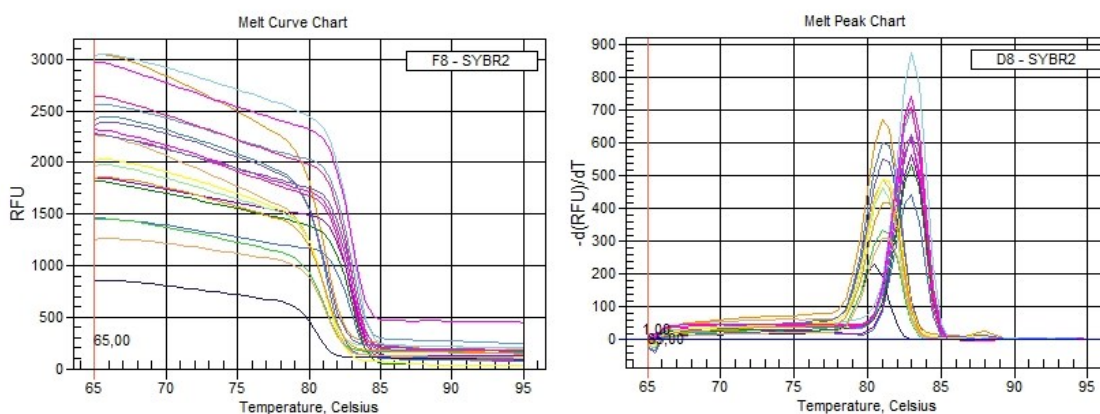
Obrázek 8 – schéma průběhu Real-Time PCR

Fluorescence je měřena po každém jednotlivém cyklu a její změření umožňuje kvantifikaci produktu. V počátečních cyklech je fluorescence nulová, protože je pod mezí detekce. V určitém cyklu pak fluorescence překročí tuto mez a exponenciálně roste až do plateau fáze v pozdějších cyklech (viz. Obr. 9). Čím je vzorek koncentrovanější, tím je detekován (jakožto překročení meze detekce) v dřívějším cyklu (Alberts B. 1998; Wong et Medrano 2005).



Obrázek 9 – detekce fluorescence vzorků o různé koncentraci v průběhu Real-Time PCR, ilustrační graf: osa x = počet cyklů, osa y = fluorescence. Zelená vodorovná přímka ($y=155,91$) je mez detekce (zdroj: *QuantStudio 6 and 7 Flex Software*).

Po proběhnutí všech čtyřiceti cyklů následuje analýza křivky tání, která slouží k posouzení specifity reakce, při které dochází k postupnému zahřívání reakční směsi (od 65°C po 95°C). Nejvyšší fluorescence je při nízké teplotě, při jejím dojde v bodě tání produktu k rozvolnění dvojřetězcové DNA, SYBR Green se uvolní a dojde k poklesu fluorescence. Teplotu tání produktu lze přímo odečíst z vrcholu křivky první derivace (Obr. 10).



Obrázek 10 – ilustrační grafy, křivka teploty tání produktů vznikajících při Real-Time PCR (osa x = teplota, osa y = fluorescence) a její první derivace (vpravo) (zdroj: *QuantStudio 6 and 7 Flex Software*).

Principem kvantifikace našich vzorků bylo stanovení množství prepisované cDNA pomocí primerů vymezujících krátký úsek sledovaného genu. Referenčním genem umožňujícím relativní kvantifikaci vzorků byla GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát

dehydrogenasa) a B2M (beta-2-microglobulin), u kterých byla ověřena stabilita. Po přípravě master-mixu o finální koncentraci primerů 250nM byla nakonec do celkového objemu 20 μ l pipetována ředěná cDNA (Tab. 5). Pro netemplátovou kontrolu (NTC) bylo místo cDNA pipetováno 5 μ l vody, bylo pracováno také s noRT kontrolou.

Tabulka 5 – příprava reakční směsi pro Real-Time PCR (přidávané hořčičné ionty ovlivňují aktivitu a kvalitu DNA polymerasy při začleňování volných deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) do nově vznikajícího řetězce DNA.)

Reagencie	μ l pro jeden vzorek
H ₂ O	8,10
10x reakční pufr	2,00
50 mM MgCl ₂	1,40
5mM dNTP	0,80
Ředěný SYBR Green I	0,60
F _{forward} primer (5 μ M)	1,00
R _{reverse} primer (5 μ M)	1,00
Hotgoldstar enzym (DNA polymerasa)	0,10
cDNA (ředěná 1:4)	5,00

Tato směs byla vložena do PCR cykléru a byl spuštěn výše načrtnutý program. Po proběhnutí celého programu, byly zkontrolovány průběhy fluorescenčních křivek a křivek tání. Byl vypočítán také relativní poměr sledovaného genu v ovlivněných vzorcích vůči kontrole, normalizovaný pomocí referenčních genů podle komparativní delta-delta Ct metody: $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak a Schmittgen 2001), přičemž

$$\Delta\Delta Cq = [Cq(ZG)-Cq(RG)]_{\text{ovlivněné}} - [Cq(ZG)-Cq(RG)]_{\text{kontroly}}$$

ZG = zkoumaný gen, RG = referenční gen (průměr GAPDH a B2M)

4.2.3 Detekce proteinů

4.2.3.1 Příprava vzorků

Buňky byly nasazeny na Petriho misky (\varnothing 6 cm), a to vždy tři misky pro jednu ze sedmi skupin. Po dosažení víc než 50% konfluency byly buňky ovlivněny seskviterpeny (stejně jako v kapitole 4.2.1.1) a inkubovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C (5% CO₂). Z jednotlivých Petriho misek s buněčnými kulturami bylo odsáto médium, místo kterého byly přidány do každé misky asi 3 ml ledového PBS a kýváním byly buňky opláchnuty. Po odsátí PBS bylo přidáno 100-150 μ l ledového lyzačního

pufu (Tab. 7) s inhibitory proteáz, který se nechal působit asi 2 min. Následně byly jednotlivé Petriho misky seškrabány a buňky přeneseny do zkumavek (obsah ze tří misek stejného typu do jedné zkumavky), které byly uloženy při -20°C. Celý postup byl opakován dvakrát a byl proveden na Lékařské fakultě UK v Hradci Králové.

Po rozmražení vzorků byly buňky ve zkumavkách homogenizovány pomocí injekčních stříkaček s jehlou, do nichž byly vzorky desetkrát nasáty a vysáty. Po asi 20 minutovém ponechání homogenátů na ledu byly centrifugovány 10 min na 13 000 rpm při 4°C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant pro stanovení množství celkové bílkoviny (postup viz. kapitola 4.2.1.2). Podle obsahu bílkoviny byly vzorky naředěny na cílovou koncentraci 1 µg/µl pomocí 4xSDS (Tab. 6) a lyzačního pufru (Tab. 7), k jehož 13 ml se přidalo 130 µl 100 mM fenylmethansulfonyl-fluoridu (PMSF) a 130 µl směsi inhibitorů proteas. Prakticky bylo napipetováno vypočítané množství vzorku, následně 4xSDS v takovém množství, aby ve výsledné směsi tvořilo ¼ celkového objemu (vzniklo 1xSDS) a doplnilo se lyzačním pufrem s inhibitory.

Tabulka 6 - složení 4xSDS vzorkový pufr pro elektroforézu

Reagencie (konečná koncentrace)	Množství
200 mM TRIS/HCl pH 6,8	4 ml
40% glycerol	9,41 ml
6% SDS (dodecylsírán sodný)	1,2 g
0,2 M DTT (dithiotreitol)	0,617 g
0,1 g bromfenolová modř	špetka
redest. H ₂ O	20 ml

Tabulka 7 – složení lyzačního pufru pro přípravu vzorků na elektroforézu

Reagencie (konečná koncentrace)	Množství
50 mM TRIS/HCl pH 7,4	50 ml
150 mM NaCl	8,766 g
10% glycerol	117,65 ml
1% Triton X-100	10 ml
2 mM EDTA	0,58 g
2 mM EGTA	0,76 g
40 mM β-glycerolfosfát	8,52 g
50 mM fluorid sodný	2,09 g
10 mM pyrofosfát sodný	4,46 g
2 mM dithiotreitol	0,3085 g
200 µM vanadičnan sodný	0,03678 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Naředěné vzorky se denaturovaly při 95°C po dobu 5 min a byly uloženy k uchování při -20°C. Před každým použitím byly rozmrazeny a znovu zahřáty 5 min na 95°C.

4.2.3.2 Elektroforéza proteinů

Elektroforéza proteinů je separační metoda, která je založena na skutečnosti, že nabitě molekuly bílkovin budou po aplikaci elektrického pole putovat matricí (polyakrylamidovým gelem) od jedné elektrody k druhé. Polyakrylamidový gel vzniká polymerizací monomerního akrylamidu (AA) a N,N'-metylen-bisakrylamidu (bisAA) a tvoří síťovitou strukturu.

Nejběžněji používaným systémem je SDS-PAGE. Směs proteinů je zahřata na 95°C za přítomnosti nadbytku SDS (detergent) a thiolového činidla (DTT) redukujícího disulfidické můstky, čímž dochází k disociaci proteinů na jejich individuální polypeptidové podjednotky. Polypeptidy pak tvoří s SDS komplexy (1,4 g SDS/g polypeptidu), které mají v zásadě stejnou hustotu záporného náboje, díky čemuž se v polyakrylamidovém gelu o vhodné porozitě separují výhradně podle jejich velikosti. V elektrickém poli proteiny putují ke kladnému náboji (gelová matrice brzdí jejich pohyb) a vzdálenost od místa nanesení koreluje s velikostí proteinu, přičemž menší molekuly doputují gelem dále (Hames 1998).

SDS-PAGE systém využívá dvou typů na sebe vrstvených gelů o různém pH a porozitě. Spodní gel (Tab. 8) slouží k separaci a horní zaostřovací gel s většími póry (Tab. 9) koncentruje relativně velké objemy proteinových vzorků do tenkých proužků. Iniclace polymerace gelu nastává po přidání peroxodisíranu amonného (APS) a tetramethylethylendiaminu (TEMED). APS rozpuštěný ve vodě (připravený těsně před použitím) tvoří peroxodisíranové radikály aktivující akrylamidové monomery a TEMED katalyzuje polymerizační reakci díky své schopnosti přenášet elektrony.

Tabulka 8 – složení separačního (spodního) gelu SDS-PAGE

Reagencie	10%-2 gely; 1,5 mm	12,5% -2 gely; 1,5 mm
redestilovaná voda	9,8 ml	8,55 ml
puf. 1,5M TRIS-HCl pH 8,8	5 ml	5 ml
40% roztok AA + bis AA	5 ml	6,25 ml
10% SDS	0,2 ml	0,2 ml
10% roztok APS	200 µl	200 µl
TEMED	16 µl	16 µl

Podle vlastnosti stanovovaného proteinu byl zvolen buď 10%, nebo 12,5% gel. Po důkladném promíchání byla směs ihned pipetována mezi skla upevněná ve stojánu elektroforetické sady asi do výšky 4,5 cm a převrstvena isobutanolem nasyceným vodou. Po 30-60 minutové polymeraci byl isobutanol slit a připraven roztok pro horní gel (Tab. 9), který byl po promíchání nalit mezi skla na spodní gel. Následně byl do něj

zasunut hřeben, který později umožnil aplikovat do gelu zkoumané vzorky, a směs opět alespoň 30 min polymerizovala.

Tabulka 9 – složení 4% zaostřovacího (horního) gelu SDS-PAGE, do něhož se vnáší vzorky

Reagencie	2 gely; 1,5 mm
redestilovaná voda	6,42 ml
pufr 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8	2,5 ml
40% roztok AA + bis AA	0,98 ml
10% SDS	0,1 ml
10% roztok APS	200 μ l
TEMED	16 μ l

Připravené gely se vyndaly ze stojánku, opláchly vodou, vysunul se z nich hřeben a vložily se do stojánku na elektroforézu, jenž se umístil do vaničky, do níž se posléze nalil elektrodový pufr (72 g glycinu, 15 g TRIS a 5 g SDS byl rozpuštěn ad 1000 ml redestilované vody, pH pomocí 4M HCl upraveno na 8,3) tak, aby byl celý gel ponořen. Následně se do každé jamky přeneslo 25 μ l vzorku (předem povařeného 5 min na 95°C) a do jedné z nich 5 μ l molekulárního standardu. Samotná elektroforéza probíhala za konstantního napětí 90 V do doby, až čelo doběhlo na spodní okraj gelu. Poté byl gel z vaničky a stojánku vysvobozen a horní zaostřovací gel byl odříznut. Separační gel byl pak uchován pro western blotting.

4.2.3.3 Western blotting (WB)

Jedná se o imunodetekční metodu používanou k identifikaci specifických antigenů rozpoznávaných protilátkami, jež se navazují na proteiny, a umožňuje detekovat i velmi malé množství proteinu mezi poměrně vysokým pozadím. Skládá se ze dvou kroků: přenosu proteinů z gelu na membránu a inkubace membrány se specifickou protilátkou.

Nejprve jsou antigeny spolu s ostatními proteiny v elektrickém poli přeneseny vertikálně z gelu na nitrocelulózovou membránu, kde proteiny zakotví a stávají se přístupnými pro vazbu imunodetekčních činidel. Membrána se potom ponoří do roztoku obsahujícího protein (BSA nebo odtučněné mléko) za účelem blokování všech nesespecifických míst. Posléze je membrána inkubována s primární protilátkou, která reaguje s hledaným antigenem. Po promytí membrány s cílem odplavení nesespecificky zachycené protilátky se membrána inkubuje s konjugátem sekundární protilátky a enzymu poskytujícího barevný produkt reakcí s chromogenním substrátem (Rumlová et al. 2003).

Separační gel získaný z SDS-PAGE i nitrocelulózová membrána byly vloženy na 20 min do blotovacího pufru (k 6,06 g TRIS a 28,8 g glycinu přidáno 400 ml methanolu a rozpuštěno ad 2000 ml redestilované vody). Poté byl proveden pomocí přístroje BioRad Trans Blot Turbo samotný blotting, přičemž se na sebe navrstvil silný filtrační papír, membrána, gel a opět silný filtrační papír a přes ně pak od shora dolů procházel 20 min elektrický proud.

Následovala fáze detekce proteinů. Membrány byly v plastových krabičkách s víčkem propláchnuty redestilovanou vodou a na membránu byl nalit roztok 5% mléka v TBST pufru (k 8,77 g NaCl přidáno 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru; pH 8,0, rozpuštěno ve vodě ad 1000 ml) a nechal se působit 2 hodiny. Poté bylo pokračováno inkubací s primární protilátkou přes noc. Na další den byla primární protilátka odpipetována a membrána byla opláchnuta 4x15 min TBST pufrem. Potom byla membrána inkubována 1 hodinu se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou. Závěrem byla membrána opět opláchnuta 4x15 min TBST pufrem.

Metoda byla zakončena chemiluminiscenční detekcí. Na membránu byl nanesen detekční substrát vzniklý smícháním roztoku luminolu a peroxidu vodíku a membrána byla 5 min inkubována při tlumeném světle. Principem stanovení je reakce H_2O_2 s luminolem katalyzovaná křenovou peroxidasou konjugovanou se sekundární protilátkou, kdy z luminolu vzniká 3-aminofthalát, jenž přechází do nižšího energetického stavu za vyzáření světla, což se detekuje (www.sigmaaldrich.com). Detekce probíhala okamžitě po 5 min scannerem C-DiGit™ Blot Scanner (Li-Cor) a pomocí příslušného softwaru byly detekované proužky vyhodnoceny, přičemž referenční bílkovinou, k níž byly vzorky vztaheny, byl beta aktin.



Obrázek 11 – scann membrány po WB přístrojem C-DiGit™ Blot Scanner (Li-Cor) a vyhodnocení pomocí příslušného softwaru.

4.2.4 Statistická analýza

Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka

$$(S_N = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}).$$

Statistická významnost výsledků byla vyhodnocena metodou t-test s využitím programu GraphPad Prism verze 6. Rozdíly byly považovány za signifikantní při $p < 0,05$.

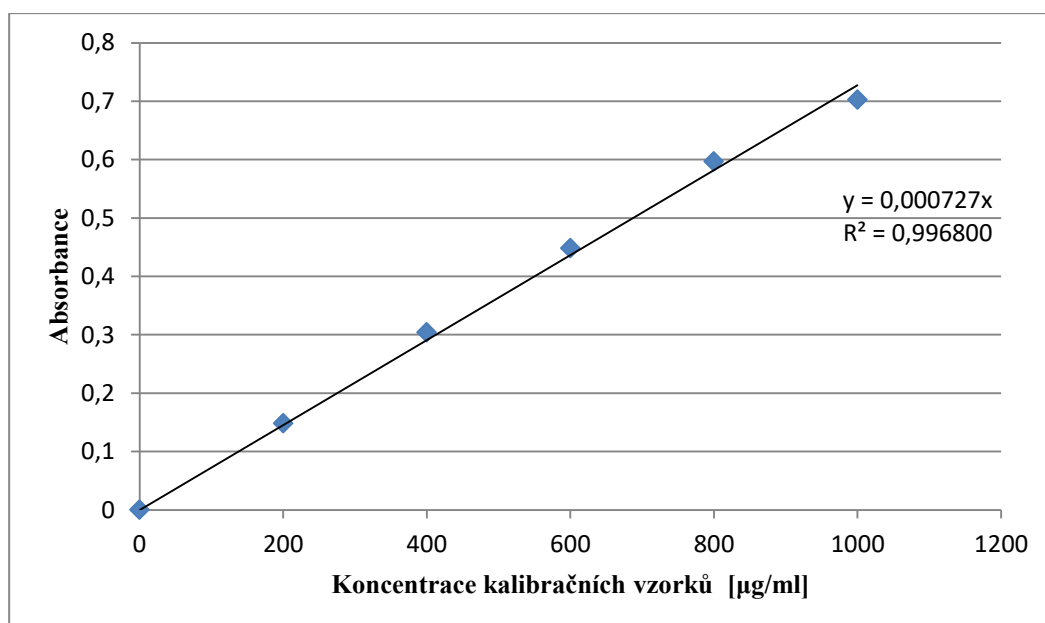
5 Výsledky

V následujících tabulkách a grafech se hojně vyskytují tyto zkratky:

K	kontrola (buňky ovlivněné 0,1% DMSO)
MR25	buňky ovlivněné silicemi z <i>Myrica rubra</i> o koncentraci 25 µg/ml
MR50	buňky ovlivněné silicemi z <i>Myrica rubra</i> o koncentraci 50 µg/ml
α-HUM25	buňky ovlivněné α-humulenem o koncentraci 25 µg/ml
α-HUM50	buňky ovlivněné α-humulenem o koncentraci 50 µg/ml
t-NER25	buňky ovlivněné trans-nerolidolem o koncentraci 25 µg/ml
t-NER50	buňky ovlivněné trans-nerolidolem o koncentraci 50 µg/ml

5.1 Stanovení celkové bílkoviny

Koncentrace proteinu byla stanovena metodou s BCA, jak je popsáno v kapitole 4.2.1.2 vždy třikrát z každého experimentu. Pro každé jednotlivé měření byla sestavena kalibrační křivka z lineární regrese absorbancí kalibračních vzorků BSA v hodnotách 0, 200, 400, 600, 800 a 1000 µg/ml (Obr. 12). Pomocí rovnice kalibrační křivky pak byla vypočítána koncentrace bílkovin v jednotlivých vzorcích.



Obrázek 12 – graf kalibrační křivky z jednoho ze tří provedených stanovení celkové bílkoviny, $y = 0,000727x$ je rovnice křivky, R je hodnota spolehlivosti.

Hodnoty tří měření pro každé zopakování experimentu byly zprůměrovány (Tab. 10). S těmito průměry pak bylo pracováno při určení specifických aktivit enzymů.

Tabulka 10 - průměrné hodnoty koncentrace bílkovin pro obě buněčné linie

Vzorek	Koncentrace bílkoviny [mg/ml] ± směrodatná odchylka			
	1. experiment		2. experiment	
K	2,665	± 0,343	2,054	± 0,370
MR25	2,285	± 0,124	1,698	± 0,296
MR50	2,095	± 0,250	1,466	± 0,202
α-HUM25	2,956	± 0,321	1,581	± 0,255
α-HUM50	2,316	± 0,272	2,220	± 0,278
t-NER25	2,347	± 0,410	1,516	± 0,224
t-NER50	2,215	± 0,217	1,488	± 0,277

Množství celkové bílkoviny bylo třeba stanovit také pro vzorky na Western blot. Měření bylo opakováno dvakrát a jeho zprůměrované hodnoty včetně směrodatných odchylek jsou k vidění v tabulce č. 11. Podle zjištěného obsahu bílkoviny byly vzorky naředěny na cílovou koncentraci 1 µg/µl pomocí 4xSDS.

Tabulka 11 – průměrná koncentrace celkové bílkoviny ve vzorcích pro elektroforézu a Western blot

Vzorky	Koncentrace bílkoviny [mg/ml]	Směrodatná odchylka
K	3,976	0,034
MR25	4,016	0,180
MR50	3,629	0,006
α-HUM25	4,647	0,000
α-HUM50	4,286	0,122
t-NER25	4,348	0,087
t-NER50	4,378	0,072

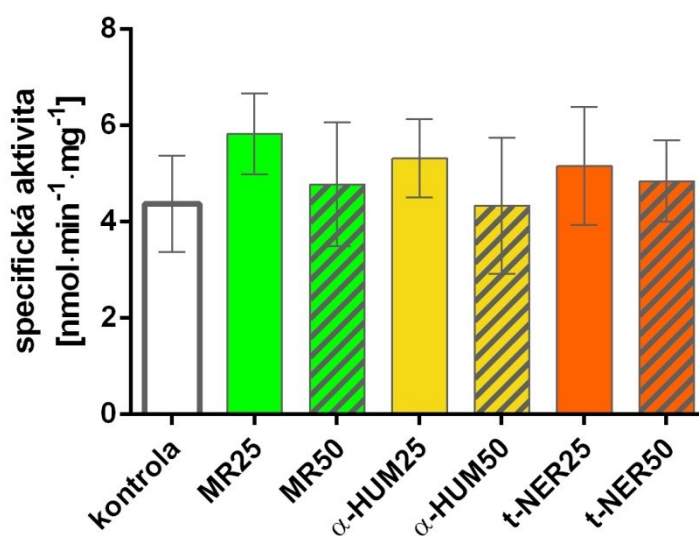
5.2 Aktivity enzymů

5.2.1 Glutathionperoxidasa (GPx)

Aktivita GPx byla stanovována podle metody popsané v kapitole 4.2.1.3. V tabulce 12 lze vidět zprůměrované naměřené hodnoty ze všech měření a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 13) grafické vyjádření.

Tabulka 12 – specifická aktivita GPx

Vzorky	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Směrodatná odchylka
K	4,369	1,000
MR25	5,822	0,836
MR50	5,022	1,145
α -HUM25	5,310	0,810
α -HUM50	4,330	1,412
t-NER25	5,152	1,227
t-NER50	4,836	0,846



Obrázek 13 – specifická aktivita GPx

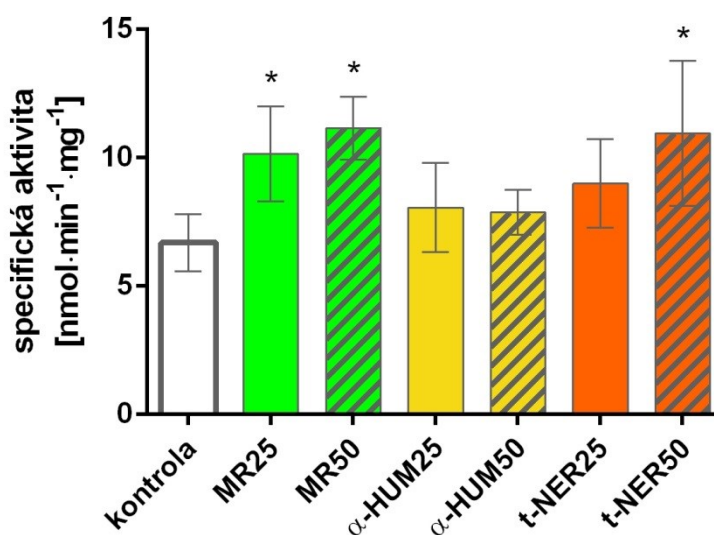
Nebyl zjištěn žádný statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl specifické aktivity GPx u buněk Caco-2 ovlivněných seskviterpeny či silicí *M. rubra* vzhledem ke kontrolní skupině.

5.2.2 Glutathionreduktasa (GR)

Aktivita GR byla stanovována podle metody popsané v kapitole 4.2.1.4. V tabulce 13 lze vidět zprůměrované naměřené hodnoty ze všech měření a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 14) grafické vyjádření.

Tabulka 13 – specifická aktivita GR

Vzorky	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Směrodatná odchylka
K	6,676	1,108
MR25	10,136	1,847
MR50	11,143	1,228
α -HUM25	8,044	1,740
α -HUM50	7,857	0,877
t-NER25	8,980	1,722
t-NER50	10,937	2,819



Obrázek 14 – specifická aktivita GR; * označuje statisticky signifikantní změnu oproti kontrole ($p < 0,05$)

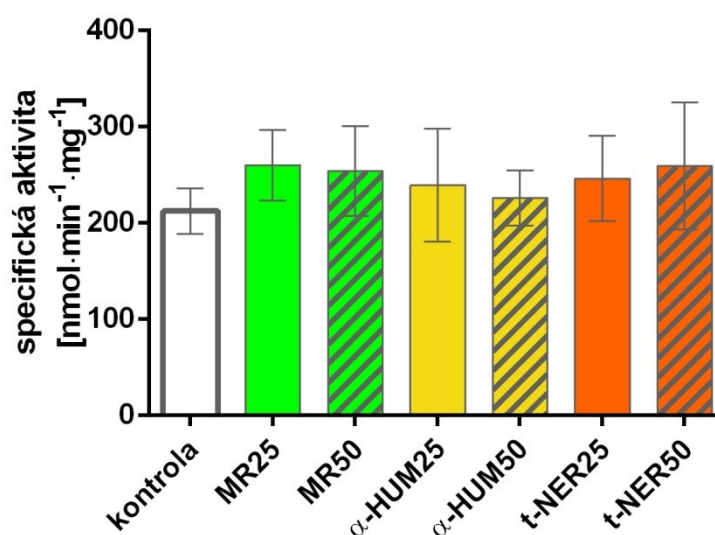
U aktivity GR buněk byl vzhledem ke kontrolnímu vzorku zjištěn statisticky významný rozdíl u třech ovlivněných vzorků. U buněk Caco-2 ovlivněných MR25, MR50 a t-NER50 bylo pozorováno zvýšení specifické aktivity tohoto enzymu.

5.2.3 Glutathion-S-transferasa (GST)

Aktivita GST byla stanovována podle metody popsané v kapitole 4.2.1.5. V tabulce 14 lze vidět zprůměrované naměřené hodnoty ze všech měření a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 15) grafické vyjádření.

Tabulka 14 – specifická aktivita GST

Vzorky	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Směrodatná odchylka
K	212,269	23,618
MR25	259,695	36,839
MR50	253,475	46,661
α -HUM25	238,966	58,650
α -HUM50	225,708	28,890
t-NER25	245,875	44,145
t-NER50	258,714	66,001



Obrázek 15 – specifická aktivita GST

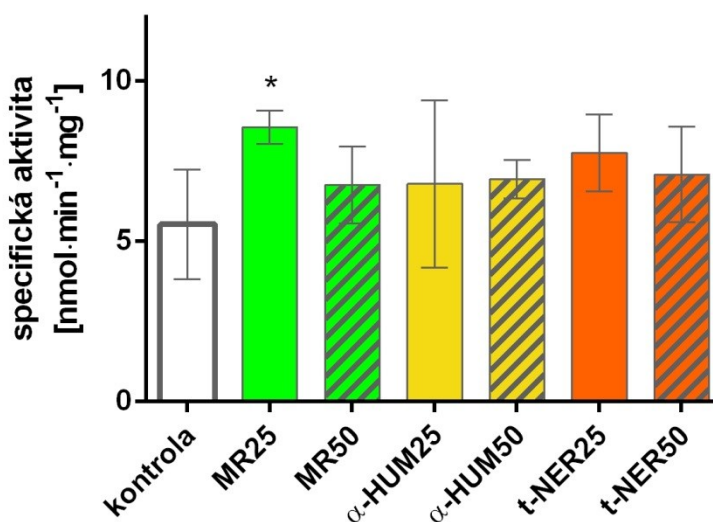
Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl specifické aktivity GST u buněk Caco-2 ovlivněných seskviterpeny či silicí *M. rubra* vzhledem ke kontrolní skupině.

5.2.4 Katalasa (CAT)

Aktivita CAT byla stanovována podle metody popsané v kapitole 4.2.1.6. V tabulce 15 lze vidět zprůměrované naměřené hodnoty ze všech měření a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 16) grafické vyjádření.

Tabulka 15 – specifická aktivita CAT

Vzorky	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Směrodatná odchylka
K	5,528	1,711
MR25	8,551	0,527
MR50	6,753	1,197
α -HUM25	6,782	2,604
α -HUM50	6,936	0,598
t-NER25	7,751	1,198
t-NER50	7,080	1,489



Obrázek 16 – specifická aktivita CAT; * označuje statisticky signifikantní změnu oproti kontrole ($p < 0,05$)

U specifické aktivity CAT byl pozorován statisticky významný ($p < 0,05$) nárůst vzhledem ke kontrolnímu vzorku pouze u buněk Caco-2 ovlivněných MR25.

5.2.5 NAD(P)H Chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1)

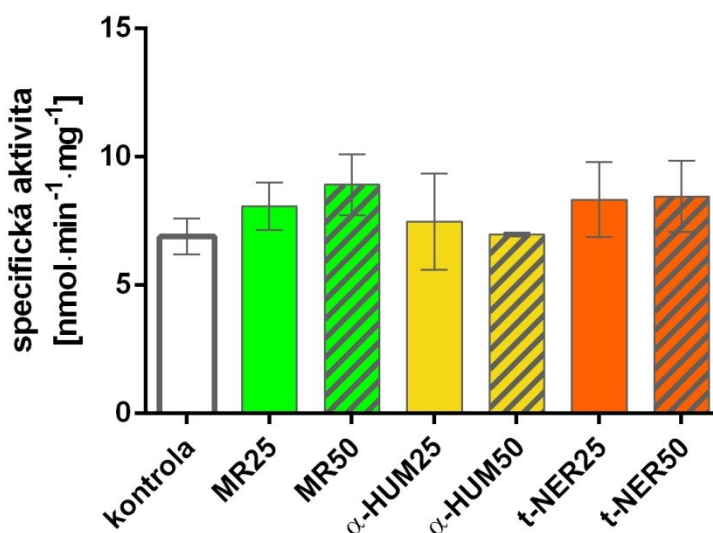
Aktivita NQO1 byla stanovována podle metody popsané v kapitole 4.2.1.7. Nebyla však detekována žádná aktivita ani u kontrolních vzorků, ani u vzorků ovlivněných seskviterpeny. Tento enzym tedy není u buněk Caco-2 vůbec aktivní a pravděpodobně ani přítomný (což jsme ale elektroforeticky a WB neověřovali).

5.2.6 Superoxiddismutasa (SOD)

Aktivita SOD byla stanovována podle metody popsané v kapitole 4.2.1.8. V tabulce 16 lze vidět zprůměrované naměřené hodnoty ze všech měření a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 17) grafické vyjádření.

Tabulka 16 – specifická aktivita SOD

Vzorky	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Směrodatná odchylka
K	8,311	0,371
MR25	8,341	0,164
MR50	8,958	0,007
α -HUM25	8,258	0,052
α -HUM50	8,278	0,718
t-NER25	8,612	0,854
t-NER50	8,853	0,100



Obrázek 17 – specifická aktivita SOD

Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl specifické aktivity SOD u buněk Caco-2 ovlivněných seskviterpeny či silicí *M. rubra* vzhledem ke kontrolnímu vzorku.

5.3 Ovlivnění genové exprese

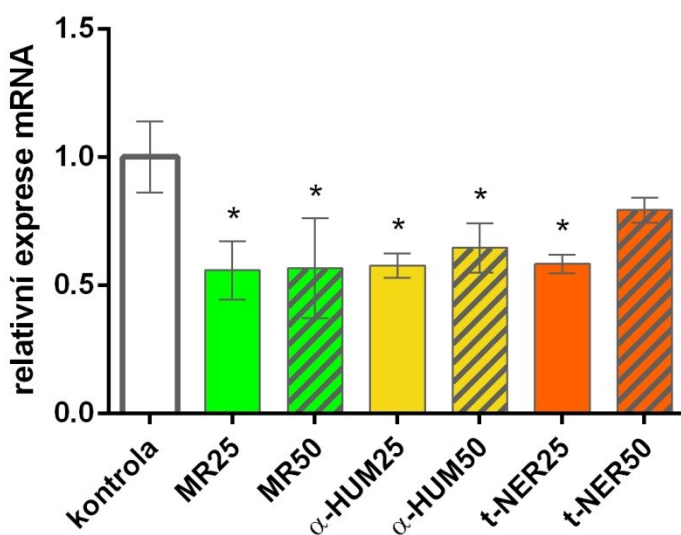
Zjištění, na kolik byla ovlivněna exprese genů výše zmíněných enzymů u buněk inkubovaných se seskviterpeny, bylo provedeno metodou Real-Time PCR podle popisu v kapitole 4.2.2. Vzhledem k tomu, že u NQO1 nebyla detekována vůbec žádná aktivita ani u kontrolního vzorku, ovlivnění genové exprese tohoto enzymu nebylo zkoumáno.

5.3.1 Glutathionperoxidasa 7 (GPx 7)

V tabulce 17 lze vidět zprůměrované relativní hodnoty genové exprese GPx 7 ze všech měření vzhledem ke kontrolnímu vzorku a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 18) grafické vyjádření.

Tabulka 17 – relativní genová exprese GPx 7

Vzorky	Relativní exprese mRNA	Směrodatná odchylka
K	1,000	0,140
MR25	0,558	0,113
MR50	0,566	0,194
α -HUM25	0,576	0,047
α -HUM50	0,645	0,096
t-NER25	0,583	0,037
t-NER50	0,793	0,048



Obrázek 18 – relativní genová exprese GPx 7; * označuje statisticky významnou změnu oproti kontrole ($p < 0,05$)

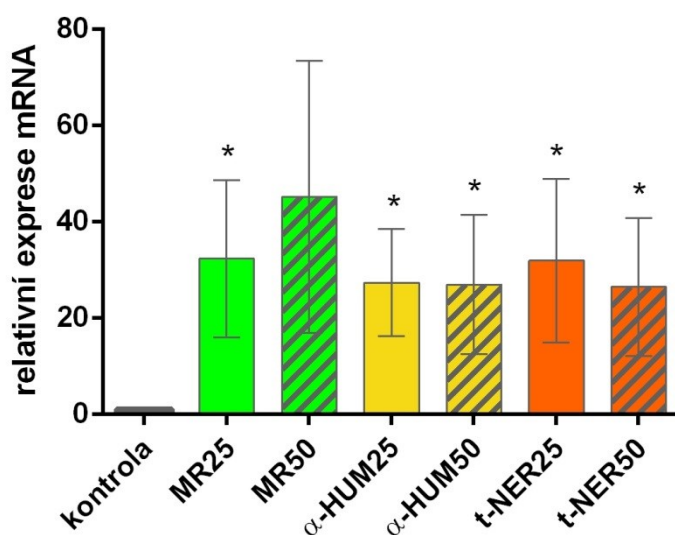
Buňky Caco-2 ovlivněné seskviterpeny či silicí *M. rubra* exprimovaly gen pro GPx 7 méně než kontrolní, neovlivněné, buňky. Kromě buněk ovlivněných t-NER50 byl u všech pokles exprese statisticky významný ($p < 0,05$).

5.3.2 Glutathionreduktasa (GR)

V tabulce 18 lze vidět zprůměrované relativní hodnoty genové exprese GR ze všech měření vzhledem ke kontrolnímu vzorku a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 19) grafické vyjádření.

Tabulka 18 – relativní genová exprese GR

Vzorky	Relativní exprese mRNA	Směrodatná odchylka
K	1,000	0,457
MR25	32,301	16,319
MR50	45,162	28,279
α -HUM25	27,283	11,147
α -HUM50	26,916	14,437
t-NER25	31,889	17,031
t-NER50	26,417	14,308



Obrázek 19 – relativní genová exprese GR; * označuje statisticky významnou změnu oproti kontrole ($p < 0,05$)

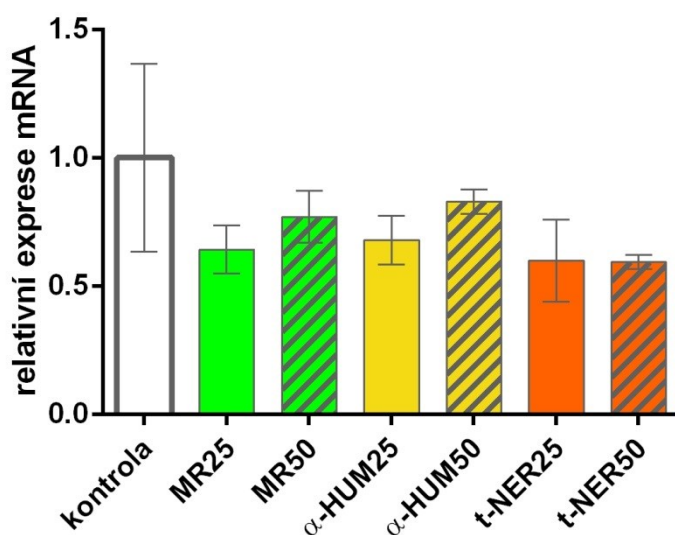
Buňky Caco-2 ovlivněné seskviterpeny či silicí *M. rubra* exprimovaly gen pro GR o poznání více než kontrolní vzorek. U všech buněk, kromě těch ovlivněných MR50, byl nárůst statisticky významný ($p < 0,05$).

5.3.3 Glutathion-S-transferasa π (GST π)

V tabulce 19 lze vidět zprůměrované relativní hodnoty genové exprese GST ze všech měření vzhledem ke kontrolnímu vzorku a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 20) grafické vyjádření.

Tabulka 19 – relativní genová exprese GST π

Vzorky	Relativní exprese mRNA	Směrodatná odchylka
K	1,000	0,366
MR25	0,642	0,094
MR50	0,770	0,101
α -HUM25	0,679	0,095
α -HUM50	0,829	0,047
t-NER25	0,599	0,160
t-NER50	0,594	0,027



Obrázek 20 – relativní genová exprese GST π

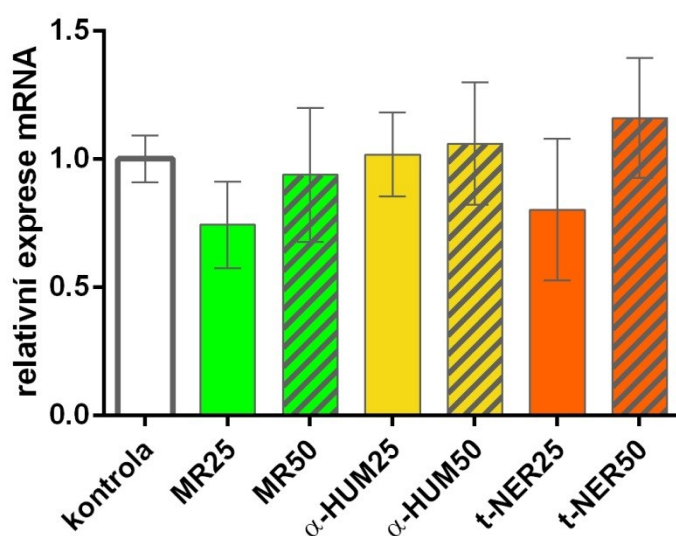
U genové exprese GST π nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi buňkami Caco-2 ovlivněnými seskviterpeny či silicí *M. rubra* a kontrolním vzorkem.

5.3.4 Katalasa (CAT)

V tabulce 20 lze vidět zprůměrované relativní hodnoty genové exprese CAT ze všech měření vzhledem ke kontrolnímu vzorku a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 21) grafické vyjádření.

Tabulka 20 – relativní genová exprese CAT

Vzorky	Relativní exprese mRNA	Směrodatná odchylka
K	1,000	0,091
MR25	0,743	0,168
MR50	0,938	0,261
α -HUM25	1,017	0,165
α -HUM50	1,060	0,239
t-NER25	0,802	0,276
t-NER50	1,159	0,234



Obrázek 21 – relativní genová exprese CAT

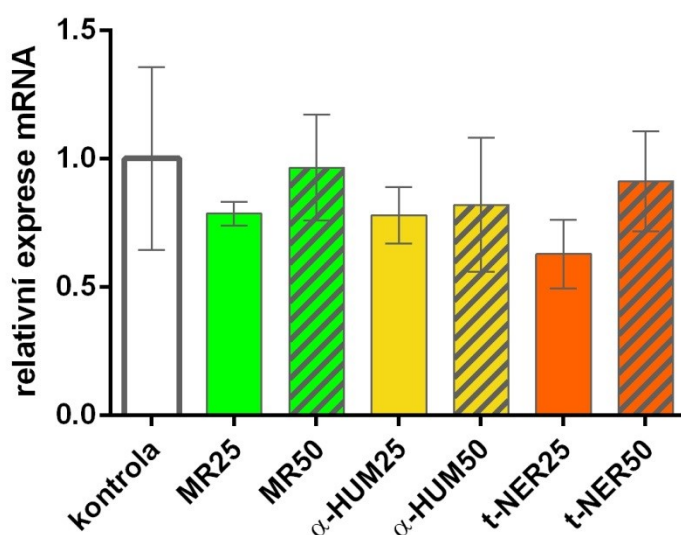
U genové exprese CAT nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi buňkami Caco-2 ovlivněnými seskviterpeny či silicí *M. rubra* a kontrolním vzorkem.

5.3.5 Superoxiddismutasa (SOD)

V tabulce 21 lze vidět zprůměrované relativní hodnoty genové exprese SOD ze všech měření vzhledem ke kontrolnímu vzorku a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 22) grafické vyjádření.

Tabulka 21 – relativní genová exprese SOD

Vzorky	Relativní exprese mRNA	Směrodatná odchylka
K	1,000	0,357
MR25	0,785	0,045
MR50	0,965	0,205
α -HUM25	0,779	0,109
α -HUM50	0,819	0,261
t-NER25	0,629	0,134
t-NER50	0,912	0,195



Obrázek 22 – relativní genová exprese SOD

U genové exprese SOD nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi buňkami Caco-2 ovlivněnými seskviterpeny či silicí *M. rubra* a kontrolním vzorkem.

5.4 Detekce proteinů

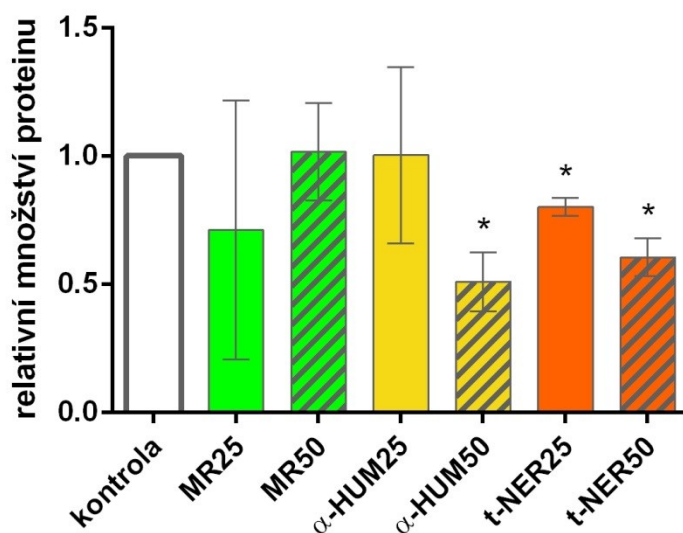
Na kolik bylo seskviterpeny ovlivněno množství proteinů – enzymů v buňkách, bylo určeno pomocí elektroforézy a WB, jak je popsáno v kapitole 4.2.3. Vzhledem k jisté časové i finanční náročnosti metody byly pro určení vybrány enzymy GPx, GR a CAT, u kterých byly pozorovány signifikantní změny v jejich aktivitě či expresi. Množství proteinu bylo vztaženo na beta aktin a pak relativně vyjádřeno ke kontrole.

5.4.1 Glutathionperoxidasa 7 (GPx 7)

V tabulce 22 lze vidět zprůměrované relativní hodnoty množství bílkoviny GPx 7 ze všech stanovení vzhledem ke kontrolnímu vzorku a jejich směrodatné odchylky. Nižší pak (Obr. 23) grafické vyjádření.

Tabulka 22 – relativní množství bílkoviny GPx 7

Vzorky	Relativní množství proteinu	Směrodatná odchylka
K	1,000	0
MR25	0,711	0,505
MR50	1,015	0,190
α -HUM25	1,003	0,343
α -HUM50	0,509	0,115
t-NER25	0,801	0,034
t-NER50	0,605	0,073



Obrázek 23 – relativní množství bílkoviny GPx 7; * označuje statisticky signifikantní změnu oproti kontrole ($p < 0,05$)

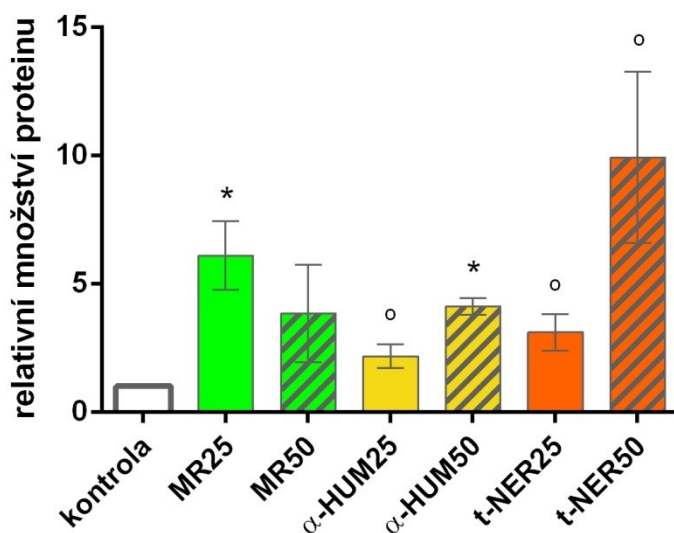
U buněk Caco-2 ovlivněných α -HUM50, t-NER25 a t-NER50 byl pozorován statisticky významný ($p < 0,05$) úbytek množství proteinu GPx 7 oproti kontrole.

5.4.2 Glutathionreduktasa (GR)

V tabulce 23 lze vidět zprůměrované relativní hodnoty bílkoviny GR ze všech stanovení vzhledem ke kontrolnímu vzorku a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 24) grafické vyjádření.

Tabulka 23 – relativní množství bílkoviny GR

Vzorky	Relativní množství proteinu	Směrodatná odchylka
K	1,000	0
MR25	6,093	1,332
MR50	3,844	1,905
α -HUM25	2,170	0,464
α -HUM50	4,119	0,321
t-NER25	3,102	0,704
t-NER50	9,924	3,334



Obrázek 24 – relativní množství bílkoviny GR; * označuje statisticky signifikantní změnu oproti kontrole ($p < 0,05$), \circ označuje změnu oproti kontrole s hodnotou $p < 0,07$

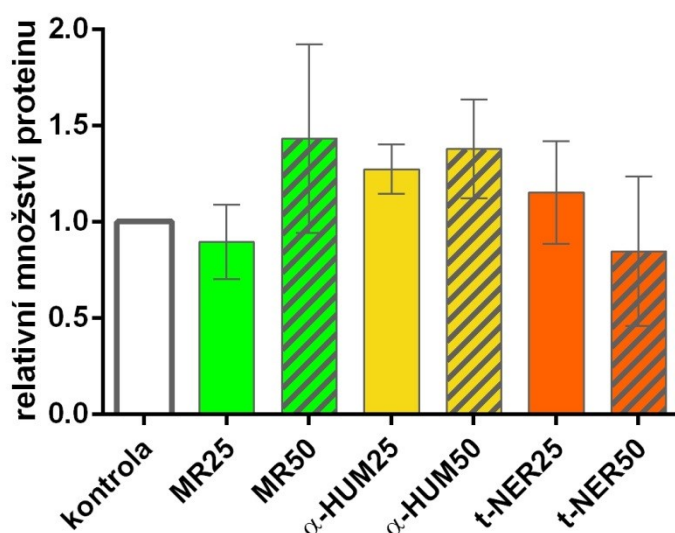
Množství bílkoviny GR bylo u buněk Caco-2 ovlivněných seskviterpeny či silicí *M. rubra* vyšší než u kontrolního vzorku. Statisticky významný nárůst ($p < 0,05$) byl pozorován u buněk kultivovaných v prostředí MR25 a α -HUM50, přičemž u α -HUM25, t-NER25 a t-NER50 byla hodnota statistické významnosti p jen o něco málo větší (do 0,07).

5.4.3 Katalasa (CAT)

V tabulce 24 lze vidět zprůměrované relativní hodnoty bílkoviny CAT ze všech stanovení vzhledem ke kontrolnímu vzorku a jejich směrodatné odchylky. Níže pak (Obr. 25) grafické vyjádření.

Tabulka 24 – relativní množství bílkoviny CAT

Vzorky	Relativní množství proteinu	Směrodatná odchylka
K	1,000	0
MR25	0,895	0,194
MR50	1,432	0,489
α -HUM25	1,273	0,128
α -HUM50	1,377	0,257
t-NER25	1,152	0,268
t-NER50	0,846	0,388



Obrázek 25 – relativní množství bílkoviny CAT

U buněk Caco-2 ovlivněných seskviterpeny či silicí *M. rubra* nebyla pozorována žádná statisticky významná změna množství bílkoviny CAT vzhledem ke kontrolnímu vzorku.

6 Diskuse

Kolorektální karcinom, maligní nádor vznikající z buněk epitelu tlustého střeva a konečníku (pro jehož studium jsme použili model proliferujících Caco-2 buněk), patří mezi nejčastější onkologické diagnózy a jeho incidence ve všech vyspělých státech neustále narůstá. Česká republika navíc v mezinárodním srovnání obsazuje přední místa (www.kolorektum.cz). Současně užívaná chemoterapeutika nejsou pro své nežádoucí účinky a narůstající rezistenci nádorových buněk ideální. Proto existuje snaha pátrat po nových alternativních látkách z přírodních zdrojů, které by se mohly použít k léčbě buď samostatně, nebo v kombinaci se současně existující terapií, a tak podpořit její účinnost a snížit její nežádoucí účinky. Úspěšným příkladem využití rostlinných zdrojů k léčbě nemocí může být terapie malárie artemisininem či užití taxolu v léčbě rakoviny.

Zajímavým potenciálním zdrojem účinných látek by mohl být čínský strom *Myrica rubra*. Plody a kořeny tohoto stromu jsou důležitou součástí tradiční čínské medicíny již více jak 2000 let. U extraktů z něj byly zjištěny značné antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, protialergické, antibakteriální i hypolipidemické účinky. Co se týče protirakovinného účinku, extrakty z *Myrica rubra* inhibovaly růst množství nádorových buněčných linií, např. HeLa, PC3, P-388, MCF-7, A549, Bre-04, Lun-06, Neu-04 SGC7901, AGS, BGC823 (Sun C. et al. 2013, Jiao et Zhang 2016, Wang et al. 2016). Langhasová et al. (2014) se rozhodli zkoumat antiproliferativní účinky silice tohoto čínského stromu na nádorové buněčné linie lidských střev. Po 72 h expozici zjistili inhibici růstu buněk SW480, SW620, HT29, HCT8 a Caco-2, přičemž posledně jmenovaná byla nejcitlivější (IC_{50} 30-49 $\mu\text{g/ml}$). Testovali také efekt hlavní složky α -HUM na Caco-2, kde zjistili IC_{50} kolem 30 $\mu\text{g/ml}$. Ambrož et al. (2015) pak zkoumali antiproliferační účinky na Caco-2 několika jednotlivých seskviterpenů obsažených v této silici, přičemž inhibičně na růst působil β -karyofylenoxid, α -HUM, t-NER a valencen. Klímová (2015) ve své diplomové práci zabývající se střevními nádorovými buňkami zjistila, že z výše zmíněných seskviterpenů α -HUM a t-NER zvyšovaly nejvíce tvorbu ROS. Ambrož et al. (2016) objevili u linií Caco-2 silný prooxidativní účinek SMR na nádorové buňky a synergismus této silice ve vyšších koncentracích s doxorubicinem (zvýšením jeho koncentrace v nádorových buňkách), přičemž v nerakovinných buňkách SMR toxicitu doxorubicinu nezvýšila. Sun J. et al. (2016) pak mimochodem zjistili *in vivo* na myších, že flavanoid myricitrin z kůry *M. rubra* má silný antioxidační účinek, kterým snižuje kardiotoxický účinek doxorubicinu.

V naší práci jsme chtěli zjistit, jestli když dochází v buňkách po inkubaci s SMR, α -HUM a t-NER ke zvýšené tvorbě ROS, jsou současně ovlivněny aktivity antioxidantních obranných enzymů v nádorové buněčné linii Caco-2. Aktivitu NQO1 jsme zaznamenali ani u kontrolních linií a tento enzym tedy není u buněk Caco-2 vůbec aktivní ani přítomný, jak ostatně potvrzuje i Mayor-López et al. (2014).

Významnější změny byly objeveny pouze u dvou enzymů. Glutathionreduktasa vykazovala u vzorků MR25, MR50 a t-NER-50 signifikantní zvýšení aktivity, zároveň docházelo k její zvýšené expresi a množství enzymového proteinu bylo také vyšší. Buňky Caco-2 se tedy snažily oxidačnímu stresu bránit vyšší dostupností GSH, jež hraje klíčovou roli v obraně proti ROS. V nádorových buňkách obecně nacházíme vyšší množství GSH způsobené vyšší aktivitou GR (Couto et al. 2016). Ovšem Auterská (2016) ve své diplomové práci u prsních nádorových buněk MCF-7 ovlivněných α -HUM a t-NER nezjistila žádnou změnu aktivity GR. Také seskviterpen alantolakton indukoval apoptózu buněk HepG2 přes depleci GSH a tvorbu ROS, přičemž množství proteinu GR zůstalo nezměněné (Khan et al. 2013). Nakamura et al. (2014) u potkaních hepatocytů kultivovaných se seskviterpenem zerumbonem zjistili zvýšenou expresi GR. Seskviterpenické laktony izolované z *Helenium aromaticum* a *Telekia speciosa* také zvýšily v myších játrech aktivitu GR (Jodynis-Liebert et al. 2000). I silice *Artemisia scoparia*, která v kořenových buňkách vyvolávala generaci ROS buněčnou smrt, zvyšovala aktivitu GR (Kaur et al. 2012).

U glutathionperoxidasy nebyla aktivita změněna, ovšem genová exprese GPx7 byla u všech vzorků (kromě t-NER50) signifikantně snižena a množství proteinu GPx7 bylo signifikantně sniženo u poloviny vzorků (α -HUM50, t-NER25 a t-NER50). GPx7 postrádá glutathion peroxidasovou aktivitu a funguje v buňce jako stresový senzor. Studie GPx7 v rakovinných buňkách ukazují na její ochrannou roli proti oxidativnímu stresu. Vyřazení její aktivity u prsních nádorových buněk indukuje buněčnou smrt a podobně u jícnového adenokarcinomu mají nádorové buňky s exprimovanou GPx7 signifikantně zvýšenou životaschopnost a v menší míře u nich dochází k apoptóze po expozici H_2O_2 (Chen et al. 2016). Testované látky tedy do jisté míry u Caco-2 narušovaly buněčnou odpověď vůči ROS. U zdravých buněk tomu bylo naopak, flavonoid naringenin v lidských bronchiálních epiteliálních buňkách zvýšil expresi několika izoform GPx, vč. izoformy 7 (Podder et al. 2014), stejně jako

v játrech myši, jímž byl podáván po dva týdny flavonoid epigalokatechin galát (James et al. 2015).

Ostatní antioxidační enzymy (GST, CAT a SOD) nevykazovaly signifikantní zvýšení, ani inhibici jejich aktivity po ovlivnění seskviterpeny (pouze jediný vzorek – MR50 u CAT vykázal signifikantní navýšení). Stejně tak nebyla ovlivněna jejich exprese a množství proteinu CAT zůstalo oproti kontrolní linii nezměněno. Auterská (2016) u buněk MCF-7 ovlivněných α -HUM a t-NER zaznamenala zvýšenou aktivitu SOD, zatímco u GST došlo ke snížení a u aktivity CAT nenastaly žádné změny, podobně jako v našem případě. Pokorná (2014) zjistila u Caco-2 u několika anthokyanidinů také inhibici aktivity GST. Naopak hexanová frakce extraktu *Inula helenium* obsahující seskviterpeny indukovala aktivitu GST u buněk myšního hepatocelárního karcinomu Hepalcl7 (Kim et al. 2006) a seskviterpenický lakton parthenolid vyvolal nadměrnou expresi GST- π u nádorových buněk (Wen et al. 2002). Potkaní hepatocyty (RL34) po kultivaci se seskviterpenem zerumbonem vykazovaly také vyšší aktivitu GST (vč. zvýšeného množství enzymového proteinu), zatímco jeho redukovaná analoga α -HUM a 8-hydroxy- α -HUM neprokázaly žádný indukční efekt (Nakamura et al. 2004). Silice *Chenopodium ambrosioides* u buněk MCF-7 snížila aktivitu SOD a zvýšila aktivitu CAT (Jia-liang et al. 2013). Silice korejského ženšenu v buňkách HepG2 zvýšila CAT, ale i SOD (Bak et al. 2012). Seskviterpen zederon v myších játrech aktivitu SOD zvýšil, zatímco aktivita CAT nebyla změněna (Pimkaew et al. 2013). Mykotoxin alternariol indukoval u Caco-2 silný oxidační stres produkcí ROS, přičemž aktivita SOD byla stimulována, naopak aktivita CAT byla snížena (Fernández-Blanco et al. 2014). Silice *Artemisia scoparia* v kořenových buňkách vyvolávala buněčnou smrt generující ROS, přičemž aktivity SOD a CAT byly zvýšené (Kaur et al. 2012). Seskviterpenické laktony izolované z *Helenium aromaticum* a *Telekia speciosa* v myších játrech zvýšily aktivitu CAT, ale aktivita SOD byla výrazně snížena (Jodynis-Liebert et al. 2000).

Většina účinků seskviterpenů (ať už pozitivních či nežádoucích) je založena na jejich antioxidačních a zároveň prooxidačních účincích a není jednoduché jednoznačně předpovědět jejich celkový dopad. Seskviterpeny mohou účinkovat jako antioxidanty, nebo mohou podporovat oxidativní stres anebo mohou mít za určitých fyziologických či patofyziologických podmínek obojí roli. Nutno dodat, že mnohá xenobiotika, oxidační činidla, peroxidy, UV záření a těžké kovy koordinovaně indukují

expresi podobných genů, jaká je pozorována u antioxidantů. Tato indukce vždy zahrnuje antioxidant/elektrofil responzivní elementy (ARE/EpRE) nacházejících se v promotorech příslušných genů. Ve výsledku dochází k aktivaci mnoha genů buněčné obrany a selhání tohoto mechanismu či nedostatečná odpověď vede k akumulaci ROS a oxidativnímu stresu, poškození DNA a membrány, až k možné buněčné smrti. Výsledný účinek terpenů a jeho významnost tedy závisí na vlastnostech různých radikálů zapojených v celém procesu, na prostředí a na momentálním redoxním stavu buňky. Je také leckdy těžké určit, který jev je příčinou a který důsledkem. Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a vyřazení antioxidantního obranného systému jasně potencuje jeden druhého, takže oba mechanismy mohou být klasifikovány jako příčina či důsledek ve stejném čase (Bartíková et al. 2014, Matés 2000).

Obecně seskviterpeny indukují oxidativní stres buď generováním ROS (přímo), podporou jejich vzniku (nepřímo) nebo inhibicí antioxidantního obranného systému. Co se týče antioxidantních účinků seskviterpenů, může docházet k přímému zneškodňování ROS (scavenging efekt), kdy jsou stabilizovány chemickou redukcí, resp. dodáním elektronů radikálům (např. α -HUM nevykázal žádný scavenging efekt, zatímco cis-nerolidol byl schopen pohlcovat hydroxylový radikál). Fentonova a jí podobné reakce mohou být potlačovány přímou chelatací kovových iontů. Další možností antioxidantního působení je indukce antioxidantní odpovědi a potlačení zánětu. Bylo zjištěno, že seskviterpeny účinkují rozdílně v nádorových a v normálních buňkách. Příkladem může být parthenolid, jenž se v normálních epiteliálních prostatických buňkách (PrEC) choval jako antioxidant zvyšující koncentraci glutathionu (GSH), zatímco v prostatických rakovinných buňkách PC-3 indukoval oxidativní stres. Zesílený prooxidantní účinek v nádorových buňkách a zvýšení ROS nad tolerovaný limit tak může dávat naději k využití seskviterpenů jako slibných protirakovinných léků. Užití seskviterpenů spolu s dostupnými léky může zvýšit jejich účinek, např. kombinace furanodienů s tamoxifenem a furanodienů s paklitaxelem prokázaly synergii (Bartíková et al. 2014, Lee et al. 2013).

Co se týče korelace výsledků aktivit enzymů, genetické exprese a množství enzymových proteinů, námi zjištěné výsledky do jisté míry odpovídaly. Nebylo však dosaženo vzájemné shody vždy u všech vzorků, spíše bylo možné vysledovat jakýsi trend. Neboť množství transkriptu nemusí být dobrým ukazatelem množství proteinu, stejně jako množství proteinu nemusí být dobrým prediktorem enzymové aktivity

a měření na jedné úrovni biologické funkce dává pouze omezený vhled do toho, jak buněčný systém funguje. Množství proteinu nezávisí pouze na hodnotách transkripce (jen asi 40% změny v množství proteinu může být vysvětleno známostí množství mRNA), ale také na stabilitě transkriptu, míře translace a proteinové degradace. U savčích buněk je míra transkripce nižší než translace. Savčí buňka produkuje dvě kopie dané mRNA za hodinu, zatímco vyprodukuje za stejnou dobu na tučet kopií korespondujícího proteinu z mRNA. Podobně mRNA jsou méně stabilní než proteiny a jejich průměrný poločas se pohybuje mezi 2,6 a 7 hodinami oproti 46 hodinám u proteinů. Míra shody tedy závisí na organismu, na typu genu či proteinu a na časovém rozmezí. Transkripční data mohou být ale velmi dobrým ukazatelem, zda lze očekávat v buňce přítomnost daného proteinu či nikoliv. Vlastnosti a biologická aktivita proteinů závisí na jejich aminokyselinové sekvenci a výsledné 3D struktuře. Co je však důležité, jejich biologická aktivita je modifikována a řízena procesy jako je diferenciální sestřih, proteolýza, subcelulární lokalizace, shromažďování do komplexů, post-translační modifikace (např. thiolová redukce, fosforylace, acetylace či glykosylace) a hladinami substrátů a efektorů. Post-translační modifikace ovlivňují jak katalytickou aktivitu, tak interakci s jinými proteiny, subcelulární lokalizaci a stabilitu. Aktivita enzymů závisí také na teplotě, koncentraci iontů či pH a je tedy potřeba zkoušky aktivit enzymů vykonávat za optimalizovaných podmínek. V tomto případě mohou být stanovení aktivit do jisté míry ukazatelem proteinového množství (Stitt a Gibon 2014, Vogel a Marcotte 2012).

Z námi zjištěných výsledků enzymových aktivit, množství transkriptu a proteinu můžeme vyvodit, že proliferující buňky Caco-2 se vůči ROS vyvolanými SMR a seskviterpeny bránily pouze zvýšením redukováného glutathionu (zvýšením GR) a že jejich účinná obranná funkce vůči ROS byla narušena snížením GPx7. Ovlivnění antioxidantních enzymů SMR a vybranými seskviterpeny u této nádorové linie tedy nemá jednoznačné důsledky.

7 Závěr

Byl zaznamenán nárůst aktivity antioxidantních enzymů proliferujících nádorových buněk Caco-2 u GR, přičemž signifikantní byl u vzorků ovlivněných 24 hodin silicí *M. rubra* (MR) v obou koncentracích (25 a 50 µg/ml) a trans-nerolidolem (t-NER) o koncentraci 50 µg/ml. U enzymu CAT byl signifikantní nárůst pouze u vzorku ovlivněného silicí MR o koncentraci 25 µg/ml. Aktivity antioxidantních enzymů GPx, GST a SOD ovlivněných silicí MR, α-humulénem (α-HUM) či t-NER zůstaly nezměněny. Aktivita NQO1 nebyla vůbec detekována, a to ani u kontrolních vzorků.

U enzymu GPx7 bylo detekováno snížení genové exprese u všech vzorků. U GR bylo zjištěno naopak zvýšení exprese u všech vzorků, jen u MR50 nebylo signifikantní. Genová exprese antioxidantních enzymů GST, SOD a CAT zůstala nezměněna.

Změna množství enzymového proteinu byla objevena u GPx7 a GR. Co se týče GPx7, u vzorků α-HUM50, t-NER25 a t-NER50 došlo k signifikantnímu snížení, což by částečně korelovalo se snížením exprese tohoto enzymu. U množství GR byl pozorován signifikantní nárůst u vzorků MR25 a α-HUM50, za zmínku by mohl stát také nárůst u vzorků α-HUM25, t-NER25 a t-NER50, který ale nebyl prokázán jako statisticky signifikantní. Tato zjištění nám opět víceméně korelují s výsledky ovlivnění genové exprese a navíc s nárůstem aktivity GR u některých vzorků.

Proliferující buňky Caco-2 se tedy vůči ROS vyvolanými silicí MR, α-HUM či t-NER bránily jen zvýšením aktivity GR a jejich obranná funkce vůči ROS byla oslabena snížením GPx7. Ovlivnění antioxidantních enzymů vybranými seskviterpeny nepřineslo jednoznačné důsledky.

8 Použité zkratky

α -HUM – α -humulen

α -HUM25 – buňky ovlivněné 24 h α -humulenem o koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$

α -HUM50 – buňky ovlivněné 24 h α -humulenem o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$

A-549 – lidský plicní adenokarcinom

A2780 – buňky lidského ovariálního karcinomu

AA – akrylamid

ACHN – lidské jaterní adenokarcinomové buňky

APS – peroxodisíran amonný (amonium persulfát)

B2M – beta-2-mikroglobulin

BCA – bicinchoninová kyselina (bicinchoninic acid)

bisAA – N,N'-methylen-bisakrylamidu

BSA – bovinní sérový albumin

C32 – lidské amelanotické melanomové buňky

CAT – katalasa

cDNA – jednořetězcová (complementary) DNA

CDNB – 1-chloro-2,4-dinitrobenzen

CYP – cytochrom P450

DEPC – voda diethyl-pyrokarbonátem ošetřená redestilovaná voda

DLD-1 – lidský kolorektální adenokarcinom

DMAPP – dimethylallylpyrofosfát

DMSO – dimethylsulfoxid

DTT – dithiotreitol

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EGTA – ethylen-glykol-bis(β -aminoethylether)-tetraoctová kyselina

GAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa

GPx – glutathionreduktasa

GR – glutathionreduktasa

GSH – glutathion

GSSG – glutathiondisulfid

GST – glutathion-S-transferasa

HeLa – lidský cervikální karcinom

HepG2 – buňky hepatocelulárního karcinomu

HT29 – lidský adenokarcinom tračníku
IC₅₀ – koncentrace nutná k inhibici biologického procesu o polovinu
IPP – isopentenylpyrofosfát
K – kontrolní vzorek
LNCaP – lidský hormon dependentní karcinom prostaty
MCF-7 – lidský adenokarcinom prsu
MR25 – buňky ovlivněné 24 h silicemi z *Myrica rubra* o koncentraci 25 µg/ml
MR50 – buňky ovlivněné 24 h silicemi z *Myrica rubra* o koncentraci 50 µg/ml
NADH – nikotinamidadenindinukleotid
NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NQO1 – NAD(P)H Chinonoxidoreduktasa 1
PAGE – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PBS – fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PC-3 – lidský adenokarcinom prostaty
PCR – polymerasová řetězová reakce
PMSF – fenylmethansulfonyl fluorid
RIN – číslo integrity RNA
ROS – reaktivní formy kyslíku
RT – reverzní transkriptasa
SDS – dodecylsírán sodný
SMR – silice (esenciální olej) z listů *Myrica rubra*
SOD – superoxiddismutasa
t-NER – trans-nerolidol
t-NER25 – buňky ovlivněné 24 h trans-nerolidolem o koncentraci 25 µg/ml
t-NER50 – buňky ovlivněné 24 h trans-nerolidolem o koncentraci 50 µg/ml.
TEMED – tetramethylethylendiamin
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan
V79 – buňky křeččího plicního fibroblastu
WB – western blotting
ZN – zhoubný nádor

9 Literatura, zdroje

Agilent 2100 Bioanalyzer: 2100 Expert User's Guide – Institute of hydrobiology, Chinese academy of sciences [online]. Waldbronn Germany: Agilent Technologies, 2006 [cit. 2017-01-11]. Dostupné z: http://www.ihb.ac.cn/fxcszx/fxc_sxgz/201203/P020120322529861139260.pdf.

Akazawa H., Fujita Y., Banno N., Watanabe K., Kimura Y., Manosroi A., Manosroi J. a Akihisa T. (2010) Three new cyclic diarylheptanoids and other phenolic compounds from the bark of *Myrica rubra* and their melanogenesis inhibitory and radical scavenging activities. *Journal of Oleo Science*, Vol. 59(4), str. 213-221.

Aksoy Y., Balk M., Ögüs H a Özer N. (2004) The mechanism of inhibition of human erythrocyte catalase by azide. *Turkish Journal of Biology*, Vol. 28, str. 65-70.

Alajmi M. F., Al-Hadiya B. M. a El Tahir K. E. (2013) Pharmacological studies on *Myrica rubra* Sieb et zucc. Effects on the cardiovascular system and platelets. *Drug Research*, Vol. 63, str. 439-444.

Alberts B. (1998) *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*, 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, ISBN 80-902-9062-0, str. 332-335.

Ambrož M., Boušová I., Skarka A., Hanušová V., Králová V., Matoušková P., Szotáková B. a Skálová L. (2015) The influence of sesquiterpenes from *myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules*, Vol. 20, str. 15343-15358.

Ambrož M., Hanušová V., Skarka A., Boušová I., Králová V., Lanhasová L. a Skálová L. (2016) Essential oil from *Myrica rubra* leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. *Planta medica*, Vol. 82(01/02), str. 89-96.

Auterská Lenka (2016): Vliv vybraných seskviterpenů na biotransformační a antioxidační enzymy v hepatocytech a v nádorové buněčné linii MCF-7. Diplomová práce. Katedra biochem. věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 81 stran.

Bajak E., Fabbri M., Ponti J., Gioria S., Jiménez I. O., Collotta A., Mariani V., Gilliland D., Rossi F. a Gribaldo L. (2015) Changes in Caco-2 cells transcriptome profiles upon exposure to gold nanoparticles. *Toxicology Letters*, Vol. 233(2), str. 187–199.

- Bak M. J., Jun M. a Jeong W. S. (2012) Antioxidant and hepatoprotective effects of the Red Ginseng essential oil in H₂O₂-treated HepG2 cells and CCl₄-treated mice. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 13, str. 2314-2330.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. a Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46, str. 446–475.
- Bartíková H., Hanušová V., Skálová L., Ambrož M. a Boušová I. (2014) Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, Vol. 14(21), 17 str.
- Braca A., Siciliano T., D'Arrigo M. a Germanò M. P. (2008) Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*, Vol. 79, str. 123–125.
- Carlberg I. a Mannervik B. (1985) Glutathion reductase. *Methods in enzymology*, Vol. 113, str. 484–490.
- Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E. (eds.) (1997) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (NY). Overview of Reverse Transcript. ISBN: 0-87969-571-4.
- Couto N., Wood J. a Barber J. (2016) The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 95, str. 27–42.
- Dai G. H., Meng G. M., Ton Y. L. Chen X., Ren Z. M., Wang K., Yang F. (2014) Growth-inhibiting and apoptosis-inducing activities of myricanol from the bark of *Myrica rubra* human lung adenocarcinoma A549 cells. *Phytomedicine*, Vol. 21 (11), str. 1490-1496.
- El Hadri A., del Rio M. A. G., Sanz J., Coloma A. G., Idaomar M., Ozonas B. R., Gonzalez J. B. a Reus M. I. S. (2010) Cytotoxic activity of α -humulene and trans-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, Vol. 76, str. 343–356.
- El-Missiry M. A. (ed.) (2012) *Antioxidant Enzyme*. InTech, Croatia, ISBN 978-953-51-0789-7, 410 stran.
- Engle M. J., Goetz G. S., Alpers D. H. (1998) Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 174, str. 362-369.

- Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser, S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D. M., Forman D., Bray F. (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [online]. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France). Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr>.
- Fernández-Blanco C., Font G., Ruiz M. J. (2014) Oxidative stress of alternariol in Caco-2 cells. *Toxicology Letters*, Vol. 229, str 458–464.
- Ferreira F. M., Palmeira C. M., Oliveira M. M., Santos D., Simões A. M., Rocha S. M., Coimbra M. A. a Peixoto F. (2012) Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicology in Vitro*, Vol. 26, str. 189–196.
- Fitzsimmons S. A, Workman P., Grever M., Paull K., Camalier R., Lewis A.D. (1996) Reductase enzyme expression across the National cancer institute tumor cell line panel: Correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 88(5), str. 259-269.
- Flohé L., Günzler W. A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, Vol. 105, str. 114-121.
- Fogh J., Wright W. C., Loveless J. D. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 58, str. 209–214.
- Fridovich I. (1997) Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, str. 18515-18517.
- Góth L. (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinics Chimica AC*, Vol. 196, str. 143-152.
- Govindarajan M. a Benelli G. (2016) α -Humulene and β -elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, Vol. 115(7), str. 2771-2778.
- Guerriero E., Capone F., Accardo M., Sorice A., Costantini M., Colonna G., Castello G. a Costantini S. (2015) GPX4 and GPX7 over-expression in human hepatocellular carcinoma tissues. *European Journal of Histochemistry*, Vol. 58:2540, str. 5-10.
- Halliwell B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, Vol. 141, str. 312–322.

Hames B. D. (ed.) (1998) Gel electrophoresis of proteins: a practical approach, Vol. 197, OUP Oxford, ISBN 0-19-963641-9, str. 1-14.

Hanušová V., Skálová L., Ambrož M., Králová V., Langhasová L. a Matoušková P. (2015) The effect of *Myrica rubra* essential oil and its components α -humulene and trans-nerolidol on adhesion and apoptosis of colorectal cancer cells. *Cancer Cell & Microenvironment*, Vol. 2, 10 str.

He K., Li X., Xiao Y., Yong Y., Zhang Z., Li S., Zhou T., Yang D., Gao P. a Xin X. (2016) Hypolipidemic effects of *Myrica rubra* extracts and main compounds in C57BL/6j mice. *Food & Function*, Vol. 7(8), str. 3505-3515.

He X. H., Chen L. G., Asghar S. a Chen Y. (2004) Red bayberry (*Myrica rubra*), a promising fruit and forest tree in China, *Journal of the American Pomological Society*, Vol. 58(3), str 163-168.

Chan W. K., Tan L. T., Chan K. G., Lee L. H. a Goh B. H. (2016) Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*, Vol. 21, str. 529.

Chelikani P., Ramana T. a Radhakrishnan T. M. (2005) Catalase: a repertoire of unusual features. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, Vol. 20, str. 131-135.

Chen K., Xu C., Zhang B. a Ferguson I. B. (2004) Red bayberry: Botany and horticulture. *Horticultural reviews*. - Bind 30, ed. Janick J., Hoboken, NJ: Wiley, str. 83-112. ISBN 0471354201.

Chen Y., Wei P., Hsu J., Su F. a Lee W. (2016) NPGPx (GPx7): a novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. *American Journal of Translational Research*, Vol 8(4), str. 1626-1640.

Ioannides C. (ed.) (2001) *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, ISBN: 0-470-84630-5.

Jahn K. A., Biazik J. M. a Braet F. (2010) GM1 Expression in Caco-2 cells: Characterisation of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 100(9), str. 3751-3762.

James K. D., Forester S. C. a Lambert J. D. (2015) Dietary pretreatment with green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces the bioavailability and hepatotoxicity

of subsequent oral bolus doses of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 76, str. 103–108.

Jia-liang W., Dan-wei M., Ya-nan W., Hong Z., Bing H., Qun L., Zhi-yan Z. a Jing F. (2013) Cytotoxicity of essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L against human breast cancer MCF-7 cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, Vol. 12(6), str. 929-933.

Jiao D. a Zhang X. (2016) Myricetin suppresses p21-activated kinase 1 in human breast cancer MCF-7 cells through downstream signaling of the β -catenin pathway. *Oncology Reports*, Vol. 36, str. 342-348.

Jodynis-Liebert J., Murias M. a Błozczyk E. (2000) Effect of sesquiterpene lactones on antioxidant enzymes and some drug-metabolizing enzymes in rat liver and kidney. *Planta Medica*, Vol. 66(3), str. 199-205.

Kaur S., Singh H. P., Batish D. R. a Kohli R. K. (2012) *Artemisia scoparia* essential oil inhibited root growth involves reactive oxygen species (ROS)-mediated disruption of oxidative metabolism: In vivo ROS detection and alterations in antioxidant enzymes. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 44, str. 390–399.

Keawsa-ard S. a Kongtaweelert S. (2012) Antioxidant, antibacterial, anticancer activities and chemical constituents of the essential oil from *Mesua ferrea* leaves. *Chiang Mai Journal of Science*, Vol. 39(3), str. 455-463.

Khan M., Li T., Khan M. K. A., Rasul A., Nawaz F., Sun M., Zheng Y. a Ma T. (2012) Alantolactone induces apoptosis in HepG2 cells through GSH depletion, inhibition of STAT3 activation, and mitochondrial dysfunction. *BioMed Research International*, Vol. 2013, 11 str.

Kim J. R., Lim H. A., Jang Ch. H., Kim J. H., Kim Y. K., Konishi T., Park J. H. Y. P. a Kim J. S. (2006) Induction of detoxifying enzyme by sesquiterpenes present in *Inula helenium*. *IUFoST 13th World Congress of Food Science & Technology*, DOI: 10.1051/IUFoST:20060786.

Klímová Pavlína (2015): Antiproliferační účinek oleje z voskovníku červeného. Diplomová práce. Katedra biochem. věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 68 stran.

- Lan Y. H., Wu Y. C., Wu K. W., Chung J. G., Lu C. C., Chen Y. L. Wu T. S., Yang J. S. (2011) Death receptor 5-mediated TNFR family signaling pathways modulate γ -humulene-induced apoptosis in human colorectal cancer HT29 cells. *Oncology Reports*, Vol. 25, str. 419-424.
- Langhasová L., Hanušová V., Rezek J., Stohanslová B., Ambrož M., Králová V., Vaněk T., Lou J. D., Yun Z. L., Yang J. a Skálová L. (2014) Essential oil from *Myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines, *Industrial Crops and Products*, Vol. 59, str. 20-26.
- Lapczynski A., Bhatia S. P., Letizia C. S. a Api A. M. (2008) Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46, str. 247-250.
- Lee W. L., Huang. J. Y., Shyu L. F. (2013) Phytoagents for cancer management: Regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2013, 22 str.
- Legault J., Dahl W., Debiton E., Pichette A. a Madelmont J. C. (2003) Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica*, Vol. 69, str. 402–407.
- Legault J. a Pichette A. (2007) Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 59(12), str. 1643–1647.
- Li X. a He Y. (2006) Non-destructive measurement of acidity of Chinese bayberry using Vis/NIRS techniques. *European Food Research and Technology*, Vol. 223, str. 731.
- Linxiang Y. a Yuesheng Z. (2001) Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*, Vol. 22(12): 1987-1992.
- Livak K. J. a Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, Vol. 25: 402-408.
- Loizzo M. R., Tundis R., Menichini F., Saab A. M., Statti G. A. a Menichini F. (2007) Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Research*, Vol. 27, str. 3293-3300.

Matés J. M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, Vol. 153, str. 83–104

Mayor-López L., Tristante E., Carballo-Santana M., Carrasco-García E., Grasso S., García-Morales P., Saceda M., Luján J., García-Solano J., Carballo F., de Torre C. a Martínez-Lacaci I (2014) Comparative study of 17-AAG and NVP-AUY922 in pancreatic and colorectal cancer cells: Are there common determinants of sensitivity? *Translational oncology*, Vol. 7(5), str. 595.

Meister A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, str. 17205-17208.

Nakamura Y., Yoshida Ch., Murakami A., Ohigashi H., Osawa T. a Uchida K. (2004) Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, activates phase II drug metabolizing enzymes. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, Vol. 572, str. 245-250.

Nam D. K., Lee S., Zhou G., Cao X., Wang C., Clark T., Chen J., Eowley J. D. a Wang S. M. (2002) Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 99, str. 6152–6156.

NanoDrop Products: T042-TECHNICAL BULLETIN - NanoDrop Spectrophotometers [online]. Wilmington, Delaware USA: Thermo Fisher Scientific – NanoDrop Products, 2011 [cit. 2017-01-10]. Dostupné z: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>.

Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. (2006) Quantification of mRNA using real time RT-PCR. *Nature protocols* 1, str. 1559-1582.

Paduch R., Kandefer–Szerszeń M., Trytek M. a Fiedurek J. (2007) Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, Vol. 55, str. 315–327.

Pereira F. G., Marquete R., Leite K. O., Cabral O. V., May B., Mansur E. a Moreira D. L. (2017) Anatomical aspects, chemical analysis and cytotoxic effect of the essential oil from leaves of *Casearia arborea* (Salicaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Vol. 16(2), str. 99-109.

Péres V. F., Moura D. J., Sperotto A. R. M., Damasceno F. C., Caramão E. B., Zini C. A. a Saffi J. (2009) Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 47, str. 2389–2395.

Pimkaew P., Suksen K., Somkid K., Chokchaisiri R., Jariyawat S., Chuncharunee A., Suksamrarn A. a Piyachaturawat P. (2013) Zederone, a sesquiterpene from *Curcuma elata* Roxb, is hepatotoxic in mice. *International Journal of Toxicology*, Vol. 32(6), str. 454-462.

Podder B., Song H. Y. a Kim Y. S. (2014) Naringenin exerts cytoprotective effect against paraquat-induced toxicity in human bronchial epithelial BEAS-2B cells through NRF2 activation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 24(5), str. 605–613.

Pokorná Petra (2014): Vliv flavonoidů in vitro na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů ve střevních buněčných liniích. Diplomová práce. Katedra biochem. věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 75 stran.

Raut J. S. a Karuppayil S. M. (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, Vol. 62, str. 250–264.

Rogério A. P., Andrade E. L., Leite D. F. P., Figueiredo C. P. a Calixto J. B. (2009) Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene a-humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 158, str. 1074–1087.

Ross D., Kepa J. K., Winski S. L., Beall H. H., Anwar A. a Siegel D. (2000) NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 129, str. 77–97.

Rumlová M., Pačes V. a Ruml T. (2003) Základní metody genového inženýrství. JPM Tisk, Praha, ISBN 80-86313-12-3, str. 52-53.

Ryabchenko B., Tulupova E., Schmidt E., Wlcek K., Buchbauer G. a Jirovetz L. (2008) Investigation of anticancer and antiviral properties of selected aroma samples. *Natural Product Communications*, Vol. 3, str. 1085-1088.

Sarvmeili N., Jafarian-Dehkordi A. a Zolfaghari B. (2016) Cytotoxic effects of *Pinus eldarica* essential oil and extracts on HeLa and MCF-7 cell lines. *Research in Pharmaceutical Sciences*, Vol. 11(6), str. 476-483.

Sheibani E., Duncan S. E., Kuhn D. D., Dietrich A. M., O'Keefe S. F. (2016) SDE and SPME Analysis of Flavor Compounds in Jin Xuan Oolong Tea. *Journal of Food Science*, Vol. 61, str. 348-358.

Siegel D., Yan Ch. a Ross D. (2012) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 83, str. 1033–1040.

Simms, D. Cizdziel P. E. a Chomczynski P. (1993) TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, Vol. 15, str. 532-535.

Skálová L., Boušová I. (eds.) (2011) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum, Praha, ISBN 978-802-4619-170.

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

SOD Assay Kit-WST: Technical manual. Dojindo Molecular Technologies, inc. [online]. Japan: Dojindo Laboratories, 2011 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: <http://www.dojindo.com/store/p/203-SOD-Assay-Kit-WST.html>.

Sperotto A. R. M., Moura D. J., Péres V. F., Damasceno F. C., Caramão E. B., Henriques J. A. P. a Saffi J. (2013) Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 57, str. 57–68.

Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L. a Kašparová M. (2016) *Farmakognozie*. Karolinum, Praha, ISBN 978-80-246-3264-3, str. 267-276.

Steenackers B., Cooman L. a Vos D. (2015) Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry*, Vol. 172, str. 742–756.

Stitt M. a Gibon Y. (2014) Why measure enzyme activities in the era of systems biology? *Trends in Plant Science*, Vol. 19(4), str. 256-265.

Su Y. C., Hsu K. P., Li S. C. a Ho C. L. (2015) Composition, in vitro cytotoxicity, and anti-mildew activities of the leaf essential oil of *Machilus thunbergii* from Taiwan. *Natural Product Communications*, Vol. 10(11), str. 2013-2016.

Su Y. C. a Ho C. L. (2016) Composition of the leaf essential oil of *Phoebe formosana* from Taiwan and its in vitro cytotoxic, antibacterial, and antifungal activities. *Natural Product Communications*, Vol. 11(6), str. 845-8488.

Sun C., Huang H., Xu C., Li X. Chen K. (2013) Biological activities of extracts from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.): A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol. 68, str. 97–106.

Sun H., Chow E. C., Liu S., Du Y., Pang K. S. (2008). The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, Vol. 4(4), str. 395-411.

Sun J., Sun G., Cui X., Meng X., Qin M., Sun X. (2016) Myricitrin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by counteracting oxidative stress and inhibiting mitochondrial apoptosis via ERK/P53 pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2016, 16 str.

Sylvestre M., Legault J., Dufour D. a Pichette A. (2005) Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, Vol. 12, str. 299-304.

Tadjali M., Seidelin J. B., Olsen J., Troelsen J. T. (2002) Transcriptome changes during intestinal cell differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Vol. 1589(2), str. 160–167.

Thambi M. a Shafi M. P. (2016) Rhizome essential oil composition of zingiber cernuum and its anti microbial activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol. 7(2), str. 829-833.

ÚZISČR Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, Novotvary 2014, 170 stran. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/node/7686>.

Verhoeckx K., Cotter P., Expósito I. L., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D. a Wichers H. (2015) The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health: In Vitro and Ex Vivo Models. In: *Caco-2 Cell Line*. Springer Open, ISBN 978-3-319-15791-7, str. 103-111.

Vinholes J., Gonçalves P, Martel F., Coimbra M. A. a Rocha S. M. (2014) Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. *Food Chemistry*, Vol. 156, str. 204–211.

Vogel Ch. a Marcotte E. M. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 13(4), str. 227–232.

Wang Y., Zhang X., Xie W., Zheng Y., Cao J., Cao P., Chen Q., Li X. a Sun C. (2016) The growth of SGC-7901 tumor xenografts was suppressed by Chinese bayberry anthocyanin extract through upregulating KLF6 gene expression. *Nutrients*, Vol. 8(10), str. 599.

Wen J., You K. R., Lee S. Y., Song. C. H. a Kim D. G. (2002) Oxidative stress-mediated apoptosis: The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277(41), str. 38954–38964.

Wilce M. C. J. a Parker M. W. (1994) Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1205, str. 1-18.

Wong M. L. a Medrano J. F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, Vol. 39, str. 75-85.

www.kolorektum.cz – Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice – Screening kolorektálního karcinomu [online]. Poslední revize 12.2015 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr> a *Epidemiologie kolorektálního karcinomu v mezinárodním srovnání – Screening kolorektálního karcinomu* [online]. Poslední revize 12.2014 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-mezinarodnim-srovnani>.

www.neb.com – New England BioLabs [online]. [cit. 2017-01-23]. Dostupné z: <https://www.neb.com/products/m0303-dnase-i-rnase-free>.

www.sigmaaldrich.com – Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2017-01-23]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/detection-methods.html>.

Yang H., Ge Y., Sun Y., Liu D., Ye X. a Wu D. (2011) Identification and characterisation of low-molecular-weight phenolic compounds in bayberry (*Myrica*

rubra Sieb. et Zucc.) leaves by HPLC-DAD and HPLC-UV-ESIMS. Food Chemistry Vol. 128, str. 1128–1135.

Ye L. a Zhang Y. (2001) Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. Carcinogenesis, Vol. 22, str. 1987-1992.

Zajdlová Martina (2016): Působení trans-nerolidolu a valencenu na ovariální nádorové buňky. Diplomová práce. Katedra biochem. věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 63 stran.

Zhang X., Huang H., Zhang Q., Fan F., Xu C., Sun C., Li X. a Chen K. (2015) Phytochemical characterization of chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) of 17 cultivars and their antioxidant properties. International Journal of molecular Sciences Vol. 16, str. 12467-12481.

Zhang Y., Zhou X., Tao W., Li L., Wei C., Duan J, Chen S., Ye X. (2016) Antioxidant and antiproliferative activities of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves. Journal of Functional Foods, Vol. 27, str. 645–654.

Zhang Y., Chen S., Wei C., Chen J., Ye X. (2017) Proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves regulate lipid metabolism and glucose consumption by activating AMPK pathway in HepG2 cells. Journal of Functional Foods, Vol. 29, str. 217-225.

Zhong R. M., Xiao Z. J. a Zhang Z. M. (2013) Antimicrobial activity of *Myrica rubra* essential oil against five pathogenic food-borne bacteria. Advanced Materials Research, Vol. 781-784, str. 1646-1651.

Žáková Kateřina (2016): Působení alfa-humulenu a karyofylenoxidu na ovariální nádorové buňky. Diplomová práce. Katedra biochem. věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 72 stran.

Zdroje obrázků

Obrázek 1: Verhoeckx K., Cotter P., Expósito I. L., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D. a Wichers H. (2015) The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health: In Vitro and Ex Vivo Models. In: Caco-2 Cell Line. Springer Open, ISBN 978-3-319-15791-7, str. 103-111.

Obrázek 2: *www.kolorektum.cz – Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice – Screening kolorektálního karcinomu* [online]. Poslední revize 12.2015 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>.

Obrázek 3: Free great picture [online]. [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <http://maxpixel.freegreatpicture.com/Immo-Red-Fruit-Moai-Myrica-Rubra-Jan-Me-Madrono-1439749>.

Obrázek 4: Wikimedia Commons [online]. [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha-Caryophyllen.svg>.

Obrázek 5: Wikimedia Commons [online]. [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nerolidol_trans.svg.

Obrázek 6: *SOD Assay Kit-WST: Technical manual. Dojindo Molecular Technologies, inc.* [online]. Japan: Dojindo Laboratories, 2011 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: <http://www.dojindo.com/store/p/203-SOD-Assay-Kit-WST.html>.

Obrázek 7: Agilent 2100 Bioanalyzer Software.

Obrázek 9 a 10: QuantStudio 6 and 7 Flex Software.