UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií

Vliv vybraných polyfenolů na expresi isoforem miR-208 v buněčné linii H9c2

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Karolína Popelková
Studijní program:	B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
Rok:	2026

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne ..... *podpis bakaláře*

Poděkování

Mé poděkování patří hlavně školiteli prof. Mgr. Martinu Modrianskému, Ph.D. za jeho odborné vedení, znalosti, trpělivost při učení nových dovedností a ochotu být kdykoliv nápomocný. Děkuji také Mgr. Zdeňku Dostálovi, Ph.D. za pomoc při provádění experimentů, obohacující konzultace a povzbuzení při nezdarech. Vážím si také zaměstnanců Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty, kteří mi vždy poskytli odpovědi a praktické informace týkající se práce v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolína Popelková
Název práce	Vliv vybraných polyfenolů na expresi isoforem miR-208 v buněčné linii H9c2
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2026
Abstrakt	Polyfenoly vykazují kardioprotektivní účinky ovlivněním různých mechanismů ochrany buňky. Jednou z možností je regulace exprese miRNA s následnou modulací exprese cílových proteinů. Cílem práce bylo posoudit vliv čtyř vybraných polyfenolů na expresi miRNA-208a, která je specifická pro srdeční tkáň, a jejím cílovým proteinem je PDCD4 (Programmed Cell Death Protein). Výsledky ukázaly, že pouze taxifolin pravděpodobně snižuje expresi PDCD4 v buňkách H9c2 navýšením exprese miRNA-208a.
Klíčová slova	Polyfenoly, miRNA, PDCD4
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Karolína Popelková
Title	The Effect of Selected Polyphenols on the Expression of the miR-208 Isoforms in the H9c2 Cell Line
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine
Supervisor	Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph. D.
The year of presentation	2026
Abstract	Polyphenols demonstrate cardioprotective activity by influencing a variety of cell protective mechanisms. One of these mechanisms is regulation of miRNA with a downstream modulation of target proteins. Aim of this work was to evaluate the influence of four selected polyphenols on expression of miRNA-208a, which is considered specific for heart tissue and its target protein is PDCD4 (Programmed Cell Death Protein). Results show that only taxifolin could probably lower PDCD4 expression in H9c2 cells via increasing miRNA-208a expression.
Keywords	Polyphenols, miRNA, PDCD4
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD **1**

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY **2**

2.1 MikroRNA **2**

2.2 MiRNA-208 a její isoformy miRNA-208a a miRNA-208b **4**

2.3 Protein PDCD4 ..... **6**

2.4 Interakce miRNA-208 a PDCD4 ..... **7**

2.5 Buněčná linie H9c2 ..... **7**

2.6 Polyfenoly **8**

2.6.1 Klasifikace polyfenolů 9

2.6.2 Biologické účinky polyfenolů 9

2.6.3 Kvercetin 10

2.6.4 Taxifolin 12

2.6.5 Silybin 13

2.6.6 Dehydrosilybin 15

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **17**

3.1.Přístrojové vybavení a pomůcky **17**

3.2.Materiál **18**

3.2.1 Biologický materiál 18

3.2.2 Chemikálie 18

3.2.3 Roztoky 20

3.3 Metody **22**

3.3.1 Kultivace buněk H9c2 22

3.3.2 MTT test cytotoxicity 22

3.3.3 Lýza buněk pro přípravu celkových extraktů 23

3.3.4 Transfekce buněk 23

3.3.5 Stanovení celkových proteinů metodou BCA 23
3.3.6 SDS-PAGE elektroforéza, Western blot a imunodetekce.....24
3.3.7 Izolace RNA 25
3.3.8 Reverzní transkripce 25
3.3.9 Real-time kvantitativní PCR.....26
3.4 Výsledky.....27
3.4.1 MTT test cytotoxicity.....27
3.4.2 Western blot a imunodetekce.....30
3.4.3 RT-qPCR.....32
4. DISKUSE.....33
5. ZÁVĚR.....36
6. LITERATURA.....37
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 45

Cíle práce

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA, které regulují širokou škálu buněčných procesů. Ovlivněním exprese specifických cílových proteinů mohou miRNA hrát klíčovou roli ve vzniku kardiovaskulárních onemocnění a metabolického syndromu.

Cílem práce bude zhodnotit vliv kvercetinu, taxifolinu, silybinu a dehydrosilybinu na expresi proteinu PDCD4 a expresi isoformy miR-208a v buněčné linii H9c2, která slouží jako model kardiomyocytů.

Hlavními metodami experimentální části budou real-time PCR, fluorescenční detekce a imunodetekce.

1. ÚVOD

MikroRNA-208 (miRNA-208) je typ malé nekódující RNA, nacházející se v srdci, jejíž funkcí je posttranskripční regulace genové exprese (Lu & Thum, 2019). V souvislosti s kardiovaskulárními onemocněními působí remodelačně (Zhang & Xu, 2021) a kardioprotektivně. Právě kardioprotektivní funkce může být důsledkem interakce miRNA s proapoptickým proteinem Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4) (Wang et al., 2022). Zmíněný mechanismus je zkoumán v této práci.

V prevenci kardiovaskulárních chorob mají potenciál také polyfenoly, organické látky, vyskytující se hlavně jako metabolity rostlin, které mohou ovlivňovat i genovou expresi (Milenkovic et al., 2012).

V práci byl experimentálně testován vliv čtyř vybraných polyfenolických látek, kvercetinu, taxifolinu, silybinu a dehydrosilybinu. Bylo sledováno, zda se projeví změna na expresi miRNA-208a a také na expresi PDCD4 (Wang et al., 2022).

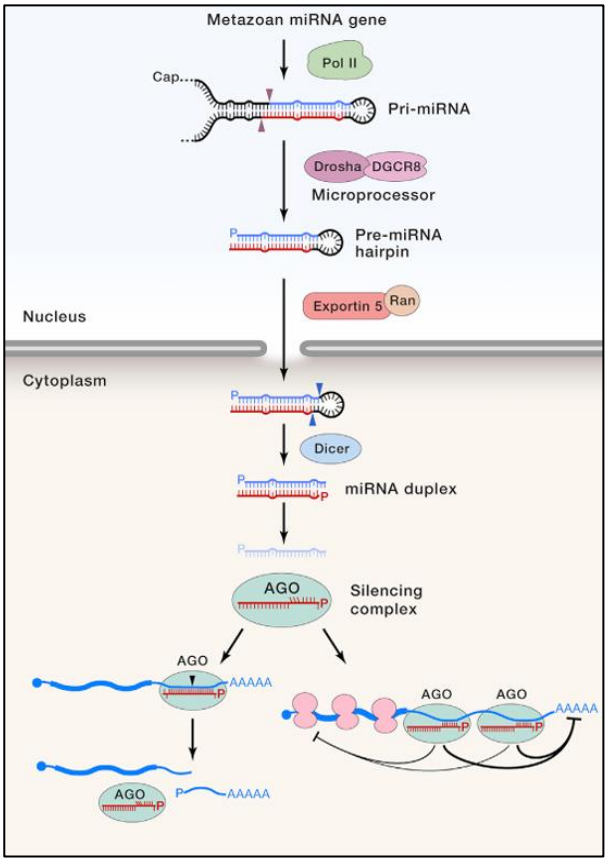
Jako *in vitro* model byla využívána buněčná linie H9c2, odvozená z buněk potkana (Kimes & Brandt, 1976). Pro vyhodnocení cytotoxických účinku byl využit test s 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidem (MTT), ke kvantifikaci sloužila metoda kvantitativní polymerázová řetězcová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-qPCR) a změny hladin proteinu PDCD4 byly detekovány metodou Western blot.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 MikroRNA

MikroRNA jsou malé, přibližně 20-22 nukleotidů dlouhé nekódující RNA, které ovlivňují genovou expresi na posttranskripční úrovni (Lu & Thum, 2019). Jejich existence byla poprvé dokázána u *Caenorhabditis elegans* v roce 1993 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). V roce 2001 byly tyto molekuly rozpoznány jako rozsáhlá skupina malých RNA u vyšších eukaryot (Lagos-Quintana et al., 2001), což vedlo k výzkumu jejich regulačních schopností.

Celý proces (obrázek 1) její biogeneze je zahájen v buněčném jádře, kde jsou transkribovány z genomové DNA primární řetězce pri-miRNA (Tian et al., 2024). Většina miRNA genů je přepisována RNA polymerázou II a podobně jako geny kódující proteiny nesou vzniklé pri-miRNA charakteristické znaky transkriptů polymerázy II, tedy 5′ čepičku a poly(A) konec (Lee et al., 2004). V jádře je molekula dále štěpena na kratší pre-miRNA struktury jaderným komplexem Microprocessor, jehož hlavní částí je



Obrázek 1:Schéma dráhy vzniku miRNA kanonickou biogenezí (převzato a upraveno z Bartel, 2018)

ribonukleáza III Drosha, společně se dvěma proteiny kritického regionu 8 DiGeorgova syndromu (DiGeorge Syndrome Critical Region 8 - DGCR8; Bartel, 2018). Pomocí proteinového přenašeče Exportinu 5 je 55-70 nukleotidů dlouhá pre-miRNA transportována do cytoplazmy přes jaderné póry (Shang et al., 2023).

V cytoplazmě zabezpečuje další zpracování evolučně konzervovaný enzymaticky aktivní komplex proteinů Dicer, který specificky štěpí dvouvláknové RNA (Bernstein et al., 2001). Dalším komplexem aktivním ve zpracování miRNA je transaktivací indukovaný RNA-vazebný protein (TRBP). Tento komplex vykazující aktivitu ribonukleázy III štěpí pre-miRNA do formy miRNA duplexu (Tian et al., 2024).

Dalším krokem je navázání miRNA duplexu do efektorového komplexu RISC (RNA-indukovaný umlčovací komplex), skládajícího se z Argonaute proteinů (Tian et al., 2024). Komplex RISC je zodpovědný za sekvenčně specifickou degradaci cílové mediátorové RNA (mRNA) (Hammond et al., 2000).

Po připojení zralého vodicího vlákna do Argonaute proteinu je z duplexu odstraněn pasivní „passenger“ vlákno (Tian et al., 2024). Vzniklý miRISC komplex pak vyhledává cílové transkripty, především prostřednictvím vazby miRNA na kanonické vazebné místo v 3´UTR nepřekládané oblasti mRNA. Nejdůležitější pozicí pro rozpoznání cílové mRNA je takzvaná „seed sekvence“, která zahrnuje nukleotidy 2-7(-8) na 5´konci miRNA. Tato sekvence se váže prostřednictvím Watson-Crickovského párování na komplementární motivy v mRNA. Právě komplementarita mezi miRNA a mRNA, její míra a rozložení rozhodují o následném mechanismu účinku, tedy zda dojde k přímému endonukleolytickému štěpení transkriptu nebo k nepřímému represivnímu působení (Bartel, 2018).

U živočišných miRNA k dokonalé komplementaritě dochází spíše výjimečně. Pokud ale nastane, dojde k endonukleolytickému štěpení cílové mRNA v místě párování, vlivem PIWI domény některých Argonaute proteinů (například Ago2). Ve většině případů je však párování částečné a je omezeno pouze na „seed“ oblast. MiRISC komplex tak působí nepřímo a povolává adaptorové proteiny, deadenylační a dekapční komplexy, jež jsou s nimi asociovány. Tím dochází ke zkracování poly(A) konce, destabilizaci a degradaci mRNA (Gebert & MacRae, 2019).

MiRNA mohou inhibovat translaci bez výrazné změny hladiny mRNA, a to potlačením iniciačních kroků translace, což je výsledkem interference s eukaryotickými faktory eIF4A1 a eIF4A2. MiRISC komplex se do transkriptu typicky váže do nepřekládané oblasti 3´UTR, nicméně i v této oblasti vyvolá odštěpení zmíněných

iniciačních faktorů. To má za následek přerušení čtení transkriptu ribozomem a narušení sestavení translačního iniciačního komplexu eIF4F na jeho 5´konci (Gebert & MacRae, 2019).

Protože jeden komplex může cílit na stovky různých mRNA a jedna mRNA obsahuje často vazebná místa pro více miRNA, je tento systém velmi variabilní regulátor posttranskripce. Stěžejní funkcí je tedy mírná kontrola hladin proteinů, nikoliv úplná inhibice genové exprese (Bartel, 2018; Gebert & MacRae, 2019).

2.2 MiRNA-208 a její isoformy miRNA-208a a miRNA-208b

MiRNA-208 patří do skupiny miRNA specifických pro srdeční tkáň. Jsou kódovány v intronech genů pro myosin těžkého řetězce a regulují expresi kontraktilních proteinů a remodelaci myokardu (Zhang & Xu, 2021).

MiRNA-208a je uložena v intronu genu pro motorický protein α-myosin (α-MHC) těžkého řetězce Myh6 (Myosin Heavy Chain 6), který převažuje v síních srdce. Gen miRNA-208b je lokalizován v genu pro β-myosin (β-MHC) těžkého řetězce Myh7 (Myosin Heavy Chain 7), typickém pro komory. Oba geny se nachází na stejném lidském chromozomu 14 (Zhang & Xu, 2021). Tkáňová specifita je u obou isoforem mírně odlišná. MiRNA-208b je exprimována v kosterním i srdečním svalstvu hlavně v embryonálním a novorozeneckém stádiu, zatímco miRNA-208a je specifická pouze pro srdce výhradně dospělých jedinců. Obě isoformy mají stejnou „seed“ sekvenci, liší se pouze ve třech nukleotidech ve své 3´oblasti (Huang et al., 2021). Tyto dvě isoformy společně s miRNA-499 tvoří skupinu, která ovlivňuje fungování mezi rychlými a pomalými isoformami myosinu, a zároveň kontroluje hypertrofii, fibrózu i energetický metabolismus myokardu (Huang & Li, 2015). Obě isoformy jsou tedy spojeny s mnoha srdečními onemocněními a ovlivňují srdeční fenotyp. V kontextu molekulární patofyziologie selhání srdce vykazuje miRNA-208 pleiotropní účinky, jejichž charakter závisí na typu patologického podnětu a jeho trvání. V modelech tlakového přetížení je miRNA-208 spojována se signalizací hypertrofie a přepínáním isoforem myosinu (van Rooij et al., 2007; Montgomery et al., 2011). Ovšem v podmínkách akutní ischémie vykazuje tato molekula protektivní, anti-apoptické vlastnosti (Wang et al., 2022).

Funkční význam byl původně ukázán v experimentu na myších s delecí miRNA208a v genu Myh6 a v transgenních liniích s její zvýšenou expresí. Myši postrádající miRNA-208a nevykazovaly typickou hypertrofii při vysokém krevním tlaku,

při aktivaci kalcineurinu ani při snížené funkci štítné žlázy. Nedocházelo u nich k intersticiální fibróze ani nežádoucí aktivaci β-MHC. Opačný efekt nastal u myší s trojnásobnou expresí miRNA-208a, kdy se β-MHC aktivovaly v srdci samovolně, tedy i v případě nepřítomnosti jakéhokoliv stresu nebo zátěže (van Rooij et al., 2007). Z toho vyplývá, že přítomnost této mikroRNA je důležitá pro patologickou přestavbu srdce.

V klinické praxi se poznatky potvrdily také u lidských pacientů. U jedinců trpících srdečním selháním či dilatační kardiomyopatií byly v srdeční tkáni naměřeny zvýšené hladiny miRNA-208a. Vysoká koncentrace souvisí s horší funkcí srdce a zároveň nižší ejekční frakcí, tedy schopností srdce efektivně pumpovat krev do těla. To pomáhá lékařům lépe predikovat přežití pacienta (Satoh et al., 2010).

Terapeutický potenciál farmakologické inhibice miRNA-208a byl také ověřen ve výzkumu provedeném na potkanech s indukovaným srdečním selháním vlivem vysokého krevního tlaku. Podáváním antimiR-208a byla snížena hladina miRNA-208a, a tím došlo i ke snížení tvorby β-MHC a normalizaci Myh6. Fenotypickým důsledkem byla zmírněná hypertrofie, snížená fibróza i zlepšená diastolická funkce, což bylo spojeno s vyšší vitalitou potkanů (Montgomery et al., 2011).

Další práce prokázala roli miRNA-208a v řízení mitochondriální biogeneze a metabolické adaptace kardiomyocytů. Pomocí metody „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9“ (CRISPR/Cas9) byly experimentálně odstraněny z lidských kardiomyocytů geny kódující mikroRNA-208a a následně byly tyto kardiomyocyty vystaveny podmínkám simulující diabetes. Bylo pozorováno, že potlačení miRNA-208 brání poklesu mitochondriální DNA, transkripčních faktorů, komplexů dýchacího řetězce, a naopak zvyšuje maximální respiraci a kapacitu dýchacího řetězce (Mekala et al., 2021).

Kromě funkční role v buňce je také miRNA-208 významná i v diagnostice. V důsledku ischemického poškození srdeční tkáně při akutním infarktu myokardu totiž dochází k uvolnění miRNA-208 do krevního oběhu. Zde je u pacientů detekovatelná již během prvních čtyř hodin od nástupu příznaků, a tak je potenciálním spolehlivým biomarkerem (Wang et al., 2010).

Zatímco výše zmíněné studie poukazují na negativní vlivy miRNA-208, novější výzkumy popisují i její kardioprotektivní funkci, realizovanou přímou inhibicí proteinu PDCD4 (Wang et al., 2022). Tato interakce zaobírající se osou miRNA-208/PDCD4 je popisována v kapitole 2.4 této práce.

2.3 Protein PDCD4

PDCD4, původně označený jako MA-3 byl poprvé identifikován jako gen asociovaný s apoptózou, protože exprese příslušného proteinu byla zvýšená v buňkách ve stádiu programované buněčné smrti. Kóduje vysoce hydrofilní protein o délce 469 aminokyselin, jež je konzervovaný napříč druhy (Shibahara et al., 1995).

Na molekulární úrovni působí protein PDCD4 jako inhibitor translace vazbou na iniciační faktory eIF4AI a eIF4AII a inhibuje jejich RNA helikázovou aktivitu, čímž znemožňuje rozplétání mRNA během proteosyntézy. Mechanismem inhibice je navázání PDCD4 na samotný faktor eIF4A a na střední část skeletárního proteinu eIF4G, čímž znemožní helikáze eIF4A připojit se k C-koncové doméně eIF4G v komplexu eIF4F. Díky tomu dojde k nesprávnému sestavení komplexu u 5´ konce mRNA a potlačení translace (Yang et al., 2003).

PDCD4 je známý jako nádorový supresor, jehož exprese je regulována na posttranskripční úrovni pomocí miRNA. Bylo zjištěno, že miRNA-21 se přímo váže na místo v 3´UTR oblasti mRNA pro PDCD4 a inhibuje translaci, často i prostřednictvím degradace samotné mRNA. Mezi expresí miRNA-21 a hladinou proteinu PDCD4 je nepřímá úměra. To bylo potvrzeno jak v buněčných liniích, tak v nádorových tkáních pacientů (Asangani et al., 2008). Tato studie potvrdila, že potlačení miRNA-21 vede k obnovení hladiny proteinu PDCD4. Nárůst jeho hladiny má za následek celkové oslabení metastatického potenciálu (Asangani et al., 2008). Podobně bylo v buňkách karcinomu prsu ukázáno, že PDCD4 je cílem miRNA-21. Jeho zvýšení po inhibici miRNA-21 vedlo ke zpomalení buněčné proliferace. Současné umělé snížení PDCD4 poté zapříčinilo částečné vymizení pozorovaného protinádorového účinku (Frankel et al., 2008).

Regulace PDCD4 miRNA je komplexní a může zahrnovat i synergické či na sobě závislé interakce více miRNA. Například u spinocelulárního nádoru hlavy a krku bylo zjištěno, že je tento protein regulován kombinovaným působením miRNA-21 a miRNA-499 (Ajuyah et al., 2019).

PDCD4 podléhá regulaci nejen miRNA ale i té posttranslační. Některé tumorigenní faktory indukují jeho degradaci prostřednictvím fosforylace specifických serinových zbytků a následné ubikvitinace a zničení v proteazomu. Regulace exprese tohoto proteinu je tak kontrolována na více úrovních, například i prostřednictvím signálních drah (Matsuhashi et al., 2019).

2.4 Interakce miRNA-208 a PDCD4

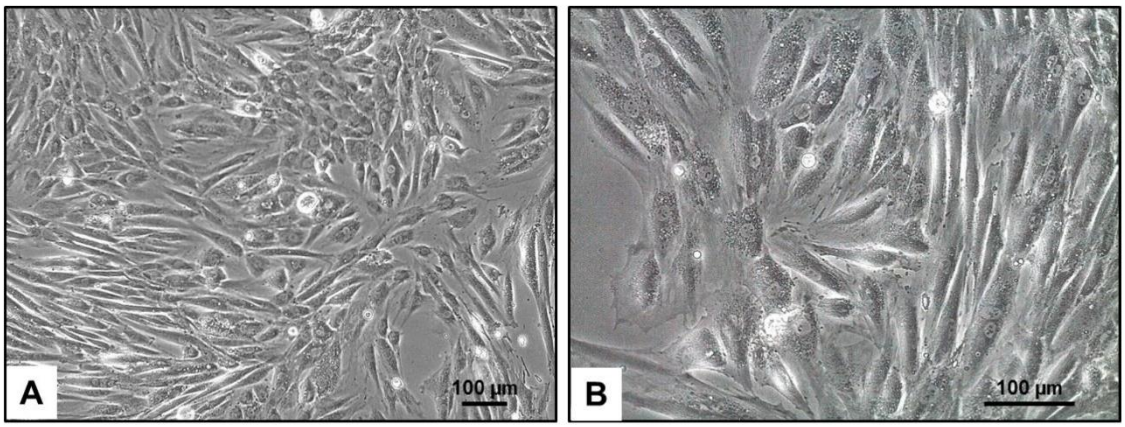
In vivo experiment na myších s indukovaným akutním infarktem myokardu a *in vitro* experiment na buněčném modelu kardiomyocytů s navozenou hypoxií poukázal na kardioprotektivní roli miRNA-208. V poškozené tkáni došlo k jejímu výraznému poklesu exprese, což zapříčinilo buněčnou apoptózu a prozánětlivou reakci. Experimentálně zvýšená exprese ale tyto mechanismy zvrátila tím, že utlumila zánětlivou reakci a expresi proapoptických proteinů. Získaná data ukázala, že podstatou antiapoptického působení je přímá interakce s PDCD4. Pomocí *in situ* hybridizace (FISH) bylo ukázáno, že miRNA-208 i PDCD4 společně lokalizují hlavně v buněčné cytoplazmě. Testy s duální luciferázou a RNA „pull-down" ověřily, že miRNA-208 se váže přímo na 3´UTR oblast genu pro PDCD4 a funguje jako jeho přímý inhibitor. Prováděný dodatečný experiment navíc dokázal, že umělé zvýšení proteinu PDCD4 zruší ochrannou funkci miRNA-208 a buňky začnou opět podléhat apoptóze (Wang et al., 2022).

2.5 Buněčná linie H9c2

Buněčná linie H9c2 je odvozená z embryonální srdeční tkáně laboratorního potkana kmene BDIX. Primární kultura, která pochází převážně z komorové tkáně srdce třinácti denního embrya, byla izolována modifikovanou metodou selektivního sériového pasážování dle Yaffeho. V průběhu adaptace na *in vitro* podmínky byla pozorována zvýšená rychlost proliferace, která měla za následek ztrátu spontánní kontrakce. Ta je běžným projevem u izolovaných primárních kardiomyocytů. U buněk H9c2 byla přítomna pouze v raných fázích kultivace. Pro buňky H9c2 je typický růst v paralelních řadách a jejich vřetenovitý tvar (obrázek 2), což jsou vlastnosti typické i pro buňky kosterního svalstva (Kimes & Brandt, 1976).

Výzkum v oblasti kardiologie hojně využívá linii H9c2 pro její schopnost simulovat fyziologické i patologické procesy srdečního svalu (Kimes & Brandt, 1976; Watkins et al., 2011). Mimo studia srdeční hypertrofie (Watkins et al., 2011) je také modelem pro výzkum specifických účinků léčiv (Hescheler et al., 1991), mechanismů oxidačního stresu, apoptózy a metabolismu kardiomyocytů (Kuznetsov et al., 2015).

Navzdory hojnému využívání a výhodám této buněčné linie je důležité zdůraznit, že ačkoliv buňky sdílí řadu znaků s primárními kardiomyocyty, nelze jimi nahradit komplexitu dospělé srdeční tkáně a jejího přirozeného prostředí. Vzhledem k určitým



Obrázek 2: Buňky H9c2 pod světelným mikroskopem, zvětšení 100× (A) a 200× (B), měřítko 100 µm (Liehr et al., 2025).

genetickým a funkčním odlišnostem oproti novorozeneckému i dospělému myokardu je nutná obezřetnost při přenesení získaných dat do *in vivo* podmínek. I přes tyto komplikace je linie H9c2 považována za vysoce kvalitní model v oblasti kardiovaskulární biologie a patologie. Na základě nedávno publikovaných genetických zdrojů a důkladné charakterizace je nadále potvrzena její relevance ve výzkumu srdečních funkcí a vývoji nových terapeutických postupů zaměřených na srdeční onemocnění (Liehr et al., 2025).

2.6 Polyfenoly

Polyfenoly jsou organické sloučeniny, vyskytující se jako rostlinné sekundární metabolity. V dnešní době je známo více než 8000 těchto sloučenin, což z nich činí jednu z nepočetnějších tříd rostlinných metabolitů vůbec (Durazzo et al., 2019). V potravě je přirozeně přijímáme ve formě ovoce, zeleniny, obilovin, luštěnin nebo v nápojích jako je káva, čaj a víno (Prabhu et al., 2021).

Základní strukturou těchto molekul je jeden nebo více aromatických kruhů s navázanou jednou nebo více hydroxylovými skupinami (Durazzo et al., 2019; Prahbu et al., 2021). V rostlinných tkáních se vyskytují ve volné formě jako aglykony nebo častěji jako glykosidy s cukernými jednotkami navázanými na fenolickou kostru (Singla et al., 2019). Jejich biologická aktivita je dána především schopností reagovat s reaktivními formami kyslíku a dusíku, prostřednictvím fenolických hydroxylových skupin, které působí jako donory vodíku. Kromě toho mají také díky své struktuře schopnost vázat kovové ionty, které se podílí na produkci volných radikálů (Pereira et al., 2009).

2.6.1 Klasifikace polyfenolů

Polyfenoly lze rozdělit do dvou hlavních skupin: flavonoidy a neflavonoidní polyfenoly (Durazzo et al., 2019).

Flavonoidy, které tvoří nejpočetnější podskupinu polyfenolů sestávají z patnácti uhlíkového skeletu, což jsou dva fenylové kruhy spojené heterocyklickou částí, někdy označovaného jako C6-C3-C6. Dle rozdílů v heterocyklické části jsou flavonoidy dále rozděleny do několika skupin, jako jsou flavonoly, isoflavonoly, flavanony, flavanoly a anthokyany. (Prabhu et al., 2021). Vyskytují se nejčastěji ve formě glykosidů a zapojují se hlavně do oxidačně-redukčních procesů. Pro lidské zdraví jsou důležité jejich silně antioxidační a protizánětlivé schopnosti. Významně prospívají cévnímu systému, snižují krevní tlak, brání šíření toxinů, zvyšují účinnost vitaminu C (Spilková et al., 2023).

Neflavonoidní polyfenoly jsou druhou skupinou a dle rozdílů v chemické struktuře jsou rozčleněny do kategorií, například fenolové kyseliny, stilbeny, lignany nebo třísloviny (Prabhu et al., 2021).

2.6.2 Biologické účinky polyfenolů

Polyfenolické látky jsou vzhledem k jejich biologické aktivitě vnímány jako farmakonutrienty, jež mohou být využity jako prevence či terapie pro řadu chronických onemocnění (Prahbu et al., 2021). Několik epidemiologických studií dokazuje, že vyšší příjem polyfenolů ve stravě je spojen s nižším výskytem kardiovaskulárních onemocnění, diabetu 2. typu a obezity. Například rozsáhlá studie PREDIMED, která sledovala stravu mnoha účastníků po dobu pěti let prokázala, že u skupiny s nejvyšším příjmem polyfenolů došlo ke 37% snížení relativního rizika celkové mortality ve srovnáním se skupinou s příjmem nejnižším (Tresserra-Rimbau et al., 2014).

K nejvíce popsaným biologickým účinkům polyfenolů patří jejich antioxidační aktivita. Fenolické hydroxylové skupiny jsou dobrými donory vodíku a elektronů. To umožňuje tvorbu stabilních fenoxylových radikálů, což přerušuje radikálové řetězcové reakce a brání poškození lipidů, proteinů a DNA vlivem oxidace. Rovněž dochází k chelataci přechodných kovů, například mědi a železa, čímž je snížena tvorba hydroxylových radikálů Fentonovou reakcí (Pereira et al., 2009).

S antioxidačním působením souvisí protizánětlivý účinek. Polyfenoly mohou tlumit zánětlivou odpověď snížením prozánětlivých cytokinů, chemokinů a adhezních molekul, což omezuje aktivaci a migraci imunitních buněk. Tento efekt je zprostředkován

hlavně snížením produkce reaktivních forem kyslíku a modulací signálních drah citlivých na oxidační stres, jako jsou například mitogenem aktivované proteinkinázové (MAP) dráhy (Huang et al., 2006).

Polyfenoly zasahují do regulace buněčné signalizace a genové exprese. Mnohé flavonoidy a fenolové kyseliny vykazují strukturální podobu k syntetickým inhibitorům proteinových kináz, a mohou tak nejen nepřímo, ale i přímo modulovat aktivitu těchto drah. Lze tedy říci, že se jejich aktivace nebo inhibice promítá do regulace buněčného cyklu, diferenciace, apoptózy a celkově odpovědi na stres. Například bylo prokázáno, že v cévním systému stimulují produkci oxidu dusnatého, což zlepšuje funkci endotelu a snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění (Vauzour et al., 2010).

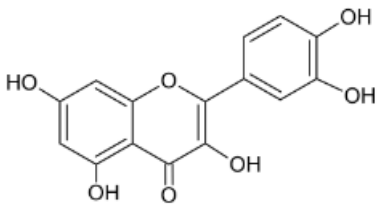
Klinické důsledky zmíněných mechanismů ukázala studie pacientů s vysokým kardiovaskulárním rizikem, kteří konzumovali středomořskou stravu bohatou na polyfenolické látky. Výsledkem bylo výrazné snížení systolického i diastolického krevního tlaku a nižší výskyt hypertenze u účastníků studie (Medina-Remón et al., 2011).

Vedle zmíněných účinků mohou polyfenoly také ovlivňovat genovou expresi na post-transkripční úrovni. Studie na apolipoprotein E deficientních (apoE-deficientních) myších prokázala, že příjem polyfenolických látek v nutričně dosažitelných dávkách vedla ke změnám exprese miRNA v játrech. Bylo identifikováno pět miRNA, jejichž exprese byla ovlivňována všemi testovanými polyfenoly, navzdory jejich odlišné chemické struktuře. Tyto změny miRNA jsou propojeny s regulací genů zapojených do buněčné adheze, mezibuněčné komunikace a signalizačních drah. Tím je ukázáno, že tyto látky mohou ovlivňovat buněčné funkce i prostřednictvím post-transkripční modulace genové exprese (Milenkovic et al., 2012).

Souhrnně lze konstatovat, že polyfenoly v organismech působí na mnoha úrovních. Od přímé antioxidační ochrany, protizánětlivé modulace, přes ovlivnění signalizačních drah až po regulaci genové exprese. Komplexita biologických účinků je stěžejní pro pochopení jejich vlivu na kardiomyocyty a regulační molekuly, včetně miRNA.

2.6.3 Kvercetin

Kvercetin (obrázek 3) je významným zástupcem flavonoidů, konkrétně podtřídy flavonolů (Dostál&Modrianský, 2019). Základem jeho struktury je 3-hydroxyflavonový skelet s pěti hydroxylovými skupinami v pozicích 3, 5, 7, 3′ a 4′, čemuž odpovídá



Obrázek 3: Struktura kvercetinu, vytvořeno v programu ChemSketch.

systematický název 3,3´,4´,5,7-pentahydroxyflavon (Akbari Kordkheyli et al., 2019; Kelly, 2011). V přírodě a stravě převažuje ve formě glykosidů (Dostál&Modrianský, 2019), kdy je obsažen v cibuli, košťálové zelenině, hroznech, jablkách, bobulovitých plodech, rajčatech, čaji a červeném víně. Je přítomen také v rostlinách jako je jinan dvoulaločnatý (*Ginko biloba)*, třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*) či bez kanadský (*Sambucus canadensis*; Dostál&Modrianský, 2019; Akbari Kordkheyli et al., 2019; Kelly, 2011).

Biologické a farmakologické účinky kvercetinu jsou pleiotropní (Dostál&Modrianský, 2019). Na úrovni buněk prokazují především schopnost vychytávat volné radikály, ale je také schopen cílené modulace signálních drah (Mansuri et al., 2014).

Antioxidační kapacita kvercetinu vyplývá z jeho chemické struktury, která umožňuje přímo neutralizovat reaktivní formy kyslíku (ROS; Akbari Kordkheyli et al., 2019). Kromě přímého působení také aktivuje transkripční faktor „Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2“ (Nrf-2), čímž stimuluje produkci antioxidačních a detoxikačních enzymů buňky. To následně vede k navýšení hladiny redukovaného glutathionu, který je důležitým vnitřním antioxidantem (Angeloni et al., 2008; Mansuri et al., 2014).

Zároveň s antioxidačním působením vykazuje kvercetin také silné protizánětlivé účinky inhibicí produkce zánětlivých cytokinů a mediátorů, jež je zprostředkováno inhibicí jaderného faktoru NF-κB (Akbari Kordkheyli et al., 2019). Ovlivňuje také hlavní signální kaskády v buňce, například dráhu fosfoinositid-3-kináza/proteinkináza B (PI3K/Akt) nebo MAP kinázy (Mansuri et al., 2014). Zatímco v kardiomyocytech tyto dráhy pomáhají buňky chránit před stresem, v nádorových liniích může jejich změna naopak podpořit apoptózu (Mansuri et al., 2014; Akbari Kordkheyli et al., 2019).

Kvercetin má ale i schopnost regulovat genovou expresi prostřednictvím miRNA (Milenkovic et al., 2012). Mezi popsané efekty patří potlačení onkogenní miRNA-21. Její snížení má přímý dopad na stabilizaci proteinu PDCD4, čímž brání maligní transformaci

buňky a kontroluje buněčný cyklus (Pratheeshkumar et al., 2016). V souvislosti se srdeční tkání se předpokládá, že právě modulace miRNA-21 zprostředkovává ochranu myokardu (Tu et al., 2013), z čehož lze usuzovat, že by podobná cesta mohla částečně vysvětlovat kardioprotektivní účinek kvercetinu.

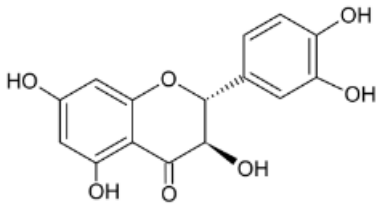
Pro experimenty spojené s vlivem kvercetinu na srdeční tkáň se často využívají kardiomyocyty nebo konkrétně buněčná linie H9c2. Na modelu primárních kardiomyocytů bylo ukázáno, že kvercetin silně stimuluje endogenní antioxidační obranu a chrání tak buňky před oxidativním stresem (Angeloni et al., 2008). Konkrétně linie H9c2 je kvercetinem chráněna před osmotickým (hypertonickým) stresem. Kvercetin stabilizuje vápníkovou homeostázu tím, že zamezuje jeho nadměrnému hromadění v cytosolu a přetížení mitochondrií v hypertonickém prostředí (Dostál et al., 2024).

2.6.4 Taxifolin

Taxifolin (obrázek 4), známý též jako dihydrokvercetin je přírodní flavanonol, který se přirozeně vyskytuje v rostlinách jako jsou cibule, ostropestřec mariánský, modřín, douglaska tisolistá nebo světlice barvířská. Systematickým názvem 3,5,7,3′,4-pentahydroxyflavanon se skládá ze dvou fenylových kruhů spojených heterocyklickým kruhem. To předurčuje jeho chemickou aktivitu, zejména díky přítomnosti pěti hydroxylových skupin (Mandour et al., 2026; Liu et al., 2023). Jeho antioxidační účinky a schopnost vychytávat radikály jsou hodnoceny jako výjimečné oproti ostatním polyfenolům, díky specifickému uspořádání fenolických hydroxylových skupin (Mandour et al., 2026).

Tato látka tedy zamezuje oxidačnímu poškození proteinů, DNA a lipidů. Bylo prokázáno, že v srdečních buňkách tlumí hypertrofii a produkci ROS a zvyšuje hladiny antioxidačních enzymů (Guo et al., 2015).

Jeho protizánětlivý účinek spočívá v redukci exprese mediátorů zánětu (Sarg et al., 2024) nebo v blokaci faktoru NF-κB, čímž snižuje hladiny prozánětlivých



Obrázek 4:Struktura taxifolinu, vytvořeno v programu ChemSketch.

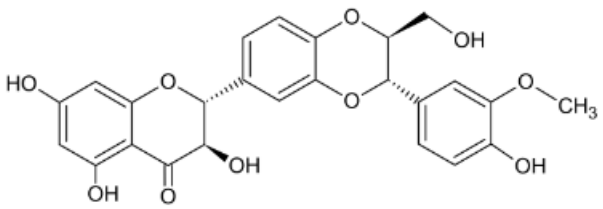
enzymů (cyklooxygenáza-2 (COX-2), inducibilní syntáza oxidu dusnatého (iNOS)). Navíc taxifolin omezuje infiltraci a adhezi bílých krvinek do cévního endotelu (Wang et al., 2006).

Jeden z jeho terapeutických účinků je modulace genové exprese prostřednictvím miRNA. Na myších a buňkách H9c2 bylo prokázáno, že taxifolin specificky zvyšuje hladinu miRNA-200a, což vede ke stimulaci signální dráhy Nrf2, který je hlavní regulátor buněčné antioxidační odpovědi. U buněk poškozených doxorubicinem, což vyvolalo kardiotoxicitu, došlo k posílení přirozeného obranného systému. Zároveň došlo také k zabránění rozvoje ferroptózy, což je specifická forma buněčné smrti, která je důsledkem hromadění železa a těžkého oxidačního stresu (Lin & Wang, 2023).

Kromě ochrany před kardiotoxicitou se silný kardioprotektivní potenciál taxifolinu projevuje i při ischemicko-reperfuzním poškození. Na experimentálním modelu izolovaných potkaních srdcí bylo ukázáno, že medikace taxifolinem výrazně zlepšuje obnovu mechanické funkce srdeční komory a současně tlumí oxidační stres. Účinně potlačuje mitochondriální apoptózu utlumením exprese molekul, jež destrukci buněk spouštějí, a zvýšením produkce ochranného proteinu „B-cell lymphoma 2“ (Bcl-2; Tang et al., 2019).

2.6.5 Silybin

Jiným názvem silibinin (obrázek 5) je flavonolignan, který je majoritní složkou silymarinu, což je extrakt ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*; Kadoglou et al., 2022). Účinný sylimarinový komplex je složen z isosilybinu, taxifolinu, kvercetinu, kempferolu a hlavních složek silybinu, silychristinu a silydianinu (Spilková et al., 2023). Je proslulý svými hepatoprotektivními účinky, nicméně je studován jeho farmakologický potenciál i v kontextu kardiovaskulárních rizikových faktorů. Reaktivitu silybinu určuje struktura, obsahující pět hydroxylových skupin.



Obrázek 5: Struktura silybinu, vytvořeno v programu ChemSketch.

Zejména přítomnost 3-OH skupiny je důležitá pro oxidační procesy, neboť její oxidace na keton vede ke vzniku 2,3-dehydrosilybinu (Kadoglou et al., 2022).

Kvantově-chemické analýzy ukázaly, že silybin je slabším vychytávačem radikálů než dehydrosilybin, což je zapříčiněno absencí 2,3-dvojné vazby. Přenos vodíku je potom termodynamicky nevýhodný, a tak je jeho antioxidační účinek zprostředkován méně efektivními mechanismy jako je přenos elektronů nebo tvorba aduktů (Trouillas et al., 2008).

Na *in vivo* modelech silymarin stabilizuje buněčné membrány a zamezuje peroxidaci lipidů. Zároveň udržuje vysokou hladinu endogenních antioxidačních enzymů (superoxiddismutáza, kataláza, redukovaný glutathion; Rao & Viswanath, 2007). Novější výzkum zabývající se přímo silybinem, tedy majoritní složkou, doplňuje, že rovněž geneticky reguluje oxidační stres skrze snížení exprese enzymů NADPH oxidáz 2 a 4 (NOX2 a NOX4) a ochraňuje mitochondriální funkce (Chen et al., 2020). Protizánětlivý účinek se projevuje hlavně útlumem infiltrace neutrofilů do srdeční tkáně, což dokládá pokles hladiny myeloperoxidázy (Rao & Viswanath, 2007; Chen et al., 2020). Silybin je navíc schopný na molekulární úrovni deaktivovat zánětlivou dráhu NF-κB (Chen et al., 2020). Důsledkem těchto mechanismů je zachování buněčné integrity, potlačení apoptózy kardiomyocytů a významné omezení rozsahu infarktu (Rao & Viswanath, 2007; Chen et al., 2020).

Interakce silybinu s miRNA byla ukázána u nádorových buněk ve studii Zappavigna *et al.*, kde zvýšil produkci ceramidů, jež stimulují sekreci tumor-supresorových miRNA-223-3p a miRNA-16-5p, a současně potlačují onkogenní miRNA-92a-3p. Redukce této molekuly obnovuje funkci proteinu fosfatáza a tenzinový homolog (PTEN) a inhibuje proliferační signální dráhu. Důsledkem je tedy zástava buněčného cyklu ve fázi G1 a indukce apoptózy nádorových buněk (Zappavigna et al., 2019).

Na modelu H9c2 bylo ukázáno, že silybin inhibuje srdeční hypertrofii vyvolanou fenylefrinem. Látka potlačovala zvětšování buněk a zabránila znovu aktivaci fetálního genového programu. Hlavním mechanismem působení silybinu je blokace extracelulárním signálem regulovaných kináz 1/2 (ERK1/2) a inhibice aktivity Akt dráhy. Byla také doložena fyzická ochrana DNA před fragmentací způsobenou peroxidem vodíku (Anestopoulos et al., 2013). Výsledky tedy ukazují, že silybin brání nejen akutnímu poškození při infarktu (Rao & Viswanath, 2007; Chen et al., 2020) ale rovněž

remodelaci myokardu, a pomáhá tím k prevenci srdečního selhání (Anestopoulos et al., 2013).

2.6.6 Dehydrosilybin

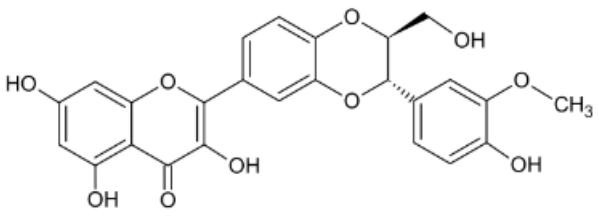
2,3-dehydrosilybin (obrázek 6) je minoritní flavonolignan obsažený v extraktu ze semen ostropestřce mariánského. Tvoří se primárně oxidací silybinu (Kadoglou et al., 2022). Z chemického hlediska se vyznačuje přítomností 2,3-dvojné vazby v konjugaci s 4-oxo skupinou ve své struktuře. Tento prvek podmiňuje fyzikálně-chemické chování látky a její reaktivitu (Trouillas et al., 2008).

Prostřednictvím specifických mechanismů efektivně vychytává radikály, a proto má také vysokou antioxidační aktivitu. Pro přenos vodíku a delokalizaci elektronů je stěžejní jeho 3-OH skupina, díky níž vykazuje dehydrosilybin vyšší antioxidační potenciál než samotný silybin (Trouillas et al., 2008). *In vitro* experimenty ukázaly, že dehydrosilybin účinně inhibuje produkci ROS, hlavně peroxidu vodíku. To přímo koreluje s poklesem oxidativního poškození proteinů (Gabrielová et al., 2010; Gabrielová et al., 2015a).

Kromě toho působí dehydrosilybin v izolovaných mitochondriích potkaního srdce jako mírný uncoupler oxidativní fosforylace (Gabrielová et al., 2010). A následně byl popsán jeho pozitivní inotropní efekt, který se projevoval nárůstem kontraktility srdečního svalu (Gabrielová et al., 2015b).

Pro téma vlivu dehydrosilybinu na miRNA na posttranskripční úrovni v dnešní době neexistuje příliš mnoho experimentálních dat. Je ale publikováno několik studií, které dokládají korelaci této látky s buněčnými signálními drahami, které jsou nezbytné pro přežití kardiomyocytů.

Dehydrosilybin vyrovnává poměr aktivní fosforylované proteinkinázy C epsilon (pPKCε) vůči její celkové expresi, což napodobuje ochranné účinky ischemického „postconditioningu“ (krátké periody ischemie aplikované během reperfuze)



Obrázek 6: Struktura dehydrosilybinu, vytvořeno v programu ChemSketch.

(Gabrielová et al., 2015a). Další signální kaskáda chránící před ischemicko-reperfuzním poškozením je zprostředkována tyrosinovými Src proteinkinázami. V rámci preconditioningu souvisí dehydrosilybin se zvýšenou tvorbou makromolekulárních komplexů, takzvaných signalozomů, v nichž dochází k akumulaci endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS). To posiluje kardioprotektivní odpověď organismu (Gabrielová et al., 2019).

Účinky dehydrosilybinu byly taktéž testovány na buněčné linii H9c2. Analýzy ukázaly, že u těchto buněk dehydrosilybin snižuje koncentraci vápníku. Nesnižuje ji přímo v mitochondriích, namísto toho indukuje mírnou depolarizaci plazmatické membrány, což vede k nárůstu hladiny cytosolického vápníku čerpaného z extracelulárního prostředí. Tyto poznatky naznačují, že protektivní vliv pramení ze spojitosti s plazmatickou membránou, ne z mitochondriálního uncouplingu. Zde ale platí zajímavost, že zatímco u izolovaných mitochondrií dehydrosilybin vykazoval tyto schopnosti, na modelu celých buněk H9c2 pak jen zanedbatelně (Zholobenko et al., 2017).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1.Přístrojové vybavení a pomůcky

Analytické váhy AX105 DeltaRange® (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Bloková třepačka Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)

Blotovací podložky (VWR, USA)

Blotovací systém Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, USA)

Buněčná škrabka (Biologix, USA)

Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo)

CO_2 inkubátor MCO-17AIC (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

Digitální předvážky GX-600 (A&D, Japonsko)

Filtrační papír (Whatman, USA)

Fotometr pro měření absorbance/fluorescence Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko)

Hlubokomrazící box Inova U535 (Eppendorf, Německo)

Chlazená centrifuga Mikro 22R (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga Rotina 380R (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Kultivační láhve, kultivační desky, centrifugační kyvety (TPP, Švýcarsko)

Laminární box Clean Air (Schoeller Instruments, ČR)

Laminární box Topsafe 1.8 pro RT-PCR (Bio Air Instruments, ČR)

Magnetická míchačka IKA RH basic KT/C (Slabo, ČR)

Membrána PVDF-FL Immobilon® (Sigma Aldrich, Německo)

Membrána PVDF-P Immobilon® (Sigma Aldrich, Německo)

Mikroskop CK40 (Olympus, Japonsko)

Mini-rocker třepačka typ MR-1 s kývavým pohybem (Biosan, Litva)

MiniSpin centrifuga vč. rotoru (Eppendorf, Německo)

NanoPhotometer® N60 (Implen, Německo)

Odsávačka Gilson Safe Aspiration Station (Gilson, USA)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Švýcarsko)

Pipetový dávkovač Easypet 3 (Eppendorf, Německo)

Plastové mikrozkumavky (Eppendorf, Německo)

Systém pro elektroforézu Mini-Protean® 3 Cell se zdrojem Power Pac 200 (Bio-Rad Laboratories, USA)

Systém pro chemiluminiscenční a epifluorescenční zobrazování Alliance Q9 (Uvitec Cambridge, Velká Británie)
Špičky (Eppendorf, Německo)
Termoblok Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo)
Vodní lázeň s třepáním OLS 26 Aqua Pro (Grant Instruments, Velká Británie)
Vortex MIX-28 Touch fairy (Hangzhou Miu Instruments, Čína)
Vortex Reax top (Heidolph, Německo)

3.2.Materiál

3.2.1 Biologický materiál

Buňky buněčné linie H9c2 z potkaních kardiomyoblastů (ECACC, č. 88092904 Rat BDIX heart myoblasts).

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid/N,N´-methylenbisakrylamid (29:1, 40% roztok) (Merck; kat. č.1.00641.1000)
Bromfenolová modř, prášek (Sigma Aldrich; kat. č. B0126)
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich; kat. č. D2650)
DL-dithiotreitol (DTT) (Sigma Aldrich; kat. č. D0632)
Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma Aldrich; kat. č. L5750)
Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM) (Sigma Aldrich; kat. č. D5796)
Ethanol (Dr. Kulich Pharma; kat. č. ES 200-578-8)
Fetální hovězí sérum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences; kat. č. SV 30160.03)
Fluorid sodný (Sigma Aldrich; kat. č. S7920)
Hovězí sérový albumin-frakce V (BSA) (Serva; kat. č. 11930.03)
Hsa-miR-21-5p Ambion™ Pre-miR™ miRNA Precursor (Thermo Fisher; kat. č. AM17100)
Chlorid sodný (Lach-Ner, kat. č. 30093-AP0-G1000-1)
Chloroform (Sigma Aldrich; kat. č. C2432)
Immuno Cruz Luminol Reagent (Santa Cruz, kat. č. 11930.03)
Kyselina chlorovodíková 35% (Penta; kat. č. 19360-11000)
Kyselina octová 99% (Lach-Ner; kat. č. 10047-A99)

Lipofectamine™ 3000 Invitrogen™ (Thermo Fisher; kat. č. L3000008)

Methanol (VWR; kat. č. 20864.320)

N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva; kat. č. 35930)

Neesenciální aminokyseliny (NEAA) (Life Technologies; kat. č. 11140050)

Opti-MEM™ I médium bez séra s doplňkem GlutaMAX™ Gibco™ (Thermo Fisher; kat. č. 51985034)

Oxid uhličitý (Siad)

Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich; kat. č. P4333)

Pierce™ BCA Protein Assay pro stanovení proteinů (Thermo Fisher; kat. č.23225)

Polyfenolické látky:

Kvercetin (Sigma Aldrich; kat. č. Q4951-10G)

Taxifolin, silybin a dehydrosilybin připraveny v laboratoři biotransformací MBÚ AVČR v Praze (čistota látek 99,5 %)

Ponceau S (Sigma Aldrich; kat. č. P3504)

Propanol (Sigma Aldrich; kat. č. 402893)

Proteázový inhibitor CompleteTM (Roche; kat. č. 04 693 116 001)

Protilátky primární:

CoraLite® Plus 750-conjugated GAPDH (Proteintech, kat. č. CL750-60004)

GAPDH Mouse (Proteintech, kat. č. 60004-1-lg)

PDCD4 (D29C6) XP® Rabbit (Cell Signaling, kat č. 9535)

Protilátky sekundární:

DyLight® 800 4X PEG Conjugate Anti-Rabbit IgG (H+L) (Cell Signaling, kat. č. 5151)

HRP-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Proteintech, kat. č. SA00001-1)

HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Proteintech, kat. č. SA00001-2)

TaqMan® MicroRNA assays:

rno-miR-208 (Thermo Fisher; kat. č. 4427975, Assay ID: 463567_mat)

RNU6B (Thermo Fisher; kat. č. 4427975, Assay ID: 001093)

Trans-Blot® TurboTM 5x Transfer Buffer (BioRad; kat. č. 10026938)

TRI Reagent® (Sigma Aldrich; kat. č. T9424)

Tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris) (Carl Roth; kat. č. 0188.4)

Triton X-100 (Sigma Aldrich; kat. č. T9284)

Trypanová modř 0,4% roztok (Sigma Aldrich; kat. č. T8154)

Trypsin-EDTA, 0,25% roztok (Life Technologies; kat. č. 25200-056)

Tween® 20 (Sigma Aldrich; kat. č. P1379)

Vanadičnan trisodný (Sigma Aldrich, kat. č. S6508)

Voda pro molekulární biologii (Sigma Aldrich; kat. č. W4502)

Pro experimenty s krátkými nekódujícími RNA byly používány komerční produkty společnosti Thermo Fisher Scientific. Syntetická hsa-miR-21-5p pro transfekci a pro PCR detekci rno-miR-208 a RNU6B. Přesné sekvence syntetické miRNA ani primerů nejsou z licenčních důvodů veřejně dostupné, proto jsou uvedeny pouze příslušné databázové sekvence cílových molekul, a to v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled zkoumaných krátkých nekódujících RNA a jejich sekvence

Název	Typ	Sekvence (5' → 3')	Zdroj
hsa-miR-21-5p	zralá miRNA	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	miRBase
rno-miR-208	zralá miRNA	AUAAGACGAGCAAAAAGC	miRBase
RNU6B	snRNA	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUAUACUAAAAUUGGAAC GAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAU GACACGCAAAUUCGUGAAGCGUUCCAUAUUUUU	NCBI

3.2.3 Roztoky

Kultivační médium:

Eaglovo médium modifikované Dulbeccem s obsahem glukosy 4500 $mg \cdot l^{-1,}$ 10% fetální hovězí sérum, neesenciální aminokyseliny (1%, v/v), penicilin (100 $U \cdot ml^{-1}$), streptomycin (100 $mg \cdot l^{-1}$).

Koncentrovaný roztok PBS („phosphate-buffered saline“) (10×):

NaCl (137 $mmol \cdot l^{-1}$), KCl (2,68 $mmol \cdot l^{-1}$), Na2HPO4·12 H2O (8,96 $mmol \cdot l^{-1}$), KH2PO4 (1,47 $mmol \cdot l^{-1}$), pH=7,4.

HUVEC pufr pro přípravu celkových lyzátů:

Tris (20 $mmol \cdot l^{-1}$), NaCl (150 $mmol \cdot l^{-1}$), glycerolfosfát (20 $mmol \cdot l^{-1}$), Na3VO4 (1 $mmol \cdot l^{-1}$), NaF (1 $mmol \cdot l^{-1}$), EGTA (5 $mmol \cdot l^{-1}$), Triton X-100 (1%, v/v), Tween-20 (0,1%, v/v), inhibitor proteas Complete™ (1 tableta v 50 ml), pH=7,5.

Pracovní činidlo kyseliny bicinchoninové (BCA):

Reagent A/reagent B (50:1, v/v)

Roztoky pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE) a Western blot:

12,5% polyakrylamidový gel migrační: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (30,9 %), deionizovaná voda (42,3 %), migrační pufr (24,7 %), 10% SDS (1 %), 10%, peroxodisíran amonný (1 %), tetramethylethylendiamin (0,1 %) a 10% SDS (1 %).

4% polyakrylamidový gel zaostřovací: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (13,1 %), deionizovaná voda (60,6 %), zaostřovací pufr (24,7 %), 10% SDS (1 %), 10% peroxodisíran amonný (0,3 %), tetramethylethylendiamin (0,15 %).

Zaostřovací pufr: Tris (500 $mmol \cdot l^{-1}$), pH 6,8.

Přenosový pufr: Tris (25 $mmol \cdot l^{-1}$), glycin (192 $mmol \cdot l^{-1}$), SDS (0,1%, m/v), methanol (20%, v/v), pH 8,3.

TBS („tris-buffered saline“): Tris (100 $mmol \cdot l^{-1}$), NaCl (154 $mmol \cdot l^{-1}$), pH 7,5.

TBS/T: Tween 20 (0,1%, v/v), TBS.

TBS/T/mléko: Tween 20 (0,1%, v/v), sušené mléko (5%, m/v), TBS.

TBS/T/BSA: Tween 20 (0,1%, v/v), BSA (5%, m/v), TBS.

Vzorkový pufr: Tris (312,5 $mmol \cdot l^{-1}$), pH 6,8; SDS (10%, m/v), glycerol (50%, v/v), DTT (0,5 $mol \cdot l^{-1}$), bromfenolová modř (0,05%, m/v).

Barvící roztok: kyselina octová (5%, v/v); Ponceau S (0,1% m/v).

3.3 Metody

3.3.1 Kultivace buněk H9c2

Buňky ve směsi FBS a DMSO byly rozmraženy při 37 °C a přeneseny do falkony s 9 ml média. Po centrifugaci (178×g, 3 min, za pokojové teploty) byl supernatant odlit a pelet rozpipetován v čerstvém sterilním kultivačním médiu. Následně byla suspenze buněk přenesena do velké kultivační láhve a inkubována ve sterilním prostředí při 37 °C s atmosférou s 5 % oxidu uhličitého a prostoru s nasyceném vodními parami.

Vždy při dosažení 90% konfluence (zhruba v intervalu 48-72 h) byly buňky pasážovány. Po odlití stávajícího média byly dvakrát promyty sterilním roztokem PBS, a následně pro jejich uvolnění od povrchu láhve inkubovány přibližně 3 min s 1 ml 0,25% trypsinu. Trypsinizace byla zkontrolována pod světelným mikroskopem. Pro inhibici účinku trypsinu bylo přidáno 10 ml kultivačního média s obsahem FBS. Suspenze byla poté centrifugována (178×g, 3 min, za pokojové teploty). Pelet oddělený od média s trypsinem byl resuspendován v čerstvém médiu. Část suspenze buněk byla přenesena do zkumavky společně s trypanovou modří a přenesena na Bürkerovu komůrku pro vypočítání potřebného množství pro následující kultivaci. Odpovídající objem byl přidán do kultivační láhve a obohacen o čerstvé kultivační médium. Inkubace probíhala opět za již uvedených optimálních podmínek.

3.3.2 MTT test cytotoxicity

MTT test je kolorimetrická metoda, používaná ke zjištění metabolické aktivity buněk, jejich viability, proliferace a určení cytotoxických účinků látek. Principem je redukce žluté tetrazoliové soli MTT na fialové krystaly formazanu vlivem mitochondriálních enzymů, zejména prostřednictvím sukcinát dehydrogenázy.

Po vysetí buněk na 96jamkovou desku a 24h kultivaci (v inkubátoru při 37 °C s 5 % oxidu uhličitého) byl do každé jamky přidán roztok média s příslušnou polyfenolickou látkou. Kvercetin, taxifolin, silybin i dehydrosilybin byly přidávány v koncentracích 0; 0,5; 1; 2; 10; 20 a 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Pozitivní kontrola obsahovala kultivační médium s příslušným objemem DMSO, který byl použit pro dávkování vzorků. Triton X-100 pak sloužil jako kontrola negativní. Po 24 h v inkubátoru byly desky vyjmuty, odsán roztok z jamek, a po opláchnutí roztokem PBS pipetován roztok 10% MTT v médiu. Po 1,5h kultivaci v inkubátoru byl roztok opět odsát, a do každé jamky

pipetována směs DMSO s 1% NH_3. Následovala inkubace 5 min při laboratorní teplotě a poté byla spektrofotometricky změřena absorbance při 540 nm. Vyhodnocení proběhlo v programu Microsoft Excel a Statistica.

3.3.3 Lýza buněk pro přípravu celkových extraktů

Buňky H9c2 kultivované na 6jamkových deskách byly ošetřeny roztoky vybraných polyfenolů o koncentraci 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a inkubovány 24 h. Poté bylo médium odstraněno a jamky promyty roztokem PBS o teplotě 4 °C. Následně byly buňky seškrábány pomocí buněčné škrabky do suspenze s PBS, přeneseny do zkumavek a ponechány na ledu. Po 5 min centrifugaci při 270×g byl odlit supernatant a k peletu přidáno vždy 75 µl HUVEC pufru. Zkumavky byly ponechány 30 min na ledě a průběžně vortexovány. Pro odebrání supernatantu bylo potřeba další centrifugace (13 min) při 11400×g. Ze zkumavek byla část roztoku odebrána pro stanovení celkových proteinů metodou BCA. Zbytek byl uchován při -80 °C pro elektroforézu a Western blot.

3.3.4 Transfekce buněk

Pro pozitivní kontrolu snížení exprese proteinu PDCD4, detekovaného navazující metodou Western blot, byla provedena transfekce buněk H9c2 pomocí miRNA-21. Na přípravu transfekčního roztoku bylo smícháno nejprve 300 µl média Opti-MEM bez séra a antibiotik s 5 µl Lipofectamine 3000, který byl přidáván po kapkách do zkumavky. Po 5min inkubaci (laboratorní teplota) byla tato směs přepipetována do zkumavky s 3 µl miRNA-21 (150 ng). Po důkladném promíchání obou roztoků proběhla inkubace v délce 15 min při laboratorní teplotě. Vzniklý transfekční komplex byl následně smíchán se suspenzí buněk H9c2 v kultivačním médiu ($1 \cdot 10^6$ buněk v 6 ml kultivačního média) a přenesen na 6jamkové desky k inkubaci.

3.3.5 Stanovení celkových proteinů metodou BCA

Stanovení koncentrace proteinu pomocí kyseliny bicinchoninové je nepřímá kolorimetrická metoda. Principem je dvoustupňová reakce, kdy nejprve dochází k redukci měďnatých iontů na měďné, působením peptidových vazeb proteinů. Následně ionty reagují v alkalickém prostředí s BCA a vzniká fialově zbarvený komplex.

Pro kvantifikaci byla použita standardní řada BSA a pracovní činidlo BCA. Do 96jamkové desky bylo pipetováno vždy 10 µl vzorku/standardu a 200 µl činidla.

Inkubace probíhala 30 min při 37 °C. Následně byla stanovena absorbance při 562 nm, a pomocí sestrojené kalibrační křivky vypočítána koncentrace proteinů v lyzátech v programu Microsoft Excel.

3.3.6 SDS-PAGE elektroforéza, Western blot a imunodetekce

Lyzáty byly před nanášením na gel rozmrazeny a inkubovány při 95 °C po dobu 5 min se vzorkovým pufrem v poměru 10 µl vzorkového pufru:40 µl lyzátu. Proteiny tak byly denaturovány, DTT zajistil redukci disulfidických vazeb a SDS zaopatřil jejich záporný náboj pro separaci na základě molekulové hmotnosti.

Pro separaci byly namíchány 12,5 % polyakrylamidové gely o tloušťce 1,5 mm. Na gel bylo aplikováno vypočítané množství proteinu na jamku společně s molekulárním markerem. Elektroforéza probíhala v migračním pufru při konstantním proudu nejprve 15 mA a po migraci vzorků do separačního gelu byl proud zvýšen na 30 mA. Po zhruba 2 h byla separace ukončena.

Zaostřovací gel byl odstraněn a druhá část byla promyta v Trans-Blot Turbo pufru. Současně probíhala aktivace PVDF membrány rehydratací v methanolu, promytím ve vodě a transferovém pufru. Vlastní transfer proběhl v systému Trans-Blot Turbo, kde bylo potřeba naskládat komponenty v pořadí: filtrační papír, aktivovaná polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána, gel, filtrační papíry. Postupně byly vrstvy zbavovány vzduchových bublin pomocí válečku. Přístroj byl nastaven na 25 V, 1 A a dobu 30 min. Membrána byla po dokončení promývána v TBS/T pufru (3 krát po dobu 5 min). Pro kontrolu byla v některých případech PVDF membrána následně obarvena pro vizualizaci proteinů roztokem Ponceau S. Po vymytí v ddH_2O a vysušení byla membrána rozstříhána dle molekulárního markeru na části, které obsahovaly zájmové proteiny. Po rehydratování v methanolu byla membrána přenesena do vany s blokovacím roztokem TBS/T/mléko. Vana byla přesunuta na třepačku na 1,5 h. Tímto krokem došlo k zabránění nespecifické interakce mezi membránou a protilátkou.

Primární protilátka byla naředěna v poměru 1:1000 s roztokem 5% albuminu. Inkubace probíhala v chladu přes noc a poté byla membrána vymyta v TBS/T (třikrát 5-7 min). Následovala aplikace sekundární protilátky ředěné v poměru 1:10000 s 5% roztokem BSA (výjimkou byla membrána s aplikací CoraLite® Plus 750-conjugated GAPDH). Membrána byla inkubována 1,5 h na třepačce.

Pro porovnání různé citlivosti detekce byla u dvou membrán využita chemiluminiscenční detekce a u jedné detekce fluorescenční. V obou případech byl využit systém pro chemiluminiscenční a epifluorescenční zobrazování Alliance Q9. Po aplikaci chemiluminiscenčního roztoku byla membrána snímána ihned. V případě fluorescenční detekce byla membrána nejprve vysušena ve tmě a teprve pak byla fluorescence nasnímána. Výhodou využití protilátek fluorescenčně značených je stabilita signálu.

Pomocí programu NineAlliance byla provedena denzitometrická analýza a data byla vyhodnocena v programu Microsoft Excel a Statistica.

3.3.7 Izolace RNA

Kultivované buňky linie H9c2 byly v 6jamkových deskách inkubovány s roztoky vybraných polyfenolů (1 $\mu mol \cdot l^{-1}$) po dobu 24 h. Po odstranění média proběhlo vymytí jamek ledovým PBS (4 °C). Pomocí buněčné škrabky byly buňky shrnuty do 1000 µl TRI Reagentu a homogenizovány vortexem. Po 5 min bylo přidáno do každé zkumavky 200 µl chloroformu a opět homogenizováno. Následně byly zkumavky centrifugovány 15 min (12000×g, 4 °C) a bylo nutné pečlivě odebrat horní vodnou fázi, která se centrifugací viditelně rozdělila. Do odebrané vodní fáze bylo přidáno vždy 500 µl isopropanolu. Poté proběhla 10min inkubace při pokojové teplotě a 10min centrifugace při 12000×g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a pelet promyt 75% ethanolem, skladovaném v - 20 °C. Po promíchání vortexem a centrifugaci (5 min, 7500×g, 4 °C) byla odebrána část ethanolu, a po zopakování centrifugace bylo rozpouštědlo pečlivě odsáto pipetou. Vysušený pelet byl rozpuštěn v 50 µl vody pro molekulární biologii. Vzorky byly uchovávány při -80 °C pro reverzní transkripci.

3.3.8 Reverzní transkripce

Před samotnou reakcí bylo potřeba změřit koncentraci RNA v jednotlivých vzorcích, připravených v předchozím kroku. Měření probíhalo na přístroji NanoPhotometer a hodnoty byly vypočítány v Microsoft Excel tak, aby celková RNA obsažená v 5 µl dosahovala po naředění 40 ng.

Pro reverzní transkripci byl použit kit a protokol od společnosti Applied Biosystems (s drobnými modifikacemi). Do reakce byl vždy přidán vzorek RNA, specifické primery a „Master Mix“. Složení tohoto roztoku je uvedeno v tabulce 2 a objemy komponentů potřebné pro jednu reakci v tabulce 3. Po napipetování

jednotlivých složek a promíchání na vortexu byly zkumavky vloženy do termobloku. Postupně byly přesouvány v definovaných intervalech do termobloků, nastavených na příslušnou teplotu. Jednotlivé časové intervaly a teploty jsou uvedeny v tabulce 4. Po provedení přepisu RNA do cDNA byly zkumavky uschovány a zamraženy na - 80 °C do druhého dne.

Tabulka 2: Složení roztoku Master Mix používaném pro reverzní transkripci.

Složka	Objem
dNTP mix	0,15 µl
Reverzní transkriptáza Multiscribe™	1,00 µl
Pufr pro reverzní transkripci	1,50 µl
Inhibitor RNáz	0,19 µl
Voda pro molekulární biologii	4,16 µl

Tabulka 3: Obsah jednotlivých složek reakce pro reverzní transkripci (15 µl).

Složka	Objem na reakci (15 µl)
Master Mix	7,00 µl
Specifický primer	3,00 µl
Vzorek RNA	5,00 µl

Tabulka 4: Nastavení jednotlivých teplot a intervalů pro reverzní transkripci.

Krok	Čas	Teplota
1	30 min	16 °C
2	30 min	42 °C
3	5 min	85 °C
4	∞	4 °C

3.3.9 Real-time kvantitativní PCR

Pomocí metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-qPCR) bylo možné detekovat a kvantifikovat množství miRNA ve vzorcích, prostřednictvím detekce fluorescenčního signálu, který vzniká během amplifikace cílové sekvence.

Pro analýzu byla využita sada a protokol TaqMan miRNA assay. Reakční směs byla připravena pečlivým napipetováním a důkladným smícháním jednotlivých potřebných složek, jejichž názvy a poměry jsou uvedeny v tabulce 5. Uvedené objemy odpovídají triplikátu, který byl následně napipetován do tří jamek. Vzhledem k fotosenzitivitě fluorescenčních sond proběhlo jejich přidání a další manipulace s nimi za tmy. Po nanesení všech vzorků na 96jamkovou desku, jejím krátkém promíchání

a centrifugaci byla deska vložena do termocykléru. Program amplifikace probíhal podle parametrů uvedených v tabulce 6.

Relativní kvantifikace exprese byla vypočítána v programu Microsoft Excel podle metody ΔΔCt (Pfaffl, 2001).

Tabulka 5: Obsah jednotlivých složek potřebných pro PCR reakci.

Složka	Objem pro triplikát (3×10µl)
TaqMan MicroRNA Assay	1,80 µl
Vzorek cDNA	2,40 µl
TaqMan univerzální PCR Master Mix II bez UNG	18,00 µl
Voda pro molekulární biologii	13,80 µl

Tabulka 6: Nastavení teplot a intervalů termocykléru.

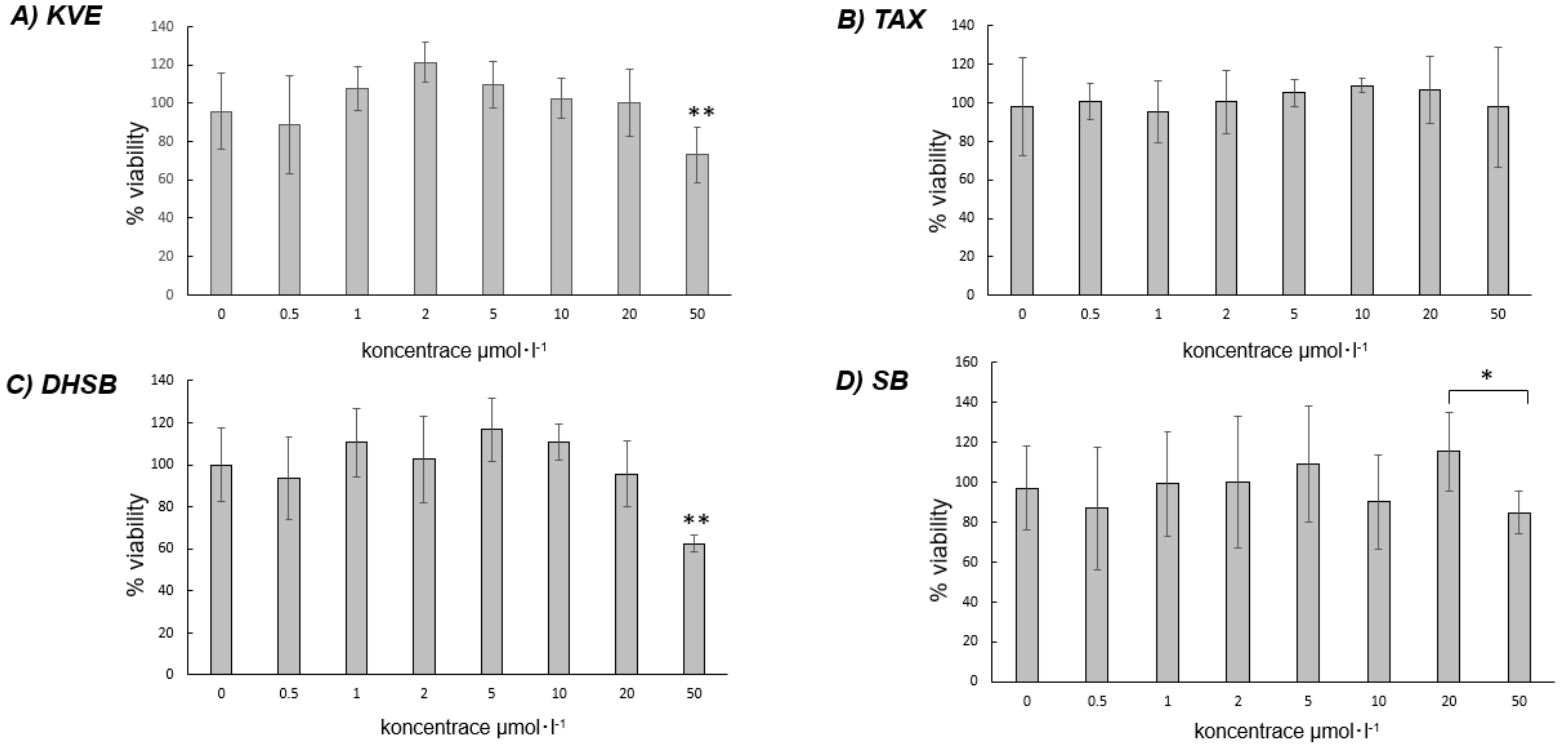
Krok	Aktivace enzymu	PCR (40 cyklů)	
	Inkubace	Denaturace	Nasedání/Prodloužení
Teplota	95 °C	95 °C	60 °C
Čas	10 min	15 s	60 s

3.4 Výsledky

3.4.1 MTT test cytotoxicity

Na základě výsledků uvedených na obrázku 7, který znázorňuje vliv působení kvercetinu, taxifolinu, dehydrosilybinu a silybinu na buňky H9c2 lze konstatovat, že žádná z těchto testovaných látek v koncentračním rozmezí 0,5-20 $\mu mol \cdot l^{-1}$ nevykazovala cytotoxické účinky. Viabilita buněk zůstala v tomto rozmezí srovnatelná s kontrolní skupinou či mírně vystoupala nad hranici 100 %. K poklesu viability došlo u většiny látek až při nejvyšší testované koncentraci 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Statisticky signifikantní pokles viability oproti kontrole ($p < 0,01$) byl zaznamenán u kvercetinu a dehydrosilybinu. U dehydrosilybinu byl efekt nejvýraznější (pokles na 63 %). Taxifolin se naopak jevil jako nejméně toxický, jelikož nebyla vykázána výrazná změna oproti kontrole ani při koncentraci 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$. V případě silybinu byl u nejvyšší koncentrace pozorován mírný klesající trend, který ovšem v porovnání s kontrolou nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. Statisticky signifikantní pokles viability ($p < 0,05$) byl ale zaznamenán u srovnání koncentrací 20 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$. To poukazuje na fakt, že silybin při koncentraci 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a výše, může vykazovat negativní účinky na viabilitu buněk, i přesto, že test neukázal tak výrazný pokles jako u dehydrosilybinu či kvercetinu. Z uvedených výsledků a ze závěrů diplomové práce Mgr. Zdeňka Dostála, Ph.D. z roku 2013, kde byla tato hodnota

identifikována jako fyziologicky relevantní koncentrace dosažitelná v krevním séru po konzumaci těchto látek, a zároveň limitní pro zachování protektivních účinků bez projevů cytotoxicity, bylo vyhodnoceno, že pro následující experimenty bude koncentrace všech látek pro inkubaci s buňkami 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$.



Obrázek 7: Stanovení viability buněk H9c2 po 24h inkubaci s testovanými látkami. (A–D) Grafické znázornění vlivu kvercetinu (A), taxifolinu (B), dehydrosilybinu (C) a silybinu (D). Buňky inkubovány s látkami v koncentračním rozmezí 0,5-50 µmol·l^{-1}. Kontrolní skupina 0 µmol·l^{-1}, ±SD, (n = 3). Statistická významnost vyhodnocena pomocí one-way ANOVA s využitím post-hoc testů (Tukey, Fisherův LSD). Značeno (p < 0,01) u kvercetinu (A) a dehydrosilybinu (C), (* p < 0,05) mezi koncentracemi 20 µmol·l^{-1} a 50 µmol·l^{-1} u silybinu (D).**

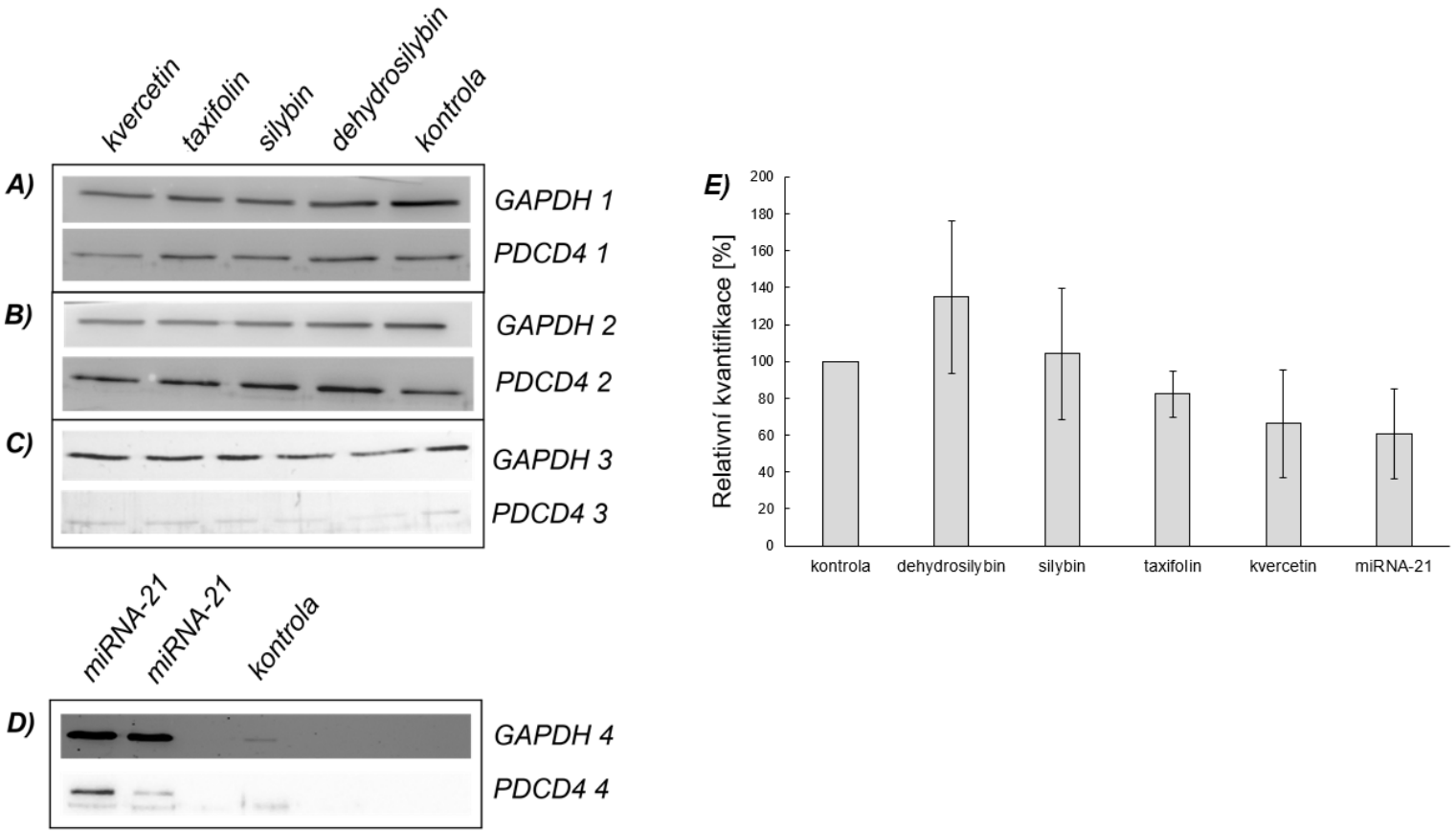
3.4.2 Western blot a imunodetekce

Vliv testovaných látek o koncentraci 1 μmol·l^{-1} na expresi proteinu PDCD4 v buněčné linii H9c2 je ukázán na obrázku 8. Byla provedena denzitometrická analýza na základě imunodetekovaných pruhů (obrázek 8 A-D) a vypočítána relativní kvantifikace (obrázek 8 E). Data byla normalizována k signálu referenčního proteinu (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) GAPDH.

Jako pozitivní kontrola snížení hladiny proteinu PDCD4 byly využity buňky transfekované miRNA-21 (obrázek 8 D). U těchto vzorků potvrdila relativní kvantifikace očekávaný pokles exprese proteinu PDCD4 na 60 % oproti kontrole (obrázek 8 E).

Na základě provedené statistické analýzy (one-way ANOVA, Fisherův LSD test) bylo zjištěno, že nedošlo k žádné signifikantní změně v expresi PDCD4 oproti kontrole u žádné z testovaných látek (kvercetin, taxifolin, silybin, dehydrosilybin). Nicméně z grafu na obrázku 8 E lze pozorovat odlišné působení flavonolignanů a zbývajících dvou látek, patřících do skupin flavonolů a flavanonolů. U silybinu a dehydrosilybinu byl sledován nárůst relativní abundance (104 % a 135 %). Kvercetin a taxifolin naopak ovlivňovaly expresi proteinu negativně, a relativní kvantifikace ukázala hodnoty 66 % a 82% oproti kontrole (100%). Pokud se zaměříme na strukturální podobnost, lze vidět, že oxidované formy zmíněných podobných párů látek vykazovaly výrazně větší modulaci proteinu PDCD4. Dehydrosilybin způsobil větší nárůst exprese než silybin. Obdobně tomu bylo také u kvercetinu, u kterého byl ukázán výraznější pokles exprese než u taxifolinu. Největší rozpětí bylo tedy pozorováno mezi dehydrosilybinem a kvercetinem.

Vysoké hodnoty znázorněných směrodatných odchylek (SD) ovšem ukazují poměrně vysokou variabilitu mezi jednotlivými opakováními. Ty lze pozorovat i na intenzitě pruhů na membráně (obrázek 8 A-D).

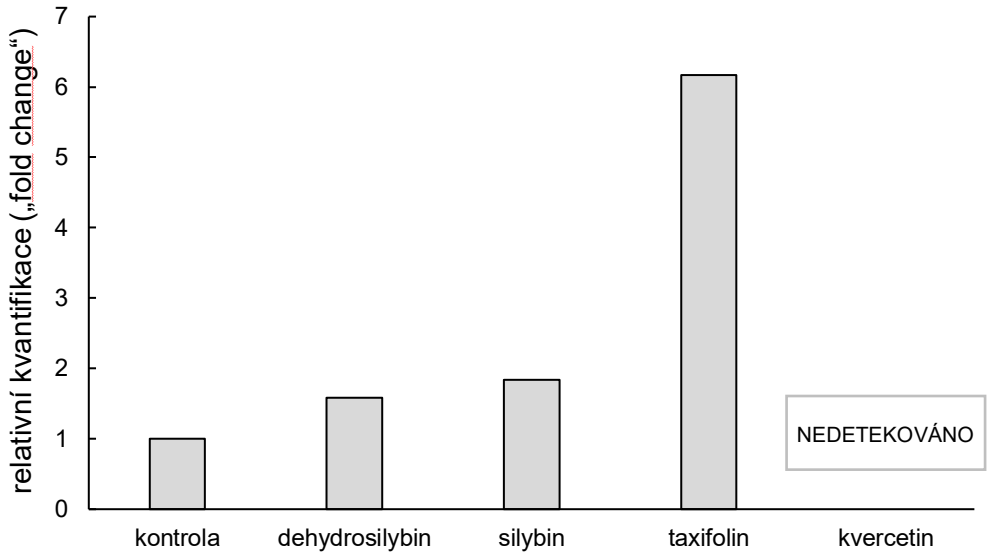


Obrázek 8: Analýza exprese proteinu PDCD4 metodou Western blot a relativní kvantifikace. (A–C) Imunodetekce PDCD4 a referenčního proteinu GAPDH. U membrán (A) a (B) využita chemiluminiscenční detekce, (C) detekce fluorescenční. Pořadí vzorků: kvercetin, taxifolin, silybin, dehydrosilybin a kontrola. (D) Imunodetekce PDCD4 a GAPDH u buněk transfekovaných miRNA-21 (chemiluminiscenční detekce), slouží jako pozitivní kontrola snížení hladiny proteinu. (E) Relativní exprese proteinu PDCD4 byla stanovena denzitometrickou analýzou. Data vztahována k signálu GAPDH a vyjádřena jako procentuální poměr vůči kontrolní skupině (100 %), ±SD, (n = 3; pro sloupec miRNA-21 n = 2).

3.4.3 RT-qPCR

Vliv vybraných polyfenolických látek o koncentraci 1 μmol·l^{-1} na expresi miRNA-208 v buněčné linii H9c2 je znázorněn na obrázku 9. Byla provedena RT-qPCR a vypočítána relativní kvantifikace, přičemž byla data normalizována k signálu referenční malé jaderné („small nuclear“) snRNA U6B.

Jelikož byla získána data vyhodnotitelná pouze z jednoho opakování, nebylo možné provést statistické zhodnocení. Přesto je na grafu (obrázek 9) ukázáno, že jednotlivé látky vykázaly určitý trend působení. U silybinu a dehydrosilybinu lze vidět nárůst relativní exprese na 1,8 a 1,6 vůči kontrole. Dvojice flavonolignanů tedy navyšovala expresi podobně. O mnoho výraznější je nárůst u taxifolinu na 6,2 násobek, zatímco u kvercetinu nebyl detekován žádný signál miRNA-208, pouze referenční U6B.



Obrázek 9: Analýza exprese miRNA-208 metodou RT-qPCR. Data vztahována k signálu U6B a vyjádřena jako relativní kvantifikace „fold change“ vůči kontrolní skupině (1), (n = 1).

4. DISKUSE

Původní hypotézou této experimentální práce bylo, že exprese isoforem miRNA-208 může být v kardiomyocytech ovlivněna čtyřmi testovanými polyfenolickými látkami. U kvercetinu, taxifolinu a silybinu byla schopnost posttranskripčně modulovat genovou expresi již dokázána. U dehydrosilybinu je tato schopnost předpokládána na základě jeho strukturní podobnosti. Jelikož je miRNA-208 přímým inhibitorem proapoptického proteinu PDCD4 (Wang et al., 2022), bylo očekáváno, že se modulace hladiny miRNA-208 polyfenoly projeví také na expresi tohoto proteinu.

Pro analýzy bylo nutné vybrat vhodnou netoxickou koncentraci látek, se kterými byly buňky H9c2 inkubovány. Na základě výsledků MTT testu bylo zjištěno, že testované koncentrace do 20 $\mu mol \cdot l^{-1}$ neměly negativní vliv na buněčnou viabilitu. Pouze u 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$ došlo k poklesu životaschopnosti buněk, v případě tří látek dokonce signifikantnímu. Výběr pracovní koncentrace vycházel hlavně z diplomové práce Mgr. Zdeňka Dostála, Ph.D., kde je popsáno, že je 1$\mu mol \cdot l^{-1}$ koncentrace dosažitelná v krevním séru po perorální konzumaci látek, a zároveň je limitní pro zachování protektivních účinků bez projevů cytotoxicity.

U buněk H9c2 inkubovaných s kvercetinem ukázaly výsledky imunodetekce podobné snížení exprese PDCD4 jako u pozitivní kontroly (miRNA-21). Předpokládaný mechanismus osy miRNA-208/PDCD4 se ale u této látky nepotvrdil. Metodou RT-qPCR se totiž nepodařilo detekovat hladinu miRNA-208, to ukazuje rozpor se studií Wang et al. z roku 2022, kde byla hladina miRNA-208 u stejného buněčného modelu detekována. Rozdíl mohl spočívat ve fenotypových odlišnostech linie H9c2, kdy se buňky vlivem pasážování mohly lišit fyziologickým stavem. Pokles hladiny proteinu PDCD4 byl pravděpodobně způsoben odlišnou dráhou. Jelikož kvercetin moduluje buněčné kinázové kaskády jako je PI3K/Akt či MAPK (Mansuri et al., 2014), může být sledovaný pokles způsoben fosforylací a následnou degradací proteinu. Dalším možným vysvětlením je ovlivnění exprese miRNA-21 kvercetinem, kdy by se jednalo o navýšení exprese této miRNA. To je však v rozporu s publikovanými daty, kdy kvercetin inhiboval navýšení miRNA-21 vyvolanou Cr^{6+} (Pratheeshkumar et al., 2016).

Taxifolin má naopak potenciál ovlivnit osu miRNA-208/PDCD4, jelikož pozorovaný nárůst exprese miRNA-208 koreloval s poklesem hladiny proteinu PDCD4. Ve studii Lin & Wang z roku 2023 bylo dokázáno zvýšení hladiny jiné miRNA vlivem taxifolinu, konkrétně miRNA-200a v kardiomyocytech, jež mělo za následek zabránění

specifické buněčné smrti a stimulaci antioxidační dráhy Nrf2. Lze tedy usoudit, že kardioprotektivní a antiapoptický potenciál taxifolinu může být zprostředkován i modulací této regulační dráhy.

Flavonolignany silybin a dehydrosilybin vykazovaly dle vyhodnocení metody RT-qPCR velmi mírný nárůst exprese miRNA-208. Nebyl ale detekován očekávaný pokles hladiny PDCD4, ta naopak vzrostla, výrazněji u silybinu. To ukazuje, že vliv miRNA-208 na expresi proteinu je pravděpodobně překonán posttranslační modifikací. U silybinu například schopností blokovat dráhy ERK1/2 nebo Akt (Anestopoulos et al.,2013), jež způsobují degradaci proteinu. Vyšší expresi proteinu PDCD4, kterou vykázal vzorek ovlivněný dehydrosilybinem může způsobit adaptivní stresová odpověď buněk na depolarizaci membrány, která je popsána ve studii Zholobenko et al. (2017). Buňka pod stresem stabilizuje PDCD4, aby zablokováním faktoru elF4A (Yang et al., 2003) utlumila proteosyntézu a energeticky tak optimalizovala funkce pro její přežití (Gabrielová et al., 2015a). Není tedy v tomto případě potvrzena hypotéza regulace PDCD4 prostřednictvím miRNA-208.

U vyhodnocených výsledků metody Western blot byla zaznamenána vysoká variabilita mezi jednotlivými opakováními, což je viditelné na hodnotách směrodatných odchylek. To mohlo být způsobeno změnami fyziologických vlastností a senzitivity buněk linie H9c2 v průběhu kultivace, či fází buněčného cyklu, ve kterém se buňky nacházely. Příčinou mohla být také změna v čísle pasáže, jelikož došlo v průběhu experimentů ke kontaminaci inkubátoru a pro další experimenty tak byly použity buňky s jiným číslem pasáže.

Pro vizualizaci proteinů na PVDF membráně byly v průběhu práce využity a porovnány dvě metody detekce, chemiluminiscenční a fluorescenční. Chemiluminiscenční metoda je citlivější a z hlediska zobrazení bylo kvalitnější ze snímků provést denzitometrickou analýzu. Fluorescenční detekční metoda má výhodu ve stabilitě signálu, ovšem při snímání docházelo k nežádoucímu přesvícení molekulárního markeru, což znesnadnilo vyhodnocení. Tento nedostatek se však dá vylepšit volbou kompatibilního markeru nebo jeho překrytím při detekci.

Analýza exprese miRNA-208a metodou RT-qPCR ukázala velmi slabé detekované fluorescenční signály, což může být ukazatelem toho, že bazální exprese miRNA-208a je v buňkách H9c2 velmi nízká. Důvodem mohly být ale i velmi malé chyby při pipetování reakčních směsí, jelikož je tato metoda velmi citlivá, zvláště u málo exprimovaných molekul.

Pro jednoznačné relevantní výsledky by bylo vhodnější metodu Western blot optimalizovat použitím vzorků buněk se stejným číslem pasáže a použít stejnou detekční metodu. U analýzy pomocí RT-qPCR by bylo přínosné optimalizovat protokol nebo ověřit přítomnost miRNA-208a v buňkách H9c2 pomocí jiné nezávislé metody detekce.

5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnotit vliv vybraných polyfenolů na expresi miRNA-208a v buněčné linii H9c2. MTT testem byla nejprve vyhodnocena koncentrace 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$ u všech čtyř látek jako vhodná pro následující experimenty. Signifikantní pokles buněčné viability byl pozorován až při inkubaci s koncentrací 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$ v případě kvercetinu, silybinu a dehydrosilybinu signifikantní.

Výsledky imunodetekce proteinu PDCD4 neprokázaly signifikantní změny vůči kontrole, ovšem byly pozorovány trendy působení. Flavonolignany silybin a dehydrosilybin způsobily zvýšení exprese proteinu PDCD4 na 104 % a 135 %. Kvercetin a taxifolin ji naopak snižovali (66 % a 82 %). Pozorována byla výraznější modulace hladiny proteinu oxidovanými formami podobných dvojic látek.

Analýzou exprese miRNA-208a pomocí RT-qPCR bylo zjištěno, že relativní exprese je mírně zvýšená u vzorků se silybinem a dehydrosilybinem (1,8 násobek a 1,6 násobek). Taxifolin naopak expresi zvýšil na 6,2 násobek, u vzorku ošetřeném kvercetinem nebyl detekován žádný signál.

Lze konstatovat, že hypotéza předpokládající modulační vliv testovaných látek na expresi miRNA-208a a následnou změnu hladiny proteinu PDCD4 byla potvrzena pouze v případě taxifolinu, kdy nárůst exprese miRNA-208a koreloval se současným snížením exprese PDCD4. U silybinu a dehydrosilybinu potvrzena být nemůže, jelikož tento vztah z výsledků nevyplývá. Zajímavé zjištění ukázaly výsledky kvercetinu, kdy došlo k největšímu poklesu hladiny PDCD4, ale očekávané navýšení exprese miRNA-208a nebylo detekováno, naopak došlo k úplnému vymizení této miRNA. To poukazuje na jiný mechanismus působení kvercetinu, tím pádem na možnost dalšího výzkumu v této oblasti.

6. LITERATURA

Ajuyah, P., Hill, M., Ahadi, A., Lu, J., Hutvagner, G., & Tran, N. (2019). MicroRNA (miRNA)-to-miRNA Regulation of Programmed Cell Death 4 (PDCD4). *Molecular and Cellular Biology*, *39*(18), e00086-19. https://doi.org/10.1128/MCB.00086-19

Akbari Kordkheyli, V., Khonakdar Tarsi, A., Mishan, M. A., Tafazoli, A., Bardania, H., Zarpou, S., & Bagheri, A. (2019). Effects of quercetin on microRNAs: A mechanistic review. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(8), 12141–12155. https://doi.org/10.1002/jcb.28663

Anestopoulos, I., Kavo, A., Tentes, I., Kortsaris, A., Panayiotidis, M., Lazou, A., & Pappa, A. (2013). Silibinin protects H9c2 cardiac cells from oxidative stress and inhibits phenylephrine-induced hypertrophy: Potential mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(3), 586–594. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.02.009

Angeloni, C., Leoncini, E., Malaguti, M., Angelini, S., Hrelia, P., & Hrelia, S. (2008). Role of quercetin in modulating rat cardiomyocyte gene expression profile. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *294*(3), H1233–H1243. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01091.2007

Asangani, I. A., Rasheed, S. A. K., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S., & Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, *27*(15), 2128–2136. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210856

Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, *173*(1), 20–51. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, *409*(6818), 363–366. https://doi.org/10.1038/35053110

Dostál, Z. (2013). Vliv přírodních látek na expresi mikroRNA v buněčné linii HepG2 [Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci].

Dostál, Z. & Modriansky, M. (2019). The effect of quercetin on microRNA expression: A critical review. *Biomedical Papers*, *163*(2), 95–106. https://doi.org/10.5507/bp.2019.030

Dostál, Z., Sebera, M., Srovnal, J., Staffova, K., & Modriansky, M. (2021). Dual Effect of Taxifolin on ZEB2 Cancer Signaling in HepG2 Cells. *Molecules*, *26*(5), 1476. https://doi.org/10.3390/molecules26051476

Dostál, Z., Zholobenko, A. V., Přichystalová, H., Gottschalk, B., Valentová, K., Malli, R., & Modrianský, M. (2024). Quercetin protects cardiomyoblasts against hypertonic cytotoxicity by abolishing intracellular Ca2+ elevations and mitochondrial depolarisation. *Biochemical Pharmacology*, *222*, 116094. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116094

Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, *33*(9), 2221–2243. https://doi.org/10.1002/ptr.6419

Frankel, L. B., Christoffersen, N. R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A., & Lund, A. H. (2008). Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an Important Functional Target of the MicroRNA miR-21 in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(2), 1026–1033. https://doi.org/10.1074/jbc.M707224200

Gabrielová, E., Bartošíková, L., Nečas, J., & Modrianský, M. (2019). Cardioprotective effect of 2,3-dehydrosilybin preconditioning in isolated rat heart. *Fitoterapia*, *132*, 12–21. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.10.028

Gabrielová, E., Jabůrek, M., Gažák, R., Vostálová, J., Ježek, J., Křen, V., & Modrianský, M. (2010). Dehydrosilybin attenuates the production of ROS in rat cardiomyocyte mitochondria with an uncoupler-like mechanism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *42*(6), 499–509. https://doi.org/10.1007/s10863-010-9319-2

Gabrielová, E., Křen, V., Jabůrek, M., & Modrianský, M. (2015a). Silymarin Component 2,3-dehydrosilybin Attenuates Cardiomyocyte Damage Following Hypoxia/Reoxygenation by Limiting Oxidative Stress. *Physiological Research*, 79–91. https://doi.org/10.33549/physiolres.932703

Gabrielová, E., Zholobenko, A. V., Bartošíková, L., Nečas, J., & Modriansky, M. (2015b). Silymarin Constituent 2,3-Dehydrosilybin Triggers Reserpine-Sensitive Positive Inotropic Effect in Perfused Rat Heart. *PLOS ONE*, *10*(9), e0139208. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139208

Gebert, L. F. R. & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(1), 21–37. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7

Guo, H., Zhang, X., Cui, Y., Zhou, H., Xu, D., Shan, T., Zhang, F., Guo, Y., Chen, Y., & Wu, D. (2015). Taxifolin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *287*(2), 168–177. https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.06.002

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*, *404*(6775), 293–296. https://doi.org/10.1038/35005107

Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., & Schultz, G. (1991). Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circulation Research*, *69*(6), 1476–1486. https://doi.org/10.1161/01.RES.69.6.1476

Huang, S., Wu, C., & Yen, G. (2006). Effects of flavonoids on the expression of the pro-inflammatory response in human monocytes induced by ligation of the receptor for AGEs. *Molecular Nutrition & Food Research*, *50*(12), 1129–1139. https://doi.org/10.1002/mnfr.200600075

Huang, X.-H., Li, J.-L., Li, X.-Y., Wang, S.-X., Jiao, Z.-H., Li, S.-Q., Liu, J., & Ding, J. (2021). miR-208a in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *8*, 773314. https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.773314

Huang, Y., & Li, J. (2015). MicroRNA208 family in cardiovascular diseases: Therapeutic implication and potential biomarker. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *71*(3), 479–486. https://doi.org/10.1007/s13105-015-0409-9

Chen, Y.-H., Lin, H., Wang, Q., Hou, J.-W., Mao, Z.-J., & Li, Y.-G. (2020). Protective role of silibinin against myocardial ischemia/reperfusion injury-induced cardiac dysfunction. *International Journal of Biological Sciences*, *16*(11), 1972–1988. https://doi.org/10.7150/ijbs.39259

Kadoglou, N. P. E., Panayiotou, C., Vardas, M., Balaskas, N., Kostomitsopoulos, N. G., Tsaroucha, A. K., & Valsami, G. (2022). A Comprehensive Review of the Cardiovascular Protective Properties of Silibinin/Silymarin: A New Kid on the Block. *Pharmaceuticals*, *15*(5), 538. https://doi.org/10.3390/ph15050538

Kelly G. S. (2011). Quercetin. Monograph. Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic, 16(2), 172–194.

Kimes, B. & Brandt, B. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental Cell Research*, *98*(2), 367–381. https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90447-X

Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S., & Grimm, M. (2015). H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1853*(2), 276–284. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.015

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853–858. https://doi.org/10.1126/science.1064921

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, *75*(5), 843–854. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (b.r.). *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*.

Liehr, T., Kankel, S., Hardt, K. S., Buhl, E. M., Noels, H., Keller, D. T., Schröder-Lange, S. K., & Weiskirchen, R. (2025). Genetic and Molecular Characterization of H9c2 Rat Myoblast Cell Line. *Cells*, *14*(7), 502. https://doi.org/10.3390/cells14070502

Lin, Z. & Wang, J. (2023). Taxifolin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity and ferroptosis by adjusting microRNA-200a-mediated Nrf2 signaling pathway. *Heliyon*, *9*(11), e22011. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22011

Liu, Y., Shi, X., Tian, Y., Zhai, S., Liu, Y., Xiong, Z., & Chu, S. (2023). An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin. *Frontiers in Pharmacology*, *14*, 1173855. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1173855

Lu, D. & Thum, T. (2019). RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(11), 661–674. https://doi.org/10.1038/s41569-019-0218-x

Mandour, G. H., El-Dessouki, A. M., Attallah, K. A., Seliem, M. A., Abdullah, A. R., Khidr, E. G., El-Husseiny, A. A., El-Shiekh, R. A., Hafez, M. M., & Khalifa, H. O. (2026). Exploring the therapeutic potential of naturally occurring taxifolin, a dietary flavonoid: An updated comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*, *17*, 1780792. https://doi.org/10.3389/fphar.2026.1780792

Mansuri, M. L., Parihar, P., Solanki, I., & Parihar, M. S. (2014). Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes & Nutrition*, *9*(3), 400. https://doi.org/10.1007/s12263-014-0400-z

Matsuhashi, S., Manirujjaman, M., Hamajima, H., & Ozaki, I. (2019). Control Mechanisms of the Tumor Suppressor PDCD4: Expression and Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 2304. https://doi.org/10.3390/ijms20092304

Mekala, N., Kurdys, J., Vicenzi, A. P., Weiler, L. R., Avramut, C., Vazquez, E. J., Ragina, N., & Rosca, M. G. (2021). MiR 208a Regulates Mitochondrial Biogenesis in Metabolically Challenged Cardiomyocytes. *Cells*, *10*(11), 3152. https://doi.org/10.3390/cells10113152

Milenkovic, D., Deval, C., Gouranton, E., Landrier, J.-F., Scalbert, A., Morand, C., & Mazur, A. (2012). Modulation of miRNA Expression by Dietary Polyphenols in apoE Deficient Mice: A New Mechanism of the Action of Polyphenols. *PLoS ONE*, *7*(1), e29837. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029837

Montgomery, R. L., Hullinger, T. G., Semus, H. M., Dickinson, B. A., Seto, A. G., Lynch, J. M., Stack, C., Latimer, P. A., Olson, E. N., & Van Rooij, E. (2011). Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure. *Circulation*, *124*(14), 1537–1547. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030932

Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, *14*(6), 2202–2211. https://doi.org/10.3390/molecules14062202

Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research, 29(9), e45. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45

Prabhu, S., Molath, A., Choksi, H., Kumar, S., & Mehra, R. (2021). Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. *International Journal of Physiology, Nutrition and Physical Education*, *6*(1), 293–301. https://doi.org/10.22271/journalofsport.2021.v6.i1e.2236

Pratheeshkumar, P., Son, Y.-O., Divya, S. P., Wang, L., Turcios, L., Roy, R. V., Hitron, J. A., Kim, D., Dai, J., Asha, P., Zhang, Z., & Shi, X. (2017). Quercetin inhibits Cr(VI)-induced malignant cell transformation by targeting miR-21-PDCD4 signaling pathway. *Oncotarget*, *8*(32), 52118–52131. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10130

Sarg, N. H., Hersi, F. H., Zaher, D. M., Hamouda, A. O., Ibrahim, S. I., El-Seedi, H. R., & Omar, H. A. (2024). Unveiling the therapeutic potential of Taxifolin in Cancer:

From molecular mechanisms to immune modulation and synergistic combinations. *Phytomedicine*, *133*, 155934. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155934

Satoh, M., Minami, Y., Takahashi, Y., Tabuchi, T., & Nakamura, M. (2010). Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *Journal of cardiac failure*, *16*(5), 404–410. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.01.002

Shibahara, K., Asano, M., Ishida, Y., Aoki, T., Koike, T., & Honjo, T. (1995). Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. *Gene*, *166*(2), 297–301. https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00607-9

Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., & Al-Hiary, M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International*, *102*(5), 1397–1400. https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133

Spilková, J. (2023). Farmakognozie (2. vyd.). Karolinum.

Tang, Z., Yang, C., Zuo, B., Zhang, Y., Wu, G., Wang, Y., & Wang, Z. (2019). Taxifolin protects rat against myocardial ischemia/reperfusion injury by modulating the mitochondrial apoptosis pathway. *PeerJ*, *7*, e6383. https://doi.org/10.7717/peerj.6383

Tian, H., Cheng, L., Liang, Y., Lei, H., Qin, M., Li, X., & Ren, Y. (2024). MicroRNA therapeutic delivery strategies: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *93*, 105430. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105430

Tresserra-Rimbau, A., Rimm, E. B., Medina-Remón, A., Martínez-González, M. A., López-Sabater, M. C., Covas, M. I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M. A., Gea, A., Ruiz-Gutiérrez, V., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (2014). Polyphenol intake and mortality risk: A re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Medicine*, *12*(1), 77. https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-77

Trouillas, P., Marsal, P., Svobodová, A., Vostálová, J., Gažák, R., Hrbáč, J., Sedmera, P., Křen, V., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L., & Walterová, D. (2008). Mechanism of the Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry A*, *112*(5), 1054–1063. https://doi.org/10.1021/jp075814h

Tu, Y., Wan, L., Fan, Y., Wang, K., Bu, L., Huang, T., Cheng, Z., & Shen, B. (2013). Ischemic Postconditioning-Mediated miRNA-21 Protects against Cardiac

ischemia/reperfusion Injury via PTEN/Akt Pathway. *PLoS ONE*, *8*(10), e75872. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075872

Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., & Olson, E. N. (2007). Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science*, *316*(5824), 575–579. https://doi.org/10.1126/science.1139089

Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. E. (2010). Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*, *2*(11), 1106–1131. https://doi.org/10.3390/nu2111106

Wang, G.-K., Zhu, J.-Q., Zhang, J.-T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.-W., & Jing, Q. (2010). Circulating microRNA: A novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European Heart Journal*, *31*(6), 659–666. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq013

Wang, Q., Zhou, H., Zhu, X., Jiang, F., Yu, Q., Zhang, J., & Ji, Y. (2022). miR-208 inhibits myocardial tissues apoptosis in mice with acute myocardial infarction by targeting inhibition of PDCD4. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *36*(12), e23202. https://doi.org/10.1002/jbt.23202

Wang, Y.-H., Wang, W.-Y., Chang, C.-C., Liou, K.-T., Sung, Y.-J., Liao, J.-F., Chen, C.-F., Chang, S., Hou, Y.-C., Chou, Y.-C., & Shen, Y.-C. (2006). Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation. *Journal of Biomedical Science*, *13*(1), 127–141. https://doi.org/10.1007/s11373-005-9031-0

Watkins, S. J., Borthwick, G. M., & Arthur, H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *47*(2), 125–131. https://doi.org/10.1007/s11626-010-9368-1

Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell, 75(5), 855–862. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4

Yang, H.-S., Jansen, A. P., Komar, A. A., Zheng, X., Merrick, W. C., Costes, S., Lockett, S. J., Sonenberg, N., & Colburn, N. H. (2003). The Transformation Suppressor Pdcd4 Is a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A Binding Protein That Inhibits Translation. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(1), 26–37. https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.26-37.2003

Zappavigna, S., Vanacore, D., Lama, S., Potenza, N., Russo, A., Ferranti, P., Dallio, M., Federico, A., Loguercio, C., Sperlongano, P., Caraglia, M., & Stiuso, P. (2019). Silybin-Induced Apoptosis Occurs in Parallel to the Increase of Ceramides Synthesis and miRNAs Secretion in Human Hepatocarcinoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 2190. https://doi.org/10.3390/ijms20092190

Zhang, X.-T. & Xu, M.-G. (2021). Potential link between microRNA-208 and cardiovascular diseases. *Journal of Xiangya Medicine*, *6*, 12–12. https://doi.org/10.21037/jxym-21-8

Zholobenko, A. V., Mouithys-Mickalad, A., Dostal, Z., Serteyn, D., & Modriansky, M. (2017). On the causes and consequences of the uncoupler-like effects of quercetin and dehydrosilybin in H9c2 cells. *PLOS ONE*, *12*(10), e0185691. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185691

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ApoE	(„Apolipoprotein E“) Apolipoprotein E
BCA	(„Bicinchoninic Acid“) Kyselina bicinchoninová
Bcl-2	(„B-cell Lymphoma 2“) B-buněčný lymfom 2
BSA	(„Bovine Serum Albumin“) Hovězí sérový albumin
COX-2	(„Cyclooxygenase-2“) Cyklooxygenáza-2
CRISPR/Cas9	(„Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated Protein 9“) Klastrované pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice/Protein 9 asociovaný s CRISPR
DGCR8	(„DiGeorge Syndrome Critical Region 8“) Protein kritického regionu 8 DiGeorgova syndromu
DMEM	(„Dulbecco's Modified Eagle Medium“) Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium
DMSO	(„Dimethyl Sulfoxide“) Dimethylsulfoxid
DTT	(„Dithiothreitol“) Dithiothreitol
eIF4A	(„Eukaryotic Initiation Factor 4A“) Eukaryotický iniciační faktor 4A
eIF4A1	(„Eukaryotic Initiation Factor 4A-I“) Eukaryotický iniciační faktor 4A1
eIF4A2	(„Eukaryotic Initiation Factor 4A-II“) Eukaryotický iniciační faktor 4A2
eIF4F	(„Eukaryotic Initiation Factor 4F“) Translační iniciační komplex eIF4F
eIF4G	(„Eukaryotic Initiation Factor 4G“) Eukaryotický iniciační faktor 4G
eNOS	(„Endothelial Nitric Oxide Synthase“) Endoteliální syntáza oxidu dusnatého
ERK1/2	(„Extracellular Signal-regulated Kinases 1/2“) Extracelulárním signálem regulované kinázy 1/2
FBS	(„Fetal Bovine Serum“) Fetální hovězí sérum
FISH	(„Fluorescence In Situ Hybridization“) Fluorescenční in situ hybridizace
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
HUVEC	(„Human Umbilical Vein Endothelial Cells“) Endoteliální buňky lidské pupečníkové žíly
iNOS	(„Inducible Nitric Oxide Synthase“) Inducibilní syntáza oxidu dusnatého
MAPK	(„Mitogen-Activated Protein Kinase“) Mitogenem aktivovaná proteinkináza
miRNA	(„MicroRNA“) MikroRNA

miRNA-208	(„MicroRNA-208“) MikroRNA-208
mRNA	(„Messenger RNA“) Mediátorová RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
Myh6	(„Myosin Heavy Chain 6“) Těžký řetězec myosinu 6
Myh7	(„Myosin Heavy Chain 7“) Těžký řetězec myosinu 7
NEAA	(„Non-Essential Amino Acids“) Neesenciální aminokyseliny
NF-κB	(„Nuclear Factor Kappa B“) Jaderný faktor kappa B
Nrf-2	(„Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2“) Jaderný faktor spojený s erytroidním faktorem 2
PBS	(„Phosphate-buffered Saline“) Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok
PDCD4	(„Programmed Cell Death Protein 4“) Protein programované buněčné smrti 4
PI3K/Akt	(„Phosphoinositide 3-kinase/Protein Kinase B“) Fosfoinositid-3-kináza/Proteinkináza B
pPKCε	(„Phosphorylated Protein Kinase C Epsilon“) Fosforylovaná proteinkináza C epsilon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RISC	(„RNA-induced Silencing Complex“) RNA-indukovaný umlčovací komplex
RNU6B	(„RNA U6 Small Nuclear 2“) Malá jaderná RNA U6B
ROS	(„Reactive Oxygen Species“) Reaktivní formy kyslíku
RT-qPCR	(„Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“) Kvantitativní polymerázová řetězcová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase
SD	(„Standard Deviation“) Směrodatná odchylka
SDS	(„Sodium Dodecyl Sulfate“) Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	(„Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis“) Polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíranem sodným
snRNA	(„Small Nuclear RNA“) Malá jaderná RNA
TBS	(„Tris-buffered Saline“) Trisem pufrovaný fyziologický roztok
TRBP	(„Transactivation Response Element RNA-binding Protein“) Transaktivací indukovaný RNA-vazebný protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
α-MHC	(„Alpha-Myosin Heavy Chain“) Alfa-myosin těžkého řetězce

β-MHC („Beta-Myosin Heavy Chain“) Beta-myosin těžkého řetězce