

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Studium inhibice sodno-draselné ATPasy rostlinnými extrakty a jejich antiproliferační aktivity**

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Tomáš Heger</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.</b>
Konzultant:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval 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 jsem seznámen 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 13. 5. 2019

Tomáš Heger

## **Poděkování**

Velmi děkuji své vedoucí Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za veškerou pomoc s vypracováním práce, za cenné konzultace a předané zkušenosti. Poděkování patří také Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D., který mě vedl při práci s extrakty, a doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D., který se mi věnoval v problematice sodno-draselné ATPasy. Děkuji také Olze Hustákové a Evě Hrdličkové za výpomoc s buněčnými kulturami, Mgr. Lucii Slobodianové za pomoc při zpracování rostlinného materiálu, Bc. Tereze Štenclové a Mgr. Alžbetě Kubištelové za pomoc s izolací sodno-draselné ATPasy a měřením ATPasové aktivity. V neposlední řadě děkuji také své rodině za podporu v průběhu studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tomáš Heger
Název práce	Studium inhibice sodno-draselné ATPasy rostlinnými extrakty a jejich antiproliferační aktivity
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Sodno-draselná ATPasa (dále jako NKA, EC 7.2.2.13) je translokasa přenášející sodné a draselné ionty přes cytoplasmatickou membránu, ale účastní se také méně prozkoumané signalizace významné mimo jiné i v nádorové biologii. V bakalářské práci je v teoretické části řešena problematika transportní a signalizační funkce NKA, dále jsou také rozebrány poznatky o inhibitech NKA a fytochemii vztahující se k druhům rostlin zkoumaným v rámci praktické části – violka vonná (*Viola odorata* L.), udatna lesní (*Aruncus vulgaris* Rafin) a vrbka úzkolistá (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub).

V praktické části práce byla popsána izolace NKA a byly identifikovány frakce extraktů zmíněných rostlin, u kterých byl poprvé v této práci prokázán inhibiční účinek v NKA. Byla stanovena střeň účinná koncentrace ( $EC_{50}$ ) celkových extraktů a známého inhibitoru NKA ouabainu v testech cytotoxického účinku v buněčných kulturách odvozených od lidských kožních fibroblastů (BJ), chronické myelogenní leukemie (K562), akutní lymfoblastické leukemie (CCRF-CEM), cervikálního adenokarcinomu (HeLa) a prsního adenokarcinomu (MCF7). Nakonec byl také studován v závislosti na čase a koncentraci vliv ouabainu na hladinu vybraných signálních a apoptotických proteinů v buněčné linii K562. Proteinové markery probíhající apoptosy v linii K562 byly detekovány po 24h inkubaci buněk s ouabainem v koncentraci  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Klíčová slova	sodno-draselná ATPasa, <i>Viola odorata</i> , <i>Aruncus vulgaris</i> , <i>Chamerion angustifolium</i> , extrakt, ouabain, apoptosa, cytotoxicita
Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tomáš Heger
Title	Study of Inhibition of Sodium-Potassium ATPase by Plant Extracts and Their Antiproliferative Activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

Sodium-potassium ATPase (further referred to as NKA, EC 7.2.2.13) is a translocase transporting sodium and potassium ions across the cell membrane but is also involved in less known signalling with importance, *inter alia*, in cancer cell biology. In the theoretical part of the bachelor's thesis, transporter and signal transduction function of NKA, scientific findings concerning NKA inhibitors and phytochemistry of plant species investigated in the practical part: sweet violet (*Viola odorata* L.); bride's feathers (*Aruncus vulgaris* Rafin); and fireweed (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub) are described.

In the practical part of the bachelor's thesis, isolation of NKA and identification of fractions of extracts from above mentioned plant species with firstly discovered NKA inhibitory activity were described. Cytotoxicity assay was performed to determine the half maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) of the plant extracts and ouabain, known NKA inhibitor, in cell cultures derived from human skin fibroblasts (BJ), chronic myelogenous leukaemia (K562), acute lymphoblastic leukaemia (CCRF-CEM), cervical adenocarcinoma (HeLa) and breast adenocarcinoma (MCF7). Finally, concentration and time dependent manner of ouabain effect on selected signalling or apoptotic proteins in K562 cell line was investigated. After 24 h of incubation with 100 nmol·l<sup>-1</sup> ouabain, apoptotic markers in K562 cell line were detected.

Keywords	sodium-potassium ATPase, <i>Viola odorata</i> , <i>Aruncus vulgaris</i> , <i>Chamerion angustifolium</i> , extract, ouabain, apoptosis, cytotoxicity
Number of pages	77
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>9</b>
2.1	Sodno-draselná ATPasa jako enzym	9
2.1.1	Struktura sodno-draselné ATPasy	10
2.1.2	Katalytický cyklus sodno-draselné ATPasy	11
2.2	Sodno-draselná ATPasa jako signální protein	13
2.2.1	Fyziologický význam	13
2.2.2	Biochemický a molekulárně biologický význam	15
2.3	Inhibitory sodno-draselné ATPasy	22
2.3.1	Bufadienolidy	23
2.3.2	Kardenolidy	24
2.3.3	Ostatní inhibitory sodno-draselné ATPasy	25
2.4	Současné fytochemické poznatky o rostlinných druzích zkoumaných v praktické části	26
2.4.1	Violka vonná ( <i>Viola odorata</i> L.)	26
2.4.2	Vrbka úzkolistá ( <i>Chamerion angustifolium</i> (L.) Holub)	27
2.4.3	Udatna lesní ( <i>Aruncus vulgaris</i> Rafin)	28
<b>3</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b>	<b>29</b>
3.1	Chemikálie a potřeby pro buněčné kultury	29
3.2	Přístrojové vybavení	30
3.3	Spotřební materiál a ostatní vybavení	32
3.4	Biologický materiál	32
3.5	Metody	33
3.5.1	Zpracování a homogenizace rostlinného materiálu	33
3.5.2	Příprava rostlinných extraktů	33
3.5.3	Frakcionace rostlinných extraktů	34
3.5.4	Kultivace buněk	36
3.5.5	Test cytotoxicity – stanovení buněčné viability resazurinovým testem	36
3.5.6	Ovlivnění, sklizení a lyzace buněk	38
3.5.7	SDS-PAGE a tankový western blotting	40
3.5.8	Imunodetekce proteinů na membráně	41
3.5.9	Izolace sodno-draselné ATPasy	44
3.5.10	Optimalizace koncentrace SDS a purifikace sodno-draselné ATPasy z mikrosomů	45
3.5.11	Stanovení čistoty vyizolované sodno-draselné ATPasy metodou SDS-PAGE	47
3.5.12	Upravená Baginského metoda měření ATPasové aktivity	48
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b>	<b>51</b>
4.1	Izolace sodno-draselné ATPasy	51
4.2	Inhibiční účinek vybraných rostlinných extraktů a jejich frakcí na ATPasovou aktivitu sodno-draselné ATPasy	53
4.3	Cytotoxická aktivita vybraných rostlinných extraktů	56
4.4	Cytotoxická aktivita ouabainu	59
4.5	Vliv ouabainu na hladinu vybraných proteinů zapojených do apoptosy nebo regulace buněčného cyklu v linii K562	62
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	<b>77</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

- 1) popis fyziologického významu sodno-draselné ATPasy a možností jejího farmakologického cílení
- 2) literární rešerše zaměřená na inhibitory sodno-draselné ATPasy
- 3) literární rešerše zaměřená na chemickou charakterizaci vybraných rostlinných extraktů pozitivních v testech biologické aktivity v experimentální části

### **Experimentální část**

- 1) příprava knihovny rostlinných extraktů
- 2) testování antiproliferační aktivity rostlinných extraktů v nádorových buněčných liniích prsního adenokarcinomu MCF7, cervikálního adenokarcinomu HeLa a chronické myelogenní leukemie K562 a v nenádorových lidských fibroblastech BJ
- 3) studium inhibičního působení rostlinných extraktů na ATPasovou aktivitu sodno-draselné ATPasy
- 4) frakcionace vybraných rostlinných extraktů následovaná testováním inhibičního účinku frakcí na sodno-draselnou ATPasu
- 5) studium účinku inhibitoru sodno-draselné ATPasy ouabainu na viabilitu buněčné linie chronické myelogenní leukemie K562 a ovlivnění markerů apoptosy a proliferace

## 1 ÚVOD

Sodno-draselná ATPasa (dále jako NKA, EC 7.2.2.13) je transmembránový enzym umístěný v cytoplasmatické membráně a složený ze dvou základních podjednotek ( $\alpha$  a  $\beta$ ), navíc může dále asociovat s třetí regulační podjednotkou (FXD protein). NKA je přítomna v každé živočišné buňce, které katalytickým cyklem přenosu tří sodných kationtů do extracelulárního prostoru a dvou draselných kationtů do intracelulárního prostoru udržuje na obou stranách membrány rozdíl koncentrací sodných a draselných kationtů (a) a také rozdíl nábojů (b), díky čemuž je zajištěn stabilní buněčný objem, sekundárně aktivní transport nebo třeba elektrická vzrušivost buňky v případě nervových či svalových buněk (Kaplan, 2002).

Bylo zjištěno, že NKA funguje také jako signální protein. Potenciál inhibice NKA je spatřován zejména v oblastech ovlivnění procesů patogeneze nádorů, glaukomu, srdečně-cévních onemocnění, nervových onemocnění nebo třeba zánětů (Habeck *et al.*, 2016; Alevizopoulos *et al.*, 2014). V současnosti jsou v medicíně využívány inhibitory NKA pouze v léčbě srdečního selhání a arytmie. Strukturně se jedná výhradně o srdeční glykosidy. Nové inhibitory NKA však mají velký potenciál být objektem vývoje léčiv, což lze demonstrovat na příkladech některých v současnosti probíhajících klinických studií s oleandrovým extraktem nebo s molekulami cinobufotalin a RX108 zaměřujících se na protinádorové působení těchto látek (viz webové zdroje, AdisInsight).

Jednou z možností, jak nové inhibitory NKA nalézt, je testování přírodních produktů, mezi které patří i rostlinné extrakty. Ty mají při hledání nových biologicky aktivních molekul na rozdíl od knihoven chemicky čistých látek tu výhodu, že při jednom testování je ověřována aktivita velkého množství metabolitů najednou a navíc lze z evolučního hlediska očekávat vyšší pravděpodobnost biologické aktivity než v případě zcela nových člověkem vyrobených sloučenin. Na druhou stranu se zde naskýtá problém komplexní chemické analýzy části rostlinného metabolomu s cílem identifikovat v ideálním případě jednu aktivní látku, v čemž nám však v dnešní době pomáhají moderní instrumentální techniky analytické chemie.



## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Sodno-draselná ATPasa jako enzym

Sodno-draselná ATPasa (EC 7.2.2.13, dále uváděna jako NKA) je heterodimerní transmembránový protein s funkcí ATP hydrolyzující translokasy, která transportuje tři sodné ionty do extracelulárního prostoru a dva draselné ionty do intracelulárního prostoru. Díky tomu může docházet k tvorbě elektrického potenciálu (a) a dále koncentračního gradientu (b), resp. chemického potenciálu transportovaných iontů. Tyto potenciály jsou dále využívány například pro sekundárně aktivní transport nebo umožňují elektrickou vzrušivost svalů a nervů (Skou, 1998). Nezanedbatelná role NKA spočívá také v jejím podílu na termogenezi u živočichů (Clarke *et al.*, 2013).

NKA objevil roku 1957 Jens Christian Skou (Skou, 1957) v nervové tkáni kraba pobřežního (*Carcinus maenas*) jako ATPasu membránové frakce, která ke své aktivaci potřebuje hořečnaté, sodné a draselné ionty zároveň. Dále pozoroval kompetici draselných a sodných iontů a již zde je zmíněna myšlenka, že ATPasa se podílí na aktivním pumpování sodíku z nervových buněk. Robert L. Post a Philip C. Jolly v téže roce publikovali práci popisující stechiometrii přenosu sodných a draselných iontů při aktivním transportu na modelu erytrocytů (Post a Jolly, 1957). Post sdělil při osobním setkání Skouovi, že aktivní transport sodných a draselných iontů je inhibován ouabainem, a dotázal se ho, zda k tomuto dochází i v případě Skouovy ATPasy. Skou pak provedl experiment, kterým prokázal, že ním studovaná ATPasa je taktéž ouabainem inhibována. Díky tomu došlo k prolnutí informací o fungování ATPasy a stechiometrii jejího transportu. Skou obdržel s polovičním dílem Nobelovu cenu za chemii v roce 1997 za „první objev enzymu transportujícího ionty, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasy“ (viz webové zdroje, The Nobel Prize).

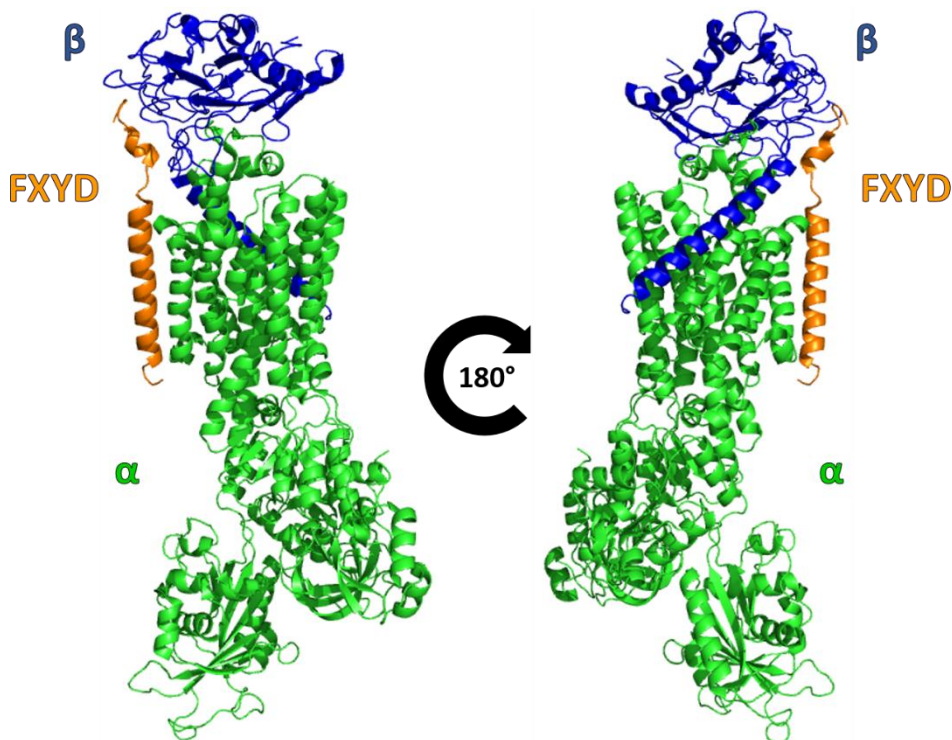
Vznik elektrického gradientu je dán nerovností v přenášených nábojích skrze membránu, kdy jsou tři kationty transportovány vně a pouze dva kationty dovnitř buňky. NKA se touto elektrogenní aktivitou podílí na udržování záporného klidového membránového potenciálu, který nabývá u živočišných buněk dle druhu organismu a typu buňky hodnot v rozmezí  $-20$  mV až  $-120$  mV (Alberts *et al.*, 2014a). Transport sodných i draselných iontů pomocí NKA probíhá za fyziologických podmínek proti koncentračnímu gradientu obou iontů – v typické modelové savčí buňce je cytoplasmatická koncentrace draselných iontů  $140$  mmol·l<sup>-1</sup>, zatímco koncentrace sodných iontů je  $5-15$  mmol·l<sup>-1</sup>. Pro extracelulární koncentrace platí téměř opačná

situace, kdy draselné ionty se vyskytují v koncentraci  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a sodné ionty  $145 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z těchto důvodů musí být translokasová aktivita NKA spřažena s hydrolyzou ATP (Alberts *et al.*, 2014b).

### 2.1.1 Struktura sodno-draselné ATPasy

Základní funkční heterodimerní struktura NKA se skládá z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ , se kterými může dále asociovat regulační podjednotka tvořená proteinem z rodiny FXYD – všechny podjednotky jsou membránové proteiny (viz Obr. 1). NKA patří mezi ATPasy typu P, které jsou v průběhu svého katalytického cyklu fosforylovány (od toho odvozeno „P“ v jejich označení). Konkrétně spadá NKA do topologické třídy II charakterizované přítomností deseti transmembránových  $\alpha$ -šroubovic, které tvoří v tomto případě podjednotku  $\alpha$ . Tyto segmenty přímo interagují s transmembránovou  $\alpha$ -šroubovicí podjednotky  $\beta$ , popřípadě i regulačního proteinu FXYD, výsledkem čehož jsou specifické kinetické parametry daného isoenzymu (Clausen *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2010).

Existují čtyři isoformy podjednotky  $\alpha$  ( $\alpha_1$ – $\alpha_4$ ) tvořené deseti transmembránovými  $\alpha$ -šroubovicemi a třemi cytoplasmatickými doménami. Byly identifikovány tři isoformy

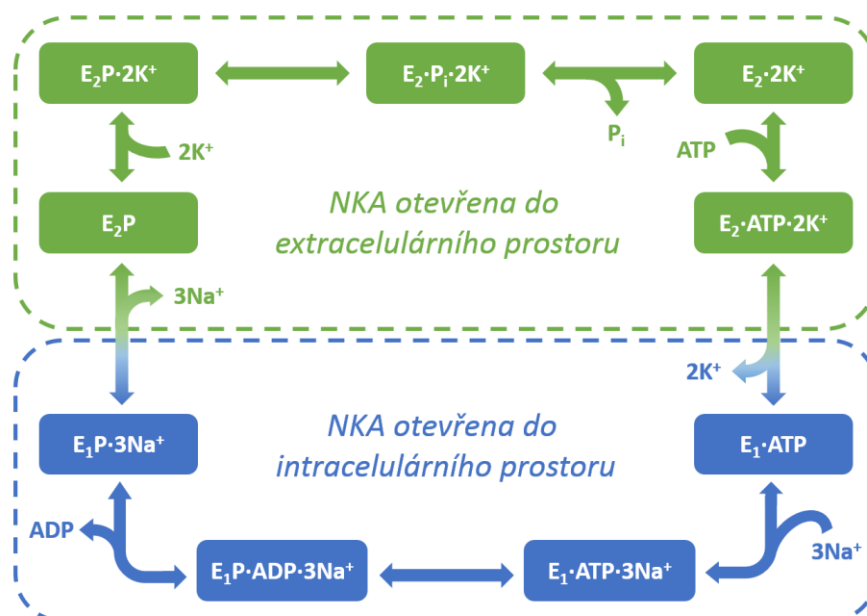


Obr. 1 Struktura sodno-draselné ATPasy. Základem struktury je heterodimer složený z podjednotek  $\alpha$  (zelená) a  $\beta$  (modrá), který dále může asociovat s regulační podjednotkou tvořenou proteinem FXYD (oranžová). PDB ID: 2ZXE, vytvořeno pomocí software PyMOL (DeLano Scientific, USA).

podjednotky  $\beta$  ( $\beta_1$ – $\beta_3$ ) tvořené jednou transmembránovou  $\alpha$ -šroubovicí a ektodoménou. Třetí možnou podjednotkou je u člověka jeden ze sedmi proteinů z rodiny FXYP obsahující jednu transmembránovou  $\alpha$ -šroubovicí (Kaplan, 2002). Teoreticky tak může vzniknout až dvanáct isoenzymů NKA složených z  $\alpha\beta$  heterodimeru s rozdílnými transportními vlastnostmi, které jsou navíc dále regulovány pomocí FXYP proteinů, díky čemuž má organismus možnost vývojově a tkáňově specificky a podle aktuálních potřeb buňky upravovat aktivitu NKA (Blanco, 2005; Crambert *et al.*, 2000).

### 2.1.2 Katalytický cyklus sodno-draselné ATPasy

Mechanismus transportu iontů NKA je označován přívlastkem „alternating-access“, neboť v jeho průběhu se střídají dva mezní konformační stavy. Ve stavu  $E_1$  je struktura enzymu otevřena výměně kationtů směrem dovnitř buňky a ve stavu  $E_2$  se struktura otevírá vně buňky (Rui *et al.*, 2016). Tyto konformační stavy se liší svojí afinitou k transportovaným iontům. Zatímco NKA ve stavu  $E_1$  má vysokou afinitu pro  $\text{Na}^+$  ionty a nízkou pro  $\text{K}^+$  ionty, ve stavu  $E_2$  je tomu naopak a  $\text{K}^+$  ionty se vážou s vysokou afinitou, zatímco afinita pro ionty  $\text{Na}^+$  je nízká. Vazebná místa kationtů se označují jako I, II a III a jsou utvářena transmembránovými  $\alpha$ -šroubovicemi M4, M5, M6 a M8.  $\text{K}^+$  ionty se vážou do míst I a II, která jsou shodná i pro vazbu  $\text{Na}^+$  iontů a jsou přítomna ve stavu  $E_1$  i  $E_2$ . Místo III se utváří pouze ve stavu  $E_1$  a váže třetí  $\text{Na}^+$  ion (Rui *et al.*, 2016).



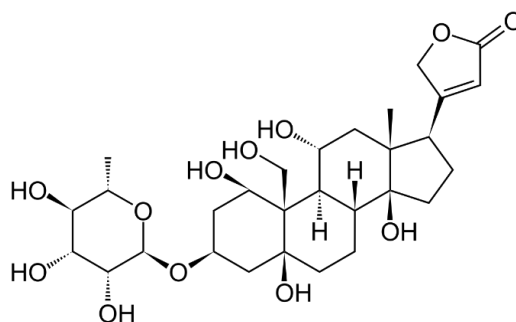
Obr. 2 Katalytický Albersův-Postův cyklus sodno-draselné ATPasy (NKA). V konformačním stavu  $E_1$  (vyznačeno modře) je struktura NKA otevřena pro výměnu kationtů do cytoplasmy a v konformačním stavu  $E_2$  (vyznačeno zeleně) do extracelulárního prostoru (vytvořeno podle Dempski *et al.*, 2009).

NKA jako ATPasa využívá pro transport  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  iontů proti jejich koncentračnímu gradientu energii chemického potenciálu ATP. Nukleotid vazebná doména N cytoplasmatické části podjednotky  $\alpha$  nejprve váže volné ATP ve stavu  $\text{E}_2$  s navázanými  $\text{K}^+$  ionty ( $\text{E}_2 \cdot 2\text{K}^+$ ), což způsobuje konformační přechod  $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$  a  $\text{K}^+$  ionty disociují z NKA do cytoplasmy ( $\text{E}_1 \cdot \text{ATP}$ ). Poté dojde k navázání  $\text{Na}^+$  iontů ( $\text{E}_1 \cdot \text{ATP} \cdot 3\text{Na}^+$ ), a dál se může koordinovat  $\text{Mg}^{2+}$  ion jako kofaktor ATPasové reakce.

V katalytickém cyklu se NKA vyskytuje jako fosfoenzym – za přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  totiž dochází k přenosu  $\gamma$ -fosfátové skupiny ATP na vysoce konzervovaný aspartyl D369 nalézající se v cytoplasmatické doméně P podjednotky  $\alpha$ . Fosforylovaný enzym s koordinovaným  $\text{Mg}^{2+}$  prochází přes uzavřený stav s  $\text{Na}^+$  ionty a následně se otevírá do extracelulárního prostoru do konformace  $\text{E}_2$  a nyní  $\text{Na}^+$  ionty disociují ( $\text{E}_2\text{P}$ ) (Grycova *et al.*, 2009). Přechodná konformace enzymu s uzavřenými sodnými ionty obsahuje dle krystalografických studií navázané ADP (Nyblom *et al.*, 2013; Kanai *et al.*, 2013).

Hydrolýza anhydridové vazby s vysokým chemickým potenciálem mezi fosfátem a karboxylovou skupinou postranního aspartylového řetězce pohání další konformační změny. K hydrolýze této vazby dochází důsledkem navázání  $\text{K}^+$  iontů z extracelulární strany NKA a v cytoplasmatické části následně disociují fosfátový i  $\text{Mg}^{2+}$  ion. Nyní se může vázat další molekula ATP a celý cyklus se opakuje. Tento katalytický cyklus, který byl postupně navazujícími studii v detailech upřesňován, popsali Albers (1967) a Post *et al.* (1969). Jednotlivé kroky katalytického cyklu souhrnně ukazuje Obr. 2.

Vysoce selektivní inhibitor ouabain spadající do skupiny kardiotonických steroidů označovaných jako kardenolidy se váže na NKA ve stavu  $\text{E}_2\text{P}$  do místa, kudy procházejí transportované ionty (podrobně o kardenolidech viz kapitola 2.3.2, strukturní vzorec ouabainu viz Obr. 3). Přesněji ve stavu  $\text{E}_2\text{P}$  NKA asociuje s ouabainem nejrychleji a rovnovážná disociační konstanta dosahuje nanomolárních hodnot, ouabain se na NKA může ovšem vázat v kterémkoli z konformačních stavů proteinu (Yatime *et al.*, 2011).



Obr. 3 Strukturní vzorec ouabainu – vysoce selektivního inhibitoru sodno-draselné ATPasy.

Díky své specifické konformaci steroidního jádra ve tvaru U se může molekula ouabainu interkalovat do struktury podjednotky  $\alpha$  z její extracelulární části. Povrch steroidního jádra z  $\beta$  strany tvoří síť vodíkových můstků se zde přítomnými polárními postranními řetězci aminokyselin. Naopak  $\alpha$  strana molekuly má hydrofobní charakter a interaguje také s hydrofobními rezidui, se kterými je z této strany v kontaktu. Sacharidová strana ouabainu ční do extracelulárního prostoru, zatímco laktonový cyklus se zanořuje do podjednotky  $\alpha$  až k místům I a II. Ve stavu E<sub>2</sub>P se může ouabain vázat hlouběji do struktury NKA, která v této konformaci vykazuje k ouabainu vysokou afinitu. To je dáno také možností interakce polárního laktonového cyklu s Mg<sup>2+</sup> iontem přítomným v místě II, čemuž napomáhá i skutečnost, že laktonový cyklus neinteraguje s žádným polárním reziduem. Naopak pokud je v místě II přítomen větší K<sup>+</sup> iont, ouabain se váže s menší afinitou, což nepřímo potvrzuje i krystalograficky zjištěná konformace NKA v uzavřeném stavu s navázanými K<sup>+</sup> ionty, kdy se navíc některá rezidua dostávají do míst, kam se váže laktonový cyklus, pokud je přítomen Mg<sup>2+</sup> iont a NKA je ve stavu E<sub>2</sub>P. Popsané poznatky jsou v souladu se zjištěními o kompetitivním charakteru vazby K<sup>+</sup>, nebo Mg<sup>2+</sup> resp. K<sup>+</sup>, nebo kardiotonického steroidu na NKA (Laursen *et al.*, 2013). Na tomto příkladu je demonstrován význam katalytického cyklu pro interakci s inhibitory.

## 2.2 Sodno-draselná ATPasa jako signální protein

Předchozí kapitola 2.1 popisuje NKA z pohledu její struktury ve vztahu k enzymatické funkci, zde je NKA líčena jako signální protein, což je její mnohem méně osvětlená funkce, okolo které panuje ve vědecké komunitě plno dohadů. Někteří autoři dokonce NKA označují za steroidní receptor pro endogenní kardiotonické steroidy syntetizované v nadledvinách (Aperia *et al.*, 2016). Význam NKA jako signálního proteinu lze studovat na systémové úrovni a pozorovat fyziologickou odpověď organismu, o čemž pojednává kapitola 2.2.1, nebo lze studovat molekulární mechanismus signalizace na buněčné úrovni, což je popisováno v kapitole 2.2.2.

### 2.2.1 Fyziologický význam

Izolace v lidském těle syntetizovaného kardiotonického steroidu z lidské plasmy podpořená daty o imunoreaktivitě, *in vivo* i *in vitro* inhibici NKA a hmotnostně spektrometrickými měřeními potvrzujícími shodu s ouabainem byla popsána v publikaci Hamlyn *et al.* (1991). Tato vůbec první práce zaměřující se na izolaci endogenních ligandů NKA dále prokázala vysokou koncentraci ouabainu podobné sloučeniny

v nadledvinách, pokles její plasmatické koncentrace po odstranění nadledvin potkanům a její zvýšenou plasmatickou hladinu u hypertenzních potkanů.

Až doposud se rozšiřují poznatky jak z oblasti bioanalytické chemie využívající stále modernějších technik (Schneider *et al.*, 1998; Hamlyn *et al.*, 2014; Kawamura *et al.*, 1999), tak i poznatky o možné signalizaci na úrovni celého organismu vyvolané inhibicí NKA endogenními ligandy, jak bude popsáno dál. Studie uvádějí plasmatické koncentrace endogenního ouabainu u lidí v řádech desítek až stovek  $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a nejčastěji jsou ke stanovení využívány imunochemické metody. Specifičnost imunochemických metod vůči ouabainu je problematickým bodem například diskutovaným ve studiích, které dospějí k negativním výsledkům ať už pomocí LC-MS technik (Baecher *et al.*, 2014), nebo i prostřednictvím imunodetekce po frakcionaci vzorků za účelem odstranění interferentů (Lewis *et al.*, 1994). Existují však práce, které přítomnost endogenního ouabainu prokazují i pomocí LC-MS technik (Komiyama *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 2012). Z důvodu těchto sporů ohledně možností a limitů bioanalytických technik se doposud vědecká komunita v názoru na endogenní ouabain rozchází.

Vědecká skupina dlouhodobě se zabývající signální rolí endogenních kardiotonických steroidů formulovala hypotézu zasazující endogenní ouabain do systémové signalizační kaskády vedoucí k hypertenzi (Hamlyn *et al.*, 2014). Signalizační kaskádu má zahajovat přítomnost angiotensinu II v centrálním nervovém systému, díky čemuž je v mozku stimulována produkce aldosteronu, který signalizací přes mineralokortikoidní receptor vyvolá produkci endogenního ouabainu v mozku a dojde také ke zvýšení jeho plasmatické koncentrace. Endogenní ouabain pak zvyšuje krevní tlak a cévní tonus tím, že mění iontové hospodářství svalových buněk cév. V myocytech jsou zadržovány  $\text{Na}^+$  ionty následkem inhibice NKA a dále dochází ke změně exprese proteinů transportujících  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které se důsledkem toho v buňce také hromadí. Popsané molekulární procesy vedou ke zvýšení svalového tonu a cévní reaktivity. Angiotensin II může při nadměrném příjmu soli vyvolat hypertenzi a objev jakékoli nové signalizační kaskády znamená i objev potenciálního farmakologického cíle (Iwamoto *et al.*, 2004). Ve světle těchto skutečností je formulovaná hypotéza dokládána experimenty velmi atraktivní, ale zároveň vzhledem k její detailnosti a vedle toho nejednotnosti vědeckého pohledu na důkazy přítomnosti endogenních kardiotonických steroidů se jedná o odvážný počín autorů.

## 2.2.2 Biochemický a molekulárně biologický význam

Kromě zkoumání systémových fyziologických účinků ouabainu spouštějícího signalizaci inhibicí NKA se studuje tento jev i na úrovni buněk a molekulárních mechanismů. Na tomto poli panují zase neshody ve věci protein-proteinových interakcí NKA. Zde jsou diskutovány zejména signální proteiny analyzované v praktické části bakalářské práce, kde je rozebírán mechanismus působení ouabainu *in vitro* na úrovni signálních drah.

Vazba ouabainu na NKA je doprovázena indukovaným přizpůsobením, které spočívá v posunu transmembránových  $\alpha$ -helixů M1 a M2 směrem k molekule ligandu. Výsledná konformace komplexu NKA-ouabain nejen brání navázání extracelulárních iontů, ale konformační změna se přenáší také do cytoplasmatické části proteinu, kde se v okolí  $\alpha$ -helixů M1 a M2 nacházejí místa potenciálních interakcí s dalšími proteiny. Proto může být vazbou ouabainu na NKA ovlivněna dostupnost těchto míst pro dokující se proteiny. Konformační změna postihuje také TGES aminokyselinovou smyčku cytoplasmatické domény A nacházející se v blízkosti fosfoanhydridu tvořeného s reziduem D369. Ta v krystalové struktuře NKA s ouabainem výrazněji přikrývá v porovnání s neinhibovanou NKA fosfoanhydrid, a tím může bránit jeho spontánní hydrolýze. Na tomto efektu se navíc podílejí i další rezidua, tentokrát z domény P. Z těchto pozorování lze nepřímě usuzovat na možný význam inhibice NKA ouabainem, který by odpovídal modelu vazby ligandu na receptor následované změnami v signálních drahách (Yatime *et al.*, 2011).

Konkrétní výše popsaná místa potenciálních interakcí s proteiny možné signální kaskády tvoří sekvence schopné interagovat s kaveolinem nebo SH3 doménou proteinů, která je součástí Src kinasy, často zkoumané v souvislosti s NKA zprostředkovanou signalizací (Yatime *et al.*, 2011). Dále se jedná o N-konec podjednotky  $\alpha$ , který interaguje přes ankyrin-B s receptorem pro inositol-1,4,5-tris(fosfát) ( $IP_3$ ), čímž jej aktivuje, a moduluje tak oscilace cytoplasmatických hladin  $Ca^{2+}$ , který se uvolňuje z endoplasmatického retikula po stimulaci receptoru pro  $IP_3$  (Liu *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že po inhibici NKA ouabainem dochází k její asociaci s receptorem pro  $IP_3$  a posilují se  $Ca^{2+}$  oscilace (Zhang *et al.*, 2006). Tento efekt při delecii N-konce podjednotky  $\alpha$  mizí a je snížena aktivace jaderného faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) (Miyakawa-Naito *et al.*, 2003). Exprese N-konce podjednotky  $\alpha$  dokáže narušit formování komplexu podjednotky  $\alpha$  s receptorem pro  $IP_3$  a také ATP stimulované uvolňování  $Ca^{2+}$  z endoplasmatického retikula v buňkách proximálního tubulu. Naopak vyřazení podjednotky  $\alpha_1$  oslabuje uvolňování  $Ca^{2+}$  z endoplasmatického retikula vyvolané angiotensinem II nebo epidermálním růstovým faktorem (Chen *et al.*, 2008).

Právě změnám cytoplasmatické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , které jsou navíc dobře zdokumentovaným a široce akceptovaným dějem spojeným s inhibicí NKA, je připisována velká část signalizačních procesů (Aizman *et al.*, 2001). Přírodní induktory  $\text{Ca}^{2+}$  oscilací jsou ve fyziologii již popsány, jedná se například o některé ligandy receptorů spřažených s G-proteiny, a znám je i jejich biologický význam v buněčném dělení, apoptose nebo diferenciaci (Zhang *et al.*, 2011). I nízké koncentrace ouabainu v řádu  $100 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$  až desítek  $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , které vedou jen k částečné inhibici NKA a mohly by mít význam z hlediska signalizace, dokáží navozovat  $\text{Ca}^{2+}$  oscilace u jednotek až desítek procent buněk dle koncentrace ouabainu (Miyakawa-Naito *et al.*, 2003).

Spojení inhibice NKA s aktivací dráhy NF- $\kappa$ B je dalším farmakologicky zajímavým bodem, protože dráha transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B se účastní mnoha biologických reakcí, mezi které patří například imunitní odpověď, zánět, synaptická plasticita, angiogeneze nebo apoptosa (Hoesel a Schmid, 2013). Byl popsán antiapoptotický vliv ouabainu v koncentracích  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  nebo  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  zprostředkovaný  $\text{Ca}^{2+}$  oscilací vyvolanou aktivací NF- $\kappa$ B (Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006). Stresové podmínky byly v těchto případech navozeny kultivací buněk v médiu s nízkým obsahem séra (0,2 %).

Aktivaci NF- $\kappa$ B ouabainem může být zabráněno působením antioxidantů vitaminu E a N-acetylcysteinu. Inhibice NKA ouabainem vyvolává masivní produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), která se z části může podílet na signalizačních dějích, jako je aktivace mitogenem aktivovaných protein kinas (MAPK). Na ouabainem vyvolané signalizaci se však ROS podílejí jen částečně, protože například aktivace transkripčního faktoru aktivátorového proteinu 1 vyvolaná ouabainem přetrvává i za současné aplikace antioxidantů (Xie *et al.*, 1999). Potvrzeným zdrojem indukovaných ROS jsou mitochondrie, i když se nemusí jednat o zdroj jediný. Jak ROS, tak změny v intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů se tak spolupodílejí na aktivaci signálních drah zahrnujících MAPK a tyrosinkinasy, přičemž produkce ROS není podmíněna změnami intracelulární koncentrace  $\text{Na}^+$  nebo  $\text{Ca}^{2+}$ . Například za přítomnosti N-acetylcysteinu nedochází k ouabainem indukované fosforylaci Src kinasy (Yan *et al.*, 2013). Ke změnám v koncentracích intracelulárních iontů nedochází v časných fázích působení ouabainu nebo za jeho působení v koncentracích jednotek  $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a z hlediska mechanismu účinku toto pozorování favorizuje protein-proteinové interakce NKA jako původce signalizace (Liu *et al.*, 2000; Aydemir-Koksoy *et al.*, 2001).

Schopnost ouabainu ovlivňovat proteiny zapojené do apoptosy je známa. Například ve studii Kinoshita *et al.* (2014) byl pozorován *in vivo* antiapoptotický účinek –



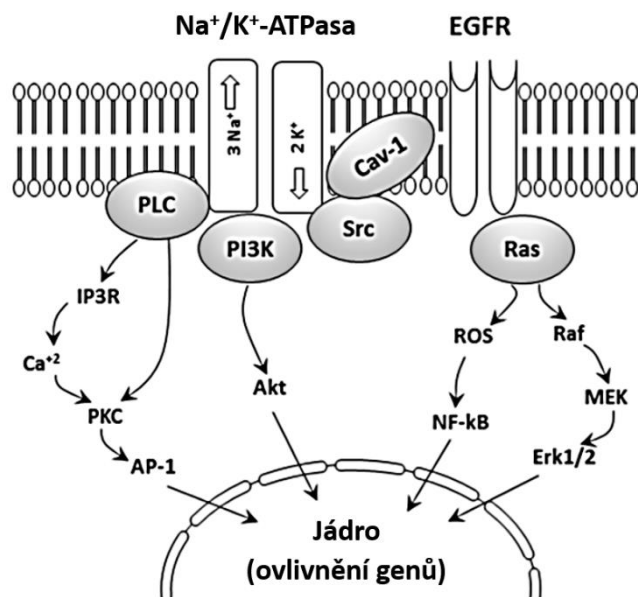
v experimentálním modelu lipopolysacharidy (LPS) navozeného zánětu hipokampu dochází ke snížení poměru hladiny mRNA proteinu X asociovaného s Bcl-2 (Bax) a proteinu B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), pokud je potkanům před aplikací LPS podán ouabain. Významný protektivní účinek ouabainu v koncentraci desetin až jednotek  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  byl popsán i v neuronových modelech excitotoxicity (Golden a Martin, 2006; Sibarov *et al.*, 2012) a při ovlivnění buněk Shiga toxinem. Inhibice apoptosy navozená ouabainem je založena na ovlivnění proteinů rodiny Bcl-2. V modelu excitotoxicity antiapoptotický mechanismus zprostředkovává protein Bcl-2 a v případě Shiga toxinem indukované apoptosy dochází k její inhibici tím, že je navozena rovnováha mezi hladinami proapoptotického Bax proteinu a antiapoptotického Bcl-xL, kterou Shiga toxin narušuje směrem k apoptose (Burlaka *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2017). Antiapoptotický účinek ouabainu *in vivo* popsáný v práci Golden a Martin (2006) v experimentálním neuronovém modelu excitotoxicity je spojený se zvýšením obsahu Bcl-2 v jaderné frakci neuronů potkanů ošetřených ouabainem, zatímco cytoplasmatická hladina Bcl-2 je neovlivněna. Ve zmiňovaných studiích však není zkoumán ouabain samotný ve vztahu k hladinám těchto proteinů a podle dalších studií může ouabain mít i opačný efekt a apoptosu indukovat, což ukazuje na složitost regulace Bax a Bcl-2 ouabainem v závislosti na podmínkách. Například v práci Meng *et al.* (2016) ouabain navozuje apoptosu v buňkách Burkittova lymfomu, což je doprovázeno zvyšováním poměru obsahu proteinů Bax/Bcl-2 při ošetření buněk ouabainem v koncentraci  $25 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  nebo  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 48h inkubaci. V další studii zabývající se lymfocyty ouabain v koncentraci  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 24 h a 48 h snižuje buněčnou viabilitu myších peritoneálních makrofágů a dochází taktéž ke zvýšení poměru obsahu proteinů Bax/Bcl-2 (Luo *et al.*, 2018). V jiné práci byl pozorován podobný efekt v buňkách renálního epitelu pacienta s autosomálně dominantním polycystickým onemocněním ledvin, kde ouabain v koncentraci  $3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 24h inkubaci zvyšuje poměr obsahu proteinů Bax/Bcl-2, k čemuž však nedochází v buňkách normálního renálního epitelu (Venugopal a Blanco, 2016). Oproti tomu v buňkách plicního karcinomu v kratším inkubačním čase 14 h a v nízké koncentraci  $0,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ouabain neovlivňuje poměr obsahu proteinů Bax/Bcl-2 (Chanvorachote a Pongrakhananon, 2013).

Působení ouabainu v nanomolárních koncentracích vyvolává fosforylaci S473 kinasy Akt (proteinkinasy B) v buňkách proximálních tubulů a efekt je závislý (ne však lineárně) na koncentraci ouabainu a na časovém intervalu ovlivnění buněk. Ouabain o koncentraci  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , signifikantně neovlivňující intracelulární koncentraci  $\text{Na}^+$  iontů, vyvolává

maximální fosforylaci po 15min ovlivnění. K fosforylaci Akt nedojde, pokud jsou aplikovány intracelulární nebo extracelulární chelátory  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibitory Akt, fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K), fosfolipasy C (PLC) nebo  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů cytoplasmatické membrány a endoplasmatického retikula (Khundmiri *et al.*, 2006). Podobně je v tubulárních buňkách sledována aktivace Akt i PI3K v práci Zhou *et al.* (2001). V kardiomyocytech je potvrzena ouabainem vyvolaná aktivace Akt i PI3K nezávislá na Src a aktivace Akt je pozorována i v buňkách s knockoutovaným sodno-vápenatým transportérem 1 (Wu *et al.*, 2013). Taktéž v kardiomyocytech byla pozorována inhibice ouabainem vyvolané fosforylace Akt po aplikaci inhibitorů Src a PI3K, ne však EGFR nebo MAPK kinasy MEK (Liu *et al.*, 2007). V experimentech s transfekovanými buňkami bylo prokázáno, že Akt je na S473 fosforylována působením ouabainem aktivované extracelulárním signálem regulované kinasy 1 a 2 (fosfoforma ERK1/2) (Khundmiri *et al.*, 2007).

PI3K je dalším proteinem zapojeným do signalizace NKA a disponujícím mnoha funkcemi významnými z hlediska nádorové biologie. Jedná se o dimerní kinasu složenou z regulační podjednotky p85 a katalytické podjednotky p110 (platí pro PI3K tříd I a III). K aktivaci PI3K dochází, když je vyrušen inhibiční účinek regulační podjednotky p85 na katalytickou podjednotku p110, čehož lze dosáhnout navázáním Src-SH3 domény na p85 do oblasti bohaté na prolin. Druhou možností aktivace PI3K je navázání p85-SH3 domény na jiné proteiny do oblasti bohaté na prolin (Liu *et al.*, 2018). Jak bylo popsáno výše, NKA obsahuje v podjednotce  $\alpha$  tuto na prolin bohatou oblast přístupnější ve struktuře inhibované ouabainem, která by mohla být potenciálním dokovacím místem pro Src nebo p85. V práci Wu *et al.*, 2013 je prokázáním na Src nezávislé aktivaci PI3K IA a imunoprecipitace podjednotky  $\alpha_1$  s p85 podporována varianta aktivace PI3K IA skrze interakci p85-SH3 s podjednotkou  $\alpha$ . Nicméně prokázání koimunoprecipitace p85 a podjednotky  $\alpha$ , která se potvrdila i ve starších studiích Yudowski *et al.* (2000) a Liu *et al.* (2007), rozhodně není důkazem přímé interakce v buňkách.

Ouabain vyvolává aktivaci ERK1/2, jak bylo zmíněno výše. V kardiomyocytech je pozorováno, že aktivace ERK1/2 fosforylací závisí na přítomnosti Src (Wu *et al.*, 2013). To bylo potvrzeno také v buňkách proximálních tubulů a dále bylo zjištěno, že fosforylace závisí na fosfolipase C a MEK1 a nezávisí na Akt a PI3K (Khundmiri *et al.*, 2007). Zablokování aktivace ERK1/2 v kardiomyocytech vyvolávají inhibitory MEK, Src a receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), zatímco fosforylace není závislá na PI3K (Liu *et al.*, 2007), což je v souladu s dříve citovanými pracemi Wu *et al.* (2013)



Obr. 4 Schematické znázornění možné komplexní signalizace zprostředkované sodno-draselnou ATPasou (NKA) při jejím inhibování. EGFR = receptor epidermálního růstového faktoru; Cav-1 = kaveolin 1; PI3K = fosfatidylinositol-3-kinasa; PLC = fosfolipasa C; IP3R = receptor pro inositol-1,4,5-tris(fosfát); PKC = proteinkinasa C; AP-1 = aktivátorový protein 1; ROS = reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species); NF- $\kappa$ B = jaderný faktor kappa B; MEK = kinasa mitogenem aktivované protein kinasy; Erk1/2 = extracelulárním signálem regulovaná kinasa 1 a 2 (upraveno podle Zeino *et al.*, 2015).

a Khundmiri *et al.* (2007). Stejně závěry potvrzuje i Aydemir-Koksoy *et al.* (2001) ve studii prováděné s buňkami hladké svaloviny cév. Z citovaných prací plyne prokázáním aktivace složek signální dráhy závěr, že působení ouabainu vyvolává inhibici NKA transaktivaci EGFR a za původce transaktivace EGFR je považována Src (Haas *et al.*, 2002). K fosforylaci ERK1/2 také nedojde, pokud je blokováno vyplavování  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do cytoplasmy jak už z extracelulárních, tak i intracelulárních zdrojů buňky (Khundmiri *et al.*, 2007). Závislost fosforylace ERK1/2 na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech je popsána i v práci Mohammadi *et al.* (2001), kde se dále uvádí i důležitost proteinkinasy C, která je také součástí signalizační kaskády Src. Možnou komplexní signalizaci NKA ukazuje Obr. 4.

Závěry citovaných studií, ve kterých je zkoumána aktivace Akt, PI3K nebo ERK1/2 navozená ouabainem v koncentraci jednotek  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , potvrzují i antiapoptotický a proliferativní účinek ouabainu vyvolaný aktivací zmíněných kinas (Khundmiri *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013; Khundmiri *et al.*, 2007; Aydemir-Koksoy *et al.*, 2001). Tyto dráhy se také podílejí na ochraně kardiomyocytů před ischemickým poškozením *in vivo* i *ex vivo* po zainhibování NKA specifickou protilátkou, což naznačuje její možné využití při léčbě srdečního selhání. Naopak aktivace NKA specifickou protilátkou vede ke známému pozitivnímu ionotropickému efektu, který je farmakologicky navozován klinicky

využívanými inhibitory NKA při srdeční nedostatečnosti a srdečním selhání. Pozitivní ionotropický efekt je však významně oslaben, pokud se současně aplikují inhibitory Src a ERK1/2, což ukazuje na význam těchto kinas v molekulárním mechanismu pozitivního ionotropického efektu navozeného inhibicí NKA (Zheng *et al.*, 2011).

Výše již byla několikrát zmíněna Src kinasa, nereceptorová tyrosinkinasa mající význam v nádorové biologii, a proto také často zkoumaný protein ve vztahu k NKA. Předpokládá se, že Src se může vázat na NKA do N-koncové oblasti podjednotky  $\alpha$ , kde se nachází na prolin bohatá sekvence potenciálně interagující s SH3 doménami proteinů (Src obsahuje SH3 doménu). Kolokalizace NKA a Src byla prokázána pomocí FRET (Tian *et al.*, 2006).

Není ovšem zcela jasné, zda Src s NKA interaguje přímo, nebo zprostředkovaně. Například v práci Yosef *et al.* (2016) se nepotvrdila přímá *in vitro* interakce Src-NKA koimunoprecipitací. Byla však potvrzena interakce s kaveolinem 1, i když ve vysokém stechiometrickém poměru (1:15–35, kaveolin 1/NKA). Zato oligomery složené ze 4–5 jednotek kaveolinu 1 interagovaly s NKA v poměru 1:1 v nativních renálních membránách, což je fyziologicky relevantnější údaj. Studie tedy může podporovat hypotézu nepřímé interakce NKA a Src zprostředkované kaveolinem 1.

NKA v komplexu s kaveolinem 1 a Src tvoří dle závěrů některých prací signální aparát v mikrodoménách cytoplasmatické membrány nazývaných kaveoly, které mají v rámci buněčné fyziologie specifickou charakterizaci zahrnující invaginaci membrány s přítomností lipidových raftů. Kaveolární frakce je masivně obohacena o některé typy proteinů, jako jsou EGFR, kaveolin 1 nebo Src (Ferrandi *et al.*, 2004). Ouabain dokáže specificky stimulovat tyrosinovou fosforylaci a ERK1/2 pouze v kaveolárních frakcích, přičemž tato signalizace je závislá na přítomnosti cholesterolu a kaveolinu 1. Deplece cholesterolu snižuje koncentraci NKA a Src v kaveolách a narušuje tak navrhovaný signální komplex NKA-kaveolin 1-Src. Zároveň ouabain dokáže stimulovat interakci kaveolinu 1 a NKA v závislosti na době působení a koncentraci ouabainu (Wang *et al.*, 2004). Pouze v kaveolách dochází k pozitivní zpětné smyčce, kdy Src dokáže fosforylovat podjednotku  $\alpha$  NKA, čímž je zvýšena afinita NKA k ouabainu, a signalizace je tak posílena (Ferrandi *et al.*, 2004).

Naopak v rozsáhlé studii Liu *et al.* (2011) se nepotvrdily funkční rozdíly v NKA lokalizované v kaveolách a mimo kaveoly, stejně tak nejsou potvrzeny rozdíly v signálních kaskádách, které jsou diskutovány výše. Ouabain dokonce významně inhibuje fosforylaci Src v mimo kaveolární frakci proteinů oproti frakci kaveolární.

Autoři zdůrazňují, že zdokumentovaná interakce NKA a Src může probíhat skrze zprostředkující proteiny. Celá práce svými závěry podporuje teorii významu kaveolární NKA v mezibuněčných kontaktech sousedících buněk tvorbou dimerů ektodomén podjednotek  $\beta$  (Padilla-Benavides *et al.*, 2010) a také připouští možnost, že signalizace kaveolární NKA, ke které může docházet v nativních podmínkách, a přidružené interakce NKA s kaveolinem 1, E-cadherinem a annexinem 2 může tyto buněčné spoje podporovat. K celé teorii přímé interakce NKA-Src se práce staví skepticky a vybízí k revizi současných poznatků s tím, že ke koimunoprecipitaci Src a NKA může docházet pouze díky přítomnosti detergentů.

Na základě sekvence podjednotky  $\alpha_1$  byl konstruován peptidový inhibitor Src označený jako NaKtid, který *in vitro* dosahuje  $70 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  střední inhibiční koncentrace ( $\text{IC}_{50}$ ) inhibice fosforylace Src na Y418. Fúzí NaKtidu s pozitivně nabitým peptidem schopným procházet do buněk, který je odvozený od proteinu označovaného jako trans aktivátor transkripce z viru HIV, byl získán peptid označovaný jako pNaKtid schopný *in vitro* inhibovat Src s  $\text{IC}_{50} 4 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . V buňkách proximálních tubulů LLC-PK1 pNaKtid inhibuje FRET mezi NKA a Src s  $\text{IC}_{50} 1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , což poukazuje na působení pNaKtidu jako inhibitoru formování komplexu NKA-Src. Z toho se odvíjející schopnost inhibovat v buňkách aktivaci Src a ERK1/2 byla u pNaKtidu potvrzena v závislosti na buněčném typu s různou úspěšností a byla také demonstrována *in vitro* schopnost pNaKtidu snižovat ouabainem navozenou hypertrofií kardiomyocytů – pNaKtid lze tedy označit za peptidového antagonistu ouabainu (Li *et al.*, 2009). Při ošetření kardiomyocytů pNaKtidem v koncentracích desítek  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  za podmínek hypoxie je výrazně snížena fosforylace ERK1/2 i Src a je zaznamenán pokles markerů apoptosy a produkce ROS (Li *et al.*, 2018).

Existují i studie potvrzující systémové působení pNaKtidu. NKA má význam v procesu fibrotizace srdce při chronickém onemocnění ledvin kvůli aktivaci signalizace Src a NF- $\kappa$ B, čímž je snížena hladina miR-29b-3p, antifibrotické mikroRNA. Dále také ouabain dokáže v izolovaných srdečních fibroblastech vyvolat snížení hladiny antifibrotické mikroRNA signalizací NF- $\kappa$ B. Působení pNaKtidu dokáže *in vivo* inhibovat zmíněné dráhy a dochází k zvýšení hladiny antifibrotické mikroRNA a k menšímu rozvoji hypertrofie srdce (Drummond *et al.*, 2018).

Výše popsané případy významu NKA v mnoha signálních drahách a patologických procesech ukazují, že výzkum NKA je i přes její objev před více než šedesáti lety stále velmi aktuální a živé pole vědy. Zatímco molekulární podstata signalizace NKA je dosti

nevyjasněnou oblastí i přes tvrzení postulovaná v mnoha studiích, význam NKA v mezibuněčných spojkách a interakce NKA se strukturálními proteiny jsou podporovány méně si rozporujícími studii (Baecher *et al.*, 2014; Khalid *et al.*, 2010; Dempski *et al.*, 2005; Miyakawa-Naito *et al.*, 2003; Vitalone *et al.*, 2003; Padilla-Benavides *et al.*, 2010).

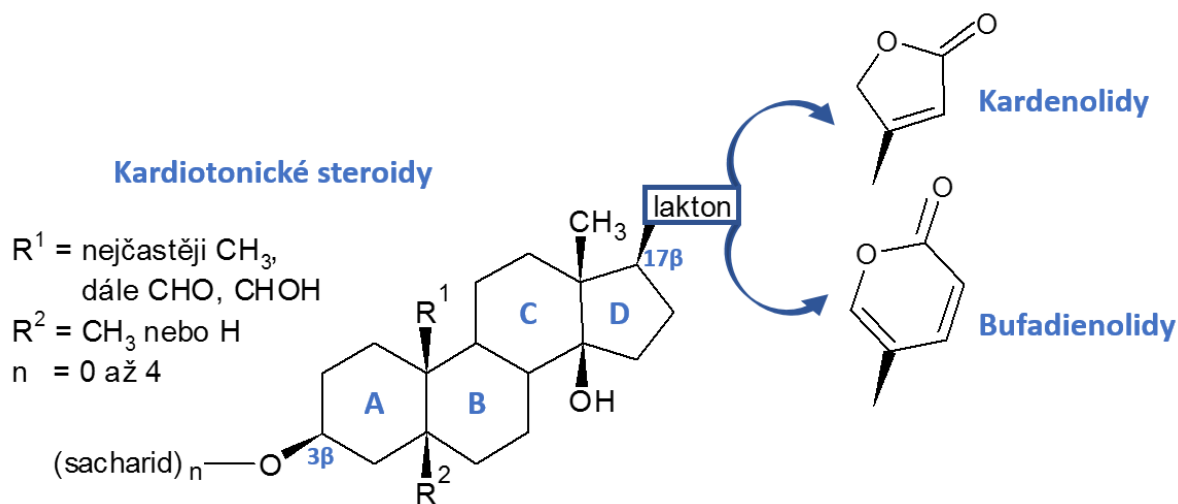
### 2.3 Inhibitory sodno-draselné ATPasy

Jak bylo popsáno v předchozí kapitole, inhibice NKA vyvolává buněčnou signalizaci. V této kapitole jsou popsány strukturální charakteristiky některých známých inhibitorů NKA se zaměřením na skupinu kardiotonických steroidů a dalším inhibitorům NKA je věnován menší prostor.

Nejvýznamnější skupinou inhibitorů NKA jsou srdeční neboli kardiotonické glykosidy. Skládají se ze tří částí, kterými jsou část sacharidová, steroidní jádro a nenasycený lakton. Inhibitorem nemusí být přímo glykosidy, proto je širší označení pro tyto látky kardiotonické steroidy (cardiotonic steroids, CTS), které postihuje i struktury pouze aglykonů (jejich názvy často končí na -genin) (Cornelius *et al.*, 2013).

Sacharidová část může být tvořena až čtyřmi sacharidovými jednotkami a ke steroidnímu jádru se připojuje v pozici C3 $\beta$  cyklu A. Typická je přítomnost neobvyklých sacharidů, jako je  $\beta$ -D-digitoxosa (2,6-dideoxy- $\beta$ -D-ribopyranosa),  $\beta$ -D-digitalosa (6-deoxy-3-O-methyl-D-galaktosa),  $\alpha$ -L-thevetosa (6-deoxy-3-O-methyl- $\alpha$ -L-glukopyranosa) nebo  $\alpha$ -L-cymarosa (Kopp *et al.*, 1992; Melero *et al.*, 2000). Například sacharidovou složkou je v případě digitoxinu trisacharid digoxosa tvořený třemi  $\beta$ -D-digitoxosami (Tiwari *et al.*, 1984). Sacharidová složka posiluje vazbu CTS, a to díky přidané interakci s NKA a omezováním disociace komplexu CTS-NKA způsobované vytěsněním CTS vazbou Na<sup>+</sup> iontů z extracelulární strany pozorovaným u aglykonů (Cornelius *et al.*, 2013). Samotný aglykon nemá schopnost molekulárního rozpoznávání isoformů NKA, čehož je právě do jisté míry schopen v glykosidové formě. Tento poznatek je důležitý při navrhování nových isoformově selektivních inhibitorů NKA. Většina digitalisových glykosidů vykazuje vyšší selektivitu vůči NKA s podjednotkou  $\alpha_2$ , avšak ouabain je mírně  $\alpha_1$ -selektivní (Katz *et al.*, 2010).

Společnou vlastností CTS je přítomnost steroidního jádra, na jehož cyklus D se v pozici C17 $\beta$  napojuje nenasycený lakton. Podle typu nenasyceného laktonového cyklu se srdeční glykosidy dále dělí na kardenolidy obsahující  $\gamma$ -butenolid a bufadienolidy obsahující  $\delta$ -pentadienolid. Obecné schéma strukturálního vzorce těchto látek, které však



Obr. 5 Rozdělení srdečních glykosidů podle cyklického laktonu připojeného ke steroidnímu jádru. Kardenolidy obsahují  $\gamma$ -butenolid ( $5H$ -furan-2-on) a bufadienolidy  $\delta$ -pentadienolid (pyran-2-on) (vytvořeno podle Prassas *et al.*, 2008).

pro ojedinělé případy platí s drobnými výjimkami, ukazuje Obr. 5. Steroidní jádro je hydroxylované a OH skupiny na  $\beta$  povrchu molekuly CTS mají význam při tvorbě vodíkových vazeb v CTS-vysokoafinitním stavu NKA ( $E_2P$ ). Důležitá je však pozice OH skupin, což lze demonstrovat na  $C16\beta$ -OH přítomné například ve struktuře gitoxigeninu, která snižuje afinitu k NKA kvůli sterickému bránění (Cornelius *et al.*, 2013). OH skupiny také rozlišují CTS v závislosti jejich inhibičních konstant na pH, což je nejspíš důsledek stavu protonace vazebných reziduí NKA. Zatímco CTS obsahující  $C14\beta$ -OH jako jedinou OH skupinu vykazují minimální závislost inhibiční konstanty na pH, tak  $C1\beta$ -OH nebo vyšší obsah OH skupin celkově se zdá být významný v pH závislosti inhibičních konstant (Cornelius *et al.*, 2013). CTS obou strukturních skupin inhibují NKA po vzoru stejného vazebného módu, který byl popsán v kapitole 2.1.2 (Laursen *et al.*, 2015).

### 2.3.1 Bufadienolidy

Bufadienolidy jsou CTS obsahující na cyklu D steroidního jádra v pozici  $C17\beta$  navázaný  $\delta$ -lakton, konkrétně pentadienolid (pyran-2-on). Jedná se o  $C_{24}$  steroidy, které nalezneme zejména v zástupcích živočišné říše, zřídka také říše rostlinné (El-Seedi *et al.*, 2019).

Dobře je zdokumentována přítomnost bufadienolidů v zástupcích živočišné říše, přičemž samotný název bufadienolidy je odvozen od latinského *Bufo* (rod ropucha). Zástupci čeledě ropuchovitých (*Bufo*nidae) vylučují na povrch svého těla jedy obsahující například bufadienolidy marinobufagin, telocinobufagin, bufalin a cinobufagin (Sousa *et al.*, 2017). Obranné mechanismy světlušek pracují také s bufadienolidy, přičemž některé z nich mají jedinečnou strukturu (Gronquist *et al.*, 2005) a stejně tak asijské vodní užovky

(*Natricinae*) jsou schopny pro svoji obranu využívat bufadienolidy, které získávají požíráním ropuch a ukládáním bufadienolidů ve speciální žláze (Takeuchi *et al.*, 2018).

Bufadienolidy nalezneme i v rostlinách, zejména z čeledi hyacintovité (*Hyacinthaceae*, dnes chřestovité – *Asparagaceae*) a tlusticovité (*Crassulaceae*). Známy je například z čeledi tlusticovité (*Crassulaceae*) rod kolopejka (*Kalanchoe* – obsahuje vřazený rod naduť, *Bryophyllum*) se zástupci obsahujícími přes třicet různých derivátů bufadienolidů (Kolodziejczyk-Czepas a Stochmal, 2017). Z čeledi pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*) se zástupci s obsahovými látkami ze skupiny jak bufadienolidů, tak i kardenolidů lze jmenovat rostlinu čemeřici (*Helleborus*) s obsahem bufadienolidu hellebrinu (Franz *et al.*, 2018). Do čeledi hyacintovitých patří rostliny rodu *urginea* (*Drimia*) obsahující mimo další bufadienolidy i proscillaridin A, který vykazuje mnoho protinádorových účinků, proto se zkoumá jeho využití v protinádorové terapii, které by mohlo být usnadněno tím, že se jedná již o schválenou léčivou látku jako součást léčivých přípravků proti arytmií a srdečnímu selhání (ATC klasifikace léčiv dle Světové zdravotnické organizace: glykosidy mořské cibule: proscillaridin) (Raynal *et al.*, 2017).

### 2.3.2 Kardenolidy

Kardenolidy jsou CTS obsahující na cyklu D steroidního jádra v pozici C17 $\beta$  navázaný  $\gamma$ -lakton, konkrétně butenolid (5*H*-furan-2-on). Jedná se o C<sub>23</sub> steroidy, které nalezneme v zástupcích rostlinné říše, méně často v živočiších (El-Seedi *et al.*, 2019).

Mezi nejznámější zástupce kardenolidů patří ouabain a digitalisové glykosidy jako digoxin a digitoxin. Spolu s dalšími CTS jsou využívány v současné medicíně. Ouabain (g-strofantin) a cymarín (K-strofantin- $\alpha$ ) jsou zahrnuty v ATC klasifikační skupině léčiv strofantové glykosidy. Deriváty digitoxinu a digoxinu, lanatosid C, deslanosid a gitoformát jsou pak řazeny do skupiny digitalisové glykosidy. V současnosti jsou tedy v medicíně využívány z CTS pouze srdeční glykosidy, a to výhradně v léčbě srdečního selhání a arytmií. Státní ústav pro kontrolu léčiv registruje v České republice pouze léčivou látku digoxin (viz webové zdroje, Státní ústav pro kontrolu léčiv).

Kardenolidy jako obsahové látky jsou typické pro zástupce rostlinné čeledě toješťovitě (*Apocynaceae*). Sem lze zahrnout rod krutíkvět (*Strophanthus*), jehož zástupci obsahují ouabain, rod oleandr (*Nerium*) se zástupci obsahujícími oleandrin a v rostlinách rodu klejicha (*Asclepias*) najdeme calotropin nebo calactin, které mají ke steroidnímu cyklu připojeny navíc dva kyslíkaté heterocykly, stejně jako je tomu ve struktuře voruscharinu, který však obsahuje ještě další heterocyklus s atomy síry a dusíku (Siddiqui *et al.*, 2012;



Knittel *et al.*, 2016; Züst *et al.*, 2019). Kardenolidy najdeme v některých rostlinách čeledi jitrocelovité (*Plantaginaceae*) – například náprsník (*Digitalis*) obsahující glykosidy digoxin nebo digitoxin. Použití náprsníku jako srdečního stimulantu bylo poprvé vědecky popsáno v monografii z roku 1785 sepsané Williamem Witheringem, avšak náprsník byl v té době používán v léčitelství k různým účelům s jistotou minimálně již před více než 200 lety (Groves a Bisset, 1991). Kardenolidy ale najdeme i v mnoha dalších rostlinách jako je například ančar (*Antiaris*) z čeledi morušovníkovité (*Moraceae*) obsahující antiarin, konvalinka (*Convallaria*) z čeledi chřestovité (*Asparagaceae*) obsahující konvalatoxin nebo hlaváček (*Adonis*) z čeledi pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*) obsahující adonitoxin (Patel, 2016; Franz *et al.*, 2018; Kubo *et al.*, 2012).

Kardenolidy (méně často i bufadienolidy) využívá ke své obraně hned několik evolučně vzdálených zástupců hmyzí říše žijících se rostlinami obsahujícími kardenolidy. Hmyz je schopen ukládat kardenolidy ve svých tkáních a pasivně je tak využívat k obraně, nebo dokonce je aktivně vylučovat při podráždění predátorem, například motýli čeledi babočkovití (*Nymphalidae*), přástevníkovití (*Arctiidae*) nebo otakárkovití (*Papilionidae*), dále například mnoho rodů ploštic z polokřídleho hmyzu (*Hemiptera*) (Opitz a Müller, 2009; Bramer *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2019).

### 2.3.3 Ostatní inhibitory sodno-draselné ATPasy

Jako méně účinné inhibitory byly popsány také hydroxyanthony nebo flavonolignany z ostropestřce mariánského, které interagují s intracelulární částí podjednotky  $\alpha$  (Zhang *et al.*, 2010; Kubala *et al.*, 2016). K flavonolignanům jsou isosterické fenylocholonové deriváty, z nichž 5,6,7,8-tetrafluor-3-hydroxy-2-fenylocholin-4(1H)-on vykazuje taktéž inhibiční aktivitu a dle dokingové studie má schopnost vázat se do oblasti C-konce podjednotky  $\alpha$ , což může zamezovat přenosu iontů (Šeflová *et al.*, 2017).

U poměrně rozšířených rostlinných sekundárních metabolitů kyseliny ursolové a oleanové, spadajících mezi triterpenoidní kyseliny, byl také popsán mírný inhibiční účinek v NKA a předpokládá se vazebný mód podobný jako u CTS (Chen *et al.*, 2010). Jako další příklad z poměrně početné skupiny řádově méně účinných inhibitorů NKA, než jsou CTS, lze uvést léčiva propranolol, verapamil, promethazin chlorochin nebo chlorpromazin, dále tetrahydrokarbazoly nebo přírodní látky lithospermát B a jeho analoga s různými kovovými ionty, některé deriváty ginsenosidů či přírodní insekticid decalesid (Bhattacharyya a Sen, 1999; Horvat *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013; Rajashekar a Shivanandappa, 2017; Bublitz *et al.*, 2018). Zajímavým inhibitorem

je extrémně toxický polyalkohol palytoxin, potažmo jeho analoga. Palytoxin, produkovaný některými mořskými korály, obrněnkami a sinicemi, se váže na NKA a změní její funkci na neselektivní kationtový kanál (Artigas a Gadsby, 2003).

Ukazuje se tedy, že i přes poměrně úzce definovanou základní strukturu tradičních inhibitorů ze skupiny CTS je zde potenciál nalézt jak nové inhibitory, tak i nové mechanismy inhibice. Taktéž byly nalezeny extrakty z rostlin využívaných v lidovém léčitelství, u kterých byla prokázána inhibiční aktivita v NKA, avšak doposud v některých případech nebyla nalezena v těchto extraktech konkrétní obsahová látka, kterou by bylo možné označit za inhibitor NKA (Al-Snafi, 2015; Koch a Malek, 2011).

## **2.4 Současné fytochemické poznatky o rostlinných druzích zkoumaných v praktické části**

Tato kapitola obsahuje shrnutí současných poznatků o fytochemii rostlinných druhů zkoumaných v praktické části bakalářské práce a také informace o tradičním použití těchto rostlin v lidovém léčitelství. Důraz je kladen na obsahové látky ze skupiny sekundárních metabolitů spíše specificky se vztahujících k těmto druhům rostlin, zatímco obecně se vyskytujícím rostlinným sekundárním metabolitům je věnován menší prostor, neboť tyto látky pravděpodobně neudělají specifický biologický účinek extraktům z konkrétního rostlinného druhu. Rešerše je provedena také za účelem získání informací o možné inhibici NKA extrakty zkoumaných rostlin.

### **2.4.1 Viola vonná (*Viola odorata* L.)**

Viola vonná patří do čeledě violkovitých (*Violaceae*) a vyskytuje se v Asii, severní Africe a v Evropě (Siddiqi *et al.*, 2012). V lidovém léčitelství je dokumentováno analgetické, antihypertenzní, anxiolytické, antirevmatické, protiastmatické, antipyretické a antimikrobiální působení violky vonné (Mahboubi a Taghizadeh Kashani, 2018; Karim *et al.*, 2018; Siddiqi *et al.*, 2012). Při literární rešerši nebyla nalezena studie prokazující relevantními analytickými technikami obsah kardiotonických steroidů ve violce vonné, resp. v jiných druzích violek, ani studie prokazující inhibici NKA extrakty violek.

Violky jsou známé obsahem rostlinných cyklických polypeptidů (27–37 aminokyselinových zbytků) nazývaných cyklotidy, jejichž výskyt může být pletivově specifický, závislý na ročním období a významně rozdílný i v rámci jednoho rodu (Trabi *et al.*, 2004; Trabi a Craik, 2004). Cyklotidy obsahují motiv cyklického cystinového uzlu, který jim zaručuje vysokou chemickou a fyzikální stabilitu. Rostlinám slouží zejména

k obraně proti patogenům a predátorům (Craik *et al.*, 1999). V případě violky vonné obsahující desítky cyklotidů je významný zejména obsah cykloviolacinů vykazujících cytotoxické, antifungální, antibakteriální nebo antihelmintické účinky (Parsley *et al.*, 2018; Slazak *et al.*, 2018).

Silice z listů violky obsahuje zejména monoterpenoidy, seskviterpenoidy, deriváty benzofuranonu a ftalátu (Akhbari *et al.*, 2012). V extraktu z listů se nachází početná skupina flavonolových glykosidů (Karioti *et al.*, 2011). Existuje málo studií věnujících se obsahu často zmiňovaných alkaloidů ve violkách. Doposud nejpodrobněji byla tato problematika zkoumána v práci Chen a Aisa (2017), která vedla k objevu dvaceti alkaloidů, z čehož je osmnáct nově objevených sloučenin (tishaviolaminy A–J) zahrnujících navíc také tři zcela jedinečné alkaloidové strukturní skelety. Avšak v této práci je analyzován jiný druh violky, a to *Viola tianschanica*.

#### **2.4.2 Vrbka úzkolistá (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub)**

Vrbka úzkolistá spadá do čeledě pupalkovité (*Onagraceae*) a vyskytuje se ve velké části Evropy, v Severní Americe, na Sibiři a ve východní Asii (Ostrowska *et al.*, 2017). V lidovém léčení se využívá k léčbě onemocnění prostaty a gastrointestinální soustavy a při menstruačních potížích, krvácení z konečníku, zánětu močové trubice a bolesti, z vnějšku se aplikují výtažky z vrbky na zanícená místa, vředy a používají se pro své antiseptické působení (Stolarczyk *et al.*, 2013; Ostrowska *et al.*, 2017). Při literární rešerši nebyly dohledány informace o obsahu kardiotonických steroidů ani o inhibici NKA extrakty vrbky.

Hlavními obsahovými látkami rostliny jsou flavonoidy a taniny, proto také extrakty z vrbky vykazují velmi vysoké antioxidační působení, z taninů jsou typické oligomerní ellagotaniny (Schepetkin *et al.*, 2016). Celkově z fenolických látek jednoznačně dominuje zastoupení kyseliny gallové, makrocyclického ellagotaninu oenotheinu B, který je dimerem tellimagrandinu I (okolo 4 hm% v čerstvé hmotě), a nakonec kvercetin-3-O-arabinosidu (Ducrey *et al.*, 1997; Granica *et al.*, 2012; Grysczyńska *et al.*, 2018). V nadzemní části rostliny je také přítomen oenothein A – trimer tellimagrandinu I, který je jinak možné v rostlině nalézt až v heptamerní podobě (Ducrey *et al.*, 1997; Baert *et al.*, 2015). V listech rostliny byly objeveny triterpenoidní kyseliny ursolová, korosolová, maslinová a oleanová (Glen *et al.*, 1967). O kyselině ursolové a oleanové je znám jejich mírný inhibiční účinek v NKA (Chen *et al.*, 2010).

### 2.4.3 Udatna lesní (*Aruncus vulgaris* Rafin)

Udatna lesní patří do čeledě růžovité (*Rosaceae*) a vyskytuje se v severním mírném a subantarktickém pásu (Granica *et al.*, 2017). V Koreji se jedná o listovou zeleninu a v severní Itálii jsou mladé výhonky sbírány a konzumovány podobně, jako je tomu u chřestu, což samo o sobě je motivací pro výzkum biologické aktivity této rostliny (Ahn *et al.*, 2014; Fusani *et al.*, 2016). Tradičně se rostlina používá v asijském lidovém léčitelství při tonzilitidě, pro zastavení krvácení, k tlumení bolesti, v péči o pokožku nebo k uvolnění šlach (Kim *et al.*, 2012; Que *et al.*, 2014). Opět i v tomto případě při literární rešerši nebyly dohledány informace o obsahu kardiotonických steroidů ani o inhibici NKA extrakty udatny.

Mladé výhonky obsahují ze sekundárních metabolitů značný podíl fenolických látek, mezi kterými dominují kafeoylované deriváty glukosy (Fusani *et al.*, 2016). Fenylpropanoidní  $\beta$ -D-glukosidy jsou obsaženy i v kořenech rostliny, mezi nimi také kyanogenní glykosid grayanin (Que *et al.*, 2014). V extraktu z nadzemní části rostliny byl identifikován kyanogenní glykosid prunasin a sambunigrin (Jeong *et al.*, 2011; Vo *et al.*, 2014; Fusani *et al.*, 2016). V květech byly objeveny nové monoterpenoidní laktonové glykosidy aruncolaktonosid a isoaruncolaktonosid (Schwaiger *et al.*, 2009). V nadzemní části a v mladých výhoncích rostliny bylo nalezeno pět nových monoterpenoidních laktonů (aruncin A–E) a pět nových  $\beta$ -D-glukosidů monoterpenoidních laktonů (aruncid A–E) a dříve známý monoterpenoidní lakton cimicifugolid A (Jeong *et al.*, 2011; Granica *et al.*, 2017). Struktura aruncinu B, aruncinu A a aruncidu A byla později revidována (Ribaucourt a Hodgson, 2016; Granica *et al.*, 2017). Kořen obsahuje také nový  $\beta$ -D-glukosid monoterpenoidního laktonu nazvaný sylvesterosid D, dále triterpenoidní kyselinu pomolovou a 2-oxopomolovou (Ma *et al.*, 2018).

### 3 PRAKTICKÁ ČÁST

#### 3.1 Chemikálie a potřeby pro buněčné kultury

- adenosin-5'-trifosfát – ATP (Sigma-Aldrich, USA)
- akrylamid (VWR, USA)
- 25% vodný roztok amoniaku (Merck, Německo)
- aprotinin, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin – BSA (VWR, USA)
- *n*-butanol (Lach-Ner, Česká republika)
- citrát bismutitý (Sigma-Aldrich, USA)
- citrát sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý (Lachema, Česká republika)
- dimethylsulfoxid – DMSO, vhodný pro buněčné kultury (PanReac AppliChem, Německo)
- dithiothreitol – DTT (Roche, Německo)
- dodecylsírán sodný – SDS (Lach-Ner, Česká republika)
- Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM) s nízkým obsahem glukosy (Sigma-Aldrich, USA)
- 96% ethanol – EtOH (Lach-Ner, Česká republika)
- fenylmethansulfonylfluorid – PMSF (Sigma-Aldrich, Čína)
- fetální bovinní sérum – FS, tepelně inaktivované (Biowest, Francie)
- fluorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- L-glutamin, pro buněčné kultury (Sigma-Aldrich, USA)
- glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- L-histidin (Sigma-Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (PENTA, Česká republika)
- hydroxid sodný (PENTA, Česká republika)
- chemiluminiscenční kity SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate a West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- chlorid draselný (Lachema, Česká republika)
- chlorid sodný (PENTA, Česká republika)
- chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich, USA)
- imidazol (Sigma-Aldrich, USA)
- kit pro barvení gelů stříbrem ProteoSilver Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich, USA)
- 85% kyselina fosforečná (PENTA, Česká republika)

- 35% kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Sigma-Aldrich, Čína)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová – EGTA (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo)
- 99% kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)
- Laemmliho pufr 4x Laemli Sample Buffer (Bio-Rad, USA)
- leupeptin, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-merkapt ethanol (SERVA, Německo)
- methanol – MeOH, hypergrade for LC-MS (Merck, Německo)
- methanol – MeOH (PENTA, Česká republika)
- N,N'-metylenbisakrylamid – Bis (Sigma-Aldrich, Čína)
- mléko kravské nízkotučné sušené (Sigma-Aldrich, USA)
- molybdenan amonný tetrahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- Nonidet P 40 (Fluka, Švýcarsko)
- orthovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- ouabain oktahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- penicilin-streptomycin v 0,9% NaCl, vhodný pro buněčné kultury – 10 000 U/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, USA)
- peroxidisíran amonný – APS (Bio-Rad, USA)
- Ponceau S (SERVA, Německo)
- médium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) se stabilizovaným L-glutaminem (Biowest, Francie)
- standard molekulových hmotností proteinů Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, USA)
- standard molekulových hmotností proteinů PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- sodná sůl resazurinu (Sigma-Aldrich, USA)
- sacharosa (Lach-Ner, Česká republika)
- N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin – TEMED (Bio-Rad, USA)
- trypsin, 25 g·l<sup>-1</sup> 0,9% roztoku chloridu sodného, vhodný pro buněčné kultury (Sigma-Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan – Tris (SERVA, Německo)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, USA)

### 3.2 Přístrojové vybavení

- analytická váha KERN ABT 120-5DM (KERN, Německo)

- aparatura pro western blot Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, USA)
- autokláv MLS-3781L (Sanyo, Japonsko)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- CCD kamera s příslušenstvím Luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Japonsko)
- CO<sub>2</sub> inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)
- dusíková odparka TurboVap Classic LV (Biotage, Švédsko)
- hlubokomrazicí box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific, USA)
- inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)
- kývačka Mini-Rocker Shaker, MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- laboratorní váhy KERN PCB 200-2 (KERN, Německo)
- laminární box VBH Compact, VBH36 C2 (Steril, Itálie)
- lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr, Německo)
- magnetická míchačka s ohřevem AREX CerAlTop (VELP Scientifica, Itálie)
- mlýnek s tříštivým nožem Bosch MKM6003 (Robert Bosch, Německo)
- mraznička Innova (Fagor, Thajsko)
- odsávačka VACUSAFE (INTEGRA Biosciences, Švýcarsko)
- oscilační mlýn MM 400 (RETSCH, Německo)
- pH metr pH 50 (XS Instruments, Itálie) a skleněná pH elektroda (Sentek, Velká Británie)
- pipetovací stanice Freedom EVO (Tecan, Švýcarsko)
- reader mikrotitračních desek Fluoroskan Ascent (Labsystems, Finsko)
- reader mikrotitračních desek Synergy Mx (BioTek, USA)
- skener gelů Amersham Imager 600 (GE Healthcare Bio-Science AB, Švédsko)
- spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- systém na úpravu vody SIMS600CP Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (EMD Millipore, Německo)
- termoblok Compact Digital Dry Bath/Block Heater (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ultracentrifuga Himac CP90WX (Hitachi, Japonsko)
- ultrazvuková vana VWR Ultrasonic Cleaner (VWR, USA)
- ultrazvukový homogenizátor SONOPULS UW 2200 (Bandelin, Německo)
- vertikální elektroforetický systém Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
- vodní lázeň GFL 1032 (GFL Gesellschaft für Labortechnik, Německo)
- zkumavkový vortex Reax top (Heidolph Instruments, Německo)
- stolní centrifuga Centrifuge 5424 R a Centrifuge 5702 R (Eppendorf, Německo)

- stolní centrifuga Heraeus Megafuge 16 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- stolní mixér (Waring Commercial, USA)
- minicentrifuga MyFuge Mini (Benchmark Scientific, USA)
- pipetor accu-jet-pro (BrandTech Scientific, USA)
- zdroj napětí PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

### 3.3 Spotřební materiál a ostatní vybavení

- buněčné škrabky (TPP, Švýcarsko)
- sterilní 96-jamkové desky pro buněčné kultury (TPP, Švýcarsko)
- sterilní zkumavky o objemu 10 ml a 15 ml (GAMA GROUP, Česká republika)
- sterilní Petriho misky Ø 100 mm (TPP, Švýcarsko)
- sterilní kultivační nádoby 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Švýcarsko)
- sterilní centrifugační zkumavky 50 ml (TPP, Švýcarsko)
- mikrozukavky 0,5 ml; 1,5 ml; 5 ml (Eppendorf, Německo)
- stříkačkový nylonový filtr Millex-HN s póry 0,45 µm (Merck, Německo)
- nitroceluloseová membrána pro western blot s 0,45µm póry (Bio-Rad, USA)
- Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters MWCO 3 kDa (Sigma-Aldrich, Irsko)
- kartridž pro extrakci na pevnou fázi – katex: Oasis MCX 6cc (150mg) LP Extraction Cartridges (Waters, USA)
- kartridž pro extrakci na pevnou fázi – anex: Oasis MAX 6cc (150mg) LP Extraction Cartridges (Waters, USA)
- kartridž *Spe-ed* SPE pro extrakci na pevnou fázi, 500 mg/6 ml C18 oktadecyl/18 (Applied Separations, USA)
- Bürkerova komůrka
- skleněný homogenizátor Potterova typu
- skalpel
- chirurgické kleště
- běžné laboratorní vybavení zahrnující kádinky, odměrné válce, skleněné tyčinky, kopistě, chemické lžičky, váženky apod.

### 3.4 Biologický materiál

- čerstvé vepřové ledviny 8 ks
- buněčné linie pocházející ze zdroje The European Collection of Authenticated Cell Cultures – ECACC (Velká Británie) – v závorce uvedeno katalogové číslo ECACC
  - MCF7 – buňky prsního adenokarcinomu (86012803)
  - HeLa – buňky adenokarcinomu děložního hrdla (93021013)
  - K562 – buňky chronické myelogenní leukemie (89121407)
  - CCRF-CEM – buňky akutní lymfoblastické leukemie (85112105)



- lidské kožní fibroblasty BJ pocházející ze zdroje The American Type Culture Collection – ATCC (USA) – katalogové číslo CRL-2522
- rostlinný materiál pro extrakci
  - violka vonná (*Viola odorata* L.) – kořen, list, semeno
  - vrbka úzkolistá (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub) – list a květ
  - udatna lesní (*Aruncus vulgaris* Rafin) – list a květ

## 3.5 Metody

### 3.5.1 Zpracování a homogenizace rostlinného materiálu

Rostlinný materiál byl sbírán v přírodní lokalitě výskytu rostlin (viz Tab. 1). Jednotlivé orgány rostlin byly vypreparovány, v případě kořenů omyty studenou vodou a osušeny a byly sušeny volně při pokojové teplotě za cirkulace vzduchu. Poté byly za použití mlýnku s tříštivým nožem zhomogenizovány na jemný prášek a skladovány ve tmě za nepřístupu vzduchu.

### 3.5.2 Příprava rostlinných extraktů

Homogenní rostlinný materiál byl v koncentraci 30 mg suché hmoty (dry weight, DW)·ml<sup>-1</sup> extrahován 100% MeOH s 0,1% HCOOH následujícím postupem. V mikrozkuhavce byl k navážce rostlinného materiálu přidán 100% MeOH s 0,1% HCOOH a následovala homogenizace skleněnými kuličkami pomocí oscilačního mlýnu MM 400 (RETSCH, Německo) (5 min, 27 Hz, laboratorní teplota) a homogenizace ultrazvukem v ultrazvukové vaně (10 min). Nakonec byl homogenát v mikrozkuhavkách centrifugován (10 min, 13 300 g, laboratorní teplota), a poté byl odebrán přesný objem supernatantu, který byl při 37 °C odpařen v dusíkové odparce TurboVap Classic LV (Biotage, Švédsko).

Tab. 1 Rostliny a jejich orgány využité k extrakci a zkoumání *in vitro* cytotoxické aktivity v buněčných kulturách a inhibiční aktivity v sodno-draselné ATPase.

český název	latinský název	lokalita
vrbka úzkolistá syn. vrbovka úzkolistá	<i>Epilobium angustifolium</i> syn. <i>Chamerion</i> <i>angustifolium</i>	Česká republika, Bělkovice-Lašťany
udatna lesní	<i>Aruncus vulgaris</i>	Slovenská republika, Malá Fatra
violka vonná	<i>Viola odorata</i>	Česká republika, Bělkovice-Lašťany

Tab. 2 Značení celkových rostlinných extraktů používané v bakalářské práci.

rostlina	použitý orgán – specifikace	zkratka používaná v práci
vrbka úzkolistá ( <i>Chamerion angustifolium</i> )	list	VUL
	květ	VUK
udatna lesní ( <i>Aruncus vulgaris</i> )	list	ULL
	květ	ULK
violka vonná ( <i>Viola odorata</i> )	list – modře kvetoucí violka	VIOL ML
	kořen – modře kvetoucí violka	VIOL MK
	list – bíle kvetoucí violka	VIOL BL
	semeno – bíle kvetoucí violka	VIOL BS

Odparky extraktů byly dle potřeby rozpouštěny buďto v DMSO pro využití v testech cytotoxicity na výslednou koncentraci 200 mg DW·ml<sup>-1</sup>, nebo v příslušném roztoku pro účely konkrétní separace pomocí extrakce na pevnou fázi (viz kapitola 3.5.3). Používané značení extraktů pomocí zkratk ukazuje Tab. 2.

100% MeOH s 0,1% kyselinou mravenčí: 100% MeOH; doplněna HCOOH na koncentraci 0,1 % (v/v)

### 3.5.3 Frakcionace rostlinných extraktů

Extrakty byly frakcionovány použitím extrakce na pevnou fázi (solid phase extraction, SPE) a ultrafiltrace, aby mohly být získány informace o distribuci inhibiční aktivity extraktů v NKA v jednotlivých frakcích, které je možné využít v navazující korelačně metabolické studii. K SPE separaci složek extraktu byly využity kolony v podobě kartridží pro iontově výměnnou chromatografii (katex a anex) a kolony s reverzní fází oktadecylovaného silikagelu (C18), pracovalo se s MeOH v kvalitě pro LC-MS a s Milli-Q H<sub>2</sub>O. Odparek extraktu z 30 mg DW získaný dle postupu popsaného v kapitole 3.5.2 byl rozpouštěn pro účely SPE vždy v 1 ml rozpouštědla podle druhu SPE (viz níže), a poté separován na frakce. Frakcionace ultrafiltrací probíhala za použití centrifugačního filtru Amicon Ultra s cut-off hodnotou molekulové hmotnosti 3 kDa.

Při SPE pomocí katexu (150 mg MCX) byla kolona nejprve promyta a kondicionována 12 ml MeOH, následovala ekvilibrace 6 ml H<sub>2</sub>O, a pak 6 ml 2% HCOOH v H<sub>2</sub>O. Poté byl na kolonu nanesen vzorek extraktu rozpuštěný ve 2% HCOOH v H<sub>2</sub>O. První frakce (K0) byla získána elucí 5 ml 2% HCOOH v H<sub>2</sub>O. Druhá frakce (K1) byla eluována 4 ml MeOH a třetí frakce (K2) byla eluována 4 ml 5% methanolového roztoku NH<sub>3</sub>.

Při SPE pomocí anexu (150 mg MAX) byla kolona nejprve promyta a kondicionována 12 ml MeOH, následovala ekvilibrace 6 ml H<sub>2</sub>O, a pak 6 ml 5% vodného roztoku NH<sub>3</sub>.

Na kolonu byl nanesen vzorek rozpuštěný v 5% vodném roztoku  $\text{NH}_3$  a 5 ml stejného rozpouštědla byla provedena eluce první frakce (A0). Druhá frakce (A1) byla eluována 4 ml MeOH a třetí frakce (A2) byla eluována 4 ml 2% HCOOH v MeOH.

SPE s kolonou C18 (500 mg C18) byla zahájena promytím a kondicionací 12 ml MeOH, následovala ekvilibrace 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a byl nanesen vzorek rozpuštěný v 0,1% HCOOH v  $\text{H}_2\text{O}$ . První frakce (C0) byla eluována 2 ml 0,1% HCOOH v  $\text{H}_2\text{O}$ . Následovala postupná eluce 3 ml roztoků MeOH okyselených 0,1% HCOOH – frakce C1 byla eluována 10% okyseleným MeOH, C2 20% okyseleným MeOH, C3 30% okyseleným MeOH, C5 50% okyseleným MeOH, C6 60% okyseleným MeOH, C7 70% okyseleným MeOH a nakonec byla provedena eluce frakce C10 100% okyseleným MeOH.

Všechny frakce získané pomocí SPE kolonami katex, anex a C18 byly odpařeny při 37 °C v dusíkové odparce TurboVap Classic LV (Biotage, Švédsko) a rozpuštěny ve 100  $\mu\text{l}$  20% MeOH okyseleného 0,1% HCOOH a byly skladovány za teploty –80 °C. Názvy frakcí jsou dále v textu uváděny pod výše uvedenými zkratkami (A0–A2, K0–K2, C1–C3, C5–C7, C10) a je uvažována koncentrace 300 mg  $\text{DW}\cdot\text{ml}^{-1}$ , odpovídající rozpuštění původní navážky 30 mg DW ve 100  $\mu\text{l}$  20% MeOH okyseleného 0,1% HCOOH.

Frakcionace ultrafiltrací byla provedena pouze s frakcí C2 extraktu VIOL MK. Frakce VIOL MK C2 byla 10x naředěna ve 20% MeOH do výsledného objemu 300  $\mu\text{l}$ , který byl ultrafiltrován centrifugačním Amicon Ultra filtrem, a byly získány dvě frakce – ultrafiltrát (UF) a retentát (RET). K retentátu o menším objemu, než měl ultrafiltrát, byl doplněn 20% MeOH tak, aby byl objem retentátu stejný jako ultrafiltrátu, díky čemuž mohou být frakce v prováděných testech porovnatelné při stejném ředění.

*2% HCOOH v  $\text{H}_2\text{O}$ :* 2% (v/v) HCOOH v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$

*0,1% HCOOH v  $\text{H}_2\text{O}$ :* 0,1% (v/v) HCOOH v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$

*2% HCOOH v MeOH:* 2% (v/v) HCOOH v MeOH pro LC-MS

*5% vodný roztok  $\text{NH}_3$ :* 5% (w/v) roztok  $\text{NH}_3$  v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$

*5% methanolvý roztok  $\text{NH}_3$ :* 5% (w/v) roztok  $\text{NH}_3$  v MeOH pro LC-MS připravený ředěním 25% (w/v) vodného roztoku  $\text{NH}_3$

*Sada různě koncentrovaných okyselených roztoků MeOH:* příslušná v/v koncentrace MeOH pro LC-MS v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$ ; doplněna HCOOH na koncentraci 0,1 % (v/v)

*20% MeOH:* 20% (v/v) MeOH pro LC-MS v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$

### 3.5.4 Kultivace buněk

Kultivace buněk probíhala v inkubátoru s 5% atmosférou CO<sub>2</sub>, za teploty 37 °C a při 100% vzdušné vlhkosti. Buňky CCRF-CEM byly kultivovány v médiu 20% FS (fetální sérum) RPMI 1640, ostatní buňky (HeLa, MCF7, K562 a BJ) byly kultivovány v médiu 10% FS DMEM.

Nádorové linie byly pasážovány před dosažením konfluence (~80% konfluence), zatímco buňky BJ byly pasážovány po dosažení konfluence. Adherentní buňky byly nejprve opláchnuty roztokem EGTA v PBS, poté byly uvolněny ze dna kultivační nádoby působením 0,1% trypsinu, a následně spláchnuty novým médiem a převedeny do zkumavky. Byla provedena centrifugace (5 min, 200 g, laboratorní teplota), supernatant byl odstraněn a pelet buněk byl resuspendován v novém médiu. Následně byly buňky vysety do subkultury v ředění, které se odvíjelo od potřeby odběru buněk pro účely experimentů.

*10% FS DMEM:* 10 g práškového média v 1 l sterilní dH<sub>2</sub>O (DMEM s nízkým obsahem glukosy – glukosa 1 000 mg·l<sup>-1</sup>; L-glutamin 1 000 mg·l<sup>-1</sup> a fenolová červec); doplněno: 10 % (v/v) FS; NaHCO<sub>3</sub> 3,7 g·l<sup>-1</sup>; penicilin 100 U/ml; streptomycin 100 µg·ml<sup>-1</sup>; 2 mmol·l<sup>-1</sup> L-glutamin

*20% FS RPMI 1640:* komerční roztok média RPMI 1640 se stabilizovaným L-glutaminem; doplněno: 20 % (v/v) FS; penicilin 100 U·ml<sup>-1</sup>; streptomycin 100 µg·ml<sup>-1</sup>

*Roztok EGTA v PBS:* 13 mmol·l<sup>-1</sup> EGTA; 137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 2,7 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 1,5 mmol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6,4 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve sterilní dH<sub>2</sub>O; pH upraveno pomocí 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH na výslednou hodnotu 7,2

*Roztok 0,1% trypsinu:* 0,1% (w/v) trypsin; 74,6 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 1,35 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 0,75 mmol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,2 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6,6 mmol·l<sup>-1</sup> EGTA ve sterilní dH<sub>2</sub>O

### 3.5.5 Test cytotoxicity – stanovení buněčné viability resazurinovým testem

Cytotoxicita testovaných látek byla ve vybraných buněčných kulturách stanovována kultivací buněk a jejich ovlivněním testovanou látkou v 96-jamkové desce (viz Obr 6). Testovaná látka byla aplikována v triplicátu šesti koncentrací ze série trojnásobného ředění ve sterilní dH<sub>2</sub>O a to tak, že k 80 µl média s buňkami bylo přidáno 20 µl roztoku testované látky. V případě rostlinných extraktů byla nejvyšší testovaná koncentrace 500 µg DW·ml<sup>-1</sup> (výsledná koncentrace DMSO 0,25 %) a v případě ouabainu

A/1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	gray	dark brown	dark brown	dark brown	dark blue	dark blue	dark blue	dark green	dark green	dark green	
C	gray	orange	orange	orange	blue	blue	blue	green	green	green	
D	gray	orange	orange	orange	blue	blue	blue	green	green	green	
E	gray	orange	orange	orange	blue	blue	blue	green	green	green	
F	gray	orange	orange	orange	blue	blue	blue	green	green	green	
G	gray	orange	orange	orange	blue	blue	blue	green	green	green	
H											

Obr. 6 Schéma rozvržení 96-jamkové desky v testech cytotoxicity. Obvodové jamky obsahovaly pouze médium (bílá); jamky B2–G2 obsahovaly neovlivněné buňky představující 100% růst; oblast 3.–5. sloupce, řady B–G obsahovala buňky ovlivněné testovanou látkou v šesti koncentracích – nejvyšší koncentrace látky v řadě B, dolů postupný pokles koncentrace v sérii trojnásobného ředění až do nejnižší koncentrace v řadě G, v rámci řady představoval 3.–5. sloupec triplikát stejné koncentrace látky. Analogický popis platí i v případě oblasti 6.–8. sloupce, řady B–G pro druhou testovanou látku a oblasti 9.–11. sloupce, řady B–G pro třetí testovanou látku.

500 nmol·l<sup>-1</sup>; 250 nmol·l<sup>-1</sup> a 125 nmol·l<sup>-1</sup>. Testy cytotoxicity, ve kterých je zkoumána viabilita buněk po inkubaci s testovanou látkou, probíhaly 72 h v případě testování rostlinných extraktů a 24 h; 48 h nebo 72 h v případě testování ouabainu.

24 h před zahájením testu byly do 96-jamkové desky vysévány buňky v 80 µl média/jamka následujícím způsobem. Pro 24h testy bylo vyséváno 10 000 buněk/jamka BJ, HeLa, MCF7 nebo K562 a 30 000 buněk/jamka CCRF-CEM. Pro účely 48h nebo 72h testů bylo vyséváno 5 000 buněk/jamka BJ, HeLa, MCF7 nebo K562 a 15 000 buněk/jamka CCRF-CEM. Buňky BJ tvořily v obou koncentracích po adherování subkonfluentní vrstvu a proliferovaly, což platí i v případě nádorových linií. 24h; 48h nebo 72h testy s konfluentními buňkami BJ byly provedeny v buňkách vyšetých v počtu 20 000 buněk/jamka.

Ke stanovení viability buněk byl použit resazurinový test. Je využíváno resazurinu schopného vstupovat do buněk a aktivního oxidačně-redukčního metabolismus živých buněk. Modře zbarvený resazurin vykazující pouze velmi slabou fluorescenci je v živých buňkách redukován zejména působením mitochondriálních NAD(P)H-dependentních oxidoreduktas na růžově zbarvený vysoce fluorescenční resorufin. Intenzita fluorescence je přímo úměrná počtu živých buněk při optimalizovaném čase inkubace buněk s resazurinem, který se odvíjí od metabolické aktivity konkrétního buněčného typu (viz webový zdroj, Assay Guidance Manual).

Zásobní roztok sodné soli resazurinu v PBS byl skladován v temnu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a s roztokem bylo manipulováno v zatemněných nádobách. Do 96-jamkové desky bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$ /jamka zásobního roztoku resazurinu ke 100  $\mu\text{l}$  roztoku obsahujícího buňky, výsledná koncentrace resazurinu v jamkách tedy byla  $0,04\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následovala inkubace 3 h, a poté měření fluorescence s excitační vlnovou délkou 544 nm při emisní vlnové délce 590 nm prostřednictvím readeru mikrotitračních desek Fluoroskan Ascent (Labsystems, Finsko).

Při stanovení hodnoty střední účinné koncentrace ( $\text{EC}_{50}$ ) byla vynesena procentuální buněčná viabilita v triplikátech proti logaritmu koncentrace testované látky a data byla proložena logistickou funkcí v software OriginPro 9.1 (OriginLab, USA). Hodnota  $\text{EC}_{50}$  byla odečtena jako koncentrace testované látky při 50% buněčné viabilitě.

*Zásobní roztok sodné soli resazurinu v PBS:*  $0,25\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  sodná sůl resazurinu;  $137\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl;  $2,7\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl;  $1,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $6,4\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; ve sterilní  $\text{dH}_2\text{O}$

### **3.5.6 Ovlivnění, sklizení a lyzace buněk**

Příprava vzorků pro analýzu proteinů metodou western blot na počátku experimentu zahrnovala vysévání buněk K562, ovlivnění buněk ouabainem a jejich následné sklizení a lyzaci.

Buňky byly vysévány na Petriho misky ( $\text{Ø}$  100 mm) vždy 24 h před zahájením ovlivnění ouabainem, měly tak dostatečný čas k adaptaci po vysetí. Pro účely experimentů s 24h ovlivněním bylo na Petriho misku vyséváno 750 000 buněk K562 a v případě časově kratšího ovlivnění (6 h, 30 min, 5 min) bylo vyséváno 1 500 000 buněk. Protože K562 jsou jako suspenzní buňky volně v médiu, ouabain byl přidáván přímo do původního média. Ovlivněné buňky byly inkubovány v inkubátoru za teploty  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 5% atmosféře  $\text{CO}_2$  při 100% vlhkosti.

Po ukončení inkubace byly buňky z Petriho misky sklizeny na ledu do vychlazené zkumavky. Při sklizení byla použita buněčná škrabka k oddělení buněk od dna Petriho misky. Petriho miska byla pro zaručení kompletního převedení buněk do zkumavky omyta 2 ml vychlazeného PBS, které bylo poté přidáno ke sklizeným buňkám.

Následovala centrifugace zkumavek se sklizenými buňkami (10 min, 1 000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), poté byl odstraněn supernatant a buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml PBS, aby došlo k oplachu buněk od zbytků média. Poté byla provedena druhá centrifugace (10 min, 1 000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), supernatant byl odstraněn a buňky byly v 1 ml PBS převedeny do

mikrozkumavky a byla provedena poslední centrifugace (10 min, 1 000 g, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a buňky byly v mikrozkumavce uloženy do hlubokomrazicího boxu při –80 °C.

Lýze buněk byla provedena po vyjmutí z hlubokomrazicího boxu a jejich volném roztátí na ledu přidáním lyzačního RIPA pufru a působením ultrazvukové sondy (45 % výkonu, 10 s, 3 cykly). Veškerá práce probíhala na ledu. Podle velikosti buněčného peletu získaného sklizením buněk z jedné Petriho misky (Ø 100 mm) bylo použito 30–50 µl lyzačního pufru. Buněčný lyzát v mikrozkumavce byl centrifugován (20 min, 14 000 g, 4 °C) a supernatant převeden do nové mikrozkumavky za současného odměření jeho objemu.

Koncentrace proteinů v lyzátech byla stanovována Bradfordovou metodou (Bradford, 1976), jako proteinový standard pro kalibrační závislost byl použit bovinní sérový albumin (BSA). Do 1 ml Bradfordova činidla byl přidán 1 µl buněčného lyzátu, vzorek byl zvortexován a 10 min inkubován za laboratorní teploty, poté byla měřena absorbance při 595 nm prostřednictvím spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu, Japonsko), stanovení bylo prováděno v duplikátech. Na základě průměrné hodnoty obsahu proteinů v buněčných lyzátech byla srovnána koncentrace proteinů ve vzorcích přidáním lyzačního RIPA pufru na hodnotu vzorku s nejnižší koncentrací proteinů a vzorky byly zvortexovány.

Ke vzorkům byl následně v množství 1/3 objemu vzorku přidán 4x Laemmliho pufr využívaný k denaturaci proteinů, kterým zároveň udílí záporný náboj. Poté byly vzorky zvortexovány a 2 min zahřívány při 98 °C a uskladněny při –80 °C.

*Zásobní roztok BSA pro kalibraci:* 0,1% (w/v) BSA v dH<sub>2</sub>O

*PBS:* 137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 2,7 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 1,5 mmol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6,4 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; ve sterilní dH<sub>2</sub>O; pH 7,4

*RIPA pufr:* 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 100 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 5 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA; 2 mmol·l<sup>-1</sup> EGTA; 0,2% Nonidet P 40; 2 mmol·l<sup>-1</sup> NaF; 1 mmol·l<sup>-1</sup> PMSF; 1 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>; 2 µg·ml<sup>-1</sup> aprotinin; 0,5 µg·ml<sup>-1</sup> leupeptin; v dH<sub>2</sub>O

*Bradfordovo činidlo:* 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (v/v) EtOH; 8,5% (v/v) kyselina fosforečná; v dH<sub>2</sub>O

*4x Laemmliho pufr:* komerční roztok po doplnění 2-ME na koncentraci 10 % (v/v)

### 3.5.7 SDS-PAGE a tankový western blotting

Vzorky proteinových extraktů skladované při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  byly po roztátí za laboratorní teploty 2 min zahřívány při  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ , poté bylo při provádění SDS-PAGE na gel nanášeno  $30\text{ }\mu\text{g}$  proteinů a  $5\text{ }\mu\text{l}$  proteinového markeru molekulových hmotností (Precision Plus Protein Dual Color Standards). Pro separaci proteinů byl použit 5% zaostřovací gel a 10% nebo 12,5% dělicí gel. SDS-PAGE probíhala 45 min při konstantním napětí 80 V, a poté, když proteiny doputovaly do separačního gelu, bylo konstantní napětí zvýšeno na 120 V.

Po dokončení elektroforetické separace byly proteiny z gelu přeneseny metodou tankového western blottingu na nitrocelulosovou membránu (póry  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ). Při přenosu proteinů byl blotovací pufr neustále chlazen ledem a proud dosahoval konstantní hodnoty 270 mA, přenos trval 2 h. Nitrocelulosová membrána byla po dokončení přenosu proteinů obarvena v roztoku Ponceau S pro vizualizaci přenesených proteinů a ponechána volně schnout za laboratorní teploty.

*10% APS:* 10% (w/v) peroxodisíran amonný v  $\text{dH}_2\text{O}$

*10% SDS:* 10% (w/v) dodecylsírán sodný v  $\text{dH}_2\text{O}$

*30% AA + 0,8% Bis:* 30% (w/v) AA; 0,08% (w/v) Bis v  $\text{dH}_2\text{O}$

*1 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 6,8:* 1 mol·l<sup>-1</sup> Tris v  $\text{dH}_2\text{O}$ ; pomocí 1 mol·l<sup>-1</sup> HCl upraveno pH na hodnotu 6,8

*1 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,8:* 1 mol·l<sup>-1</sup> Tris v  $\text{dH}_2\text{O}$ ; pomocí 1 mol·l<sup>-1</sup> HCl upraveno pH na hodnotu 8,8

*5% zaostřovací gel (1 mm, 1x):* 420  $\mu\text{l}$  30% AA + 0,8% Bis; 315  $\mu\text{l}$  1 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 6,8; 1 755  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ; 25  $\mu\text{l}$  10% SDS; 2,5  $\mu\text{l}$  TEMED; 15  $\mu\text{l}$  10% APS

*10% dělicí gel (1 mm, 1x):* 1 563  $\mu\text{l}$  30% AA + 0,8% Bis; 1 750  $\mu\text{l}$  1 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,8; 1 335  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ; 47  $\mu\text{l}$  10% SDS; 3,125  $\mu\text{l}$  TEMED; 18,75  $\mu\text{l}$  10% APS

*12,5% dělicí gel (1 mm, 1x):* 1 950  $\mu\text{l}$  30% AA + 0,8% Bis; 1 750  $\mu\text{l}$  1 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,8; 970  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ; 47  $\mu\text{l}$  10% SDS; 3,125  $\mu\text{l}$  TEMED; 18,75  $\mu\text{l}$  10% APS

*Elektroforetický pufr:* 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin; 0,1% (w/v) SDS; v  $\text{dH}_2\text{O}$

*Blotovací pufr:* 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin; v  $\text{dH}_2\text{O}$

*Roztok Ponceau S:* 0,2% (w/v) Ponceau S v 1% (v/v) kyselině octové v  $\text{dH}_2\text{O}$



### 3.5.8 Imunodetekce proteinů na membráně

Nitrocelulosová membrána obarvená Ponceau S byla nařezána dle markeru molekulových hmotností na proužky obsahující oblast molekulových hmotností odpovídající detekovanému proteinu a proužky membrány byly odbarveny roztokem TBS a 1 h blokovány v blokovacím roztoku 5% mléka, aby došlo k saturaci vazebných míst pro proteiny a nedocházelo k nespecifickému navázání protilátek.

Na proužky membrány byla po ukončení blokování nanášena v blokovacím roztoku zředěná primární protilátka. Membrána byla s primární protilátkou inkubována přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C. Následovalo promývání membrány po inkubaci s primární protilátkou na kývačce v roztoku TBS a TBS-T (5 min v TBS, 5 min TBS-T, 5 min TBS, 10 min TBS), poté byla membrána inkubována po dobu 1 h se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (horseradish peroxidase, HRP) zředěnou v blokovacím roztoku, a nakonec byla membrána opět promývána na kývačce v roztoku TBS a TBS-T (10 min v TBS, 5 min TBS-T, 5 min TBS, 10 min TBS). Obě promývací sekvence sloužily k odmytí nespecificky navázané protilátky, což usnadňuje zejména přidavek detergentu TWEEN 20 v promývacím roztoku. Informace o specifičnosti, původu a ředění protilátek ukazuje Tab. 3.

Na promytou membránu s navázanou HRP-konjugovanou sekundární protilátkou byl nanášen chemiluminiscenční luminolový substrát – podle obsahu detekovaného proteinu byl použit substrát West Femto s detekčním limitem 60 fg nebo substrát West Pico s detekčním limitem 1 pg. Po 5min inkubaci se substrátem HRP byla zahájena detekce chemiluminiscenčního signálu v přístroji LAS-4000 (Fujifilm, Japonsko), obrazový záznam byl zpracován pomocí programu Multi Gauge 2.2 (Fujifilm, Japonsko).

Tab. 3 Seznam aplikovaných protilátek a použitého ředění.

Označení proteinu	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	Použitá protilátka: klon / zdroj	Výrobce	Použité ředění protilátky
Bax	protein X asociovaný s Bcl-2	20	D2E11 / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:500
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	26	Bcl-2-100 / monoklonální myší IgG1	Sigma-Aldrich (Německo)	1:500
CASP7	kaspasa 7	35 + 20 (prokaspasa 7 + kaspasa 7)	polyklonální králičí protilátka	Cell Signaling Technology (USA)	1:250
IκBα	inhibitor α jaderného faktoru kappa B	36	C-21 / polyklonální králičí IgG	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:500
Mcl-1	myeloid cell leukemia-1	40	D35A5 / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:500
total ERK1/2	extracelulárním signálem regulovaná kinasa 1 a 2	42 + 44 (ERK2 + ERK1)	polyklonální králičí protilátka	Cell Signaling Technology (USA)	1:100
p-ERK1/2 T202/Y204 (tj. u ERK1, T185/Y187 u ERK2)	fosforylovaná extracelulárním signálem regulovaná kinasa 1 a 2	42 + 44 (p-ERK2 + p-ERK1)	polyklonální králičí protilátka	Cell Signaling Technology (USA)	1:100
total Akt	proteinkinasa B	60	C67E7 / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:100
p-Akt S473	fosforylovaná proteinkinasa B	60	D9E / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:100

Tab. 3 Seznam aplikovaných protilátek a použitého ředění (*pokračování*)

Označení proteinu	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	Použitá protilátka: klon / zdroj	Výrobce	Použité ředění protilátky
total Src	Src kinasa	60	36D10 / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:500
p-Src Y416	fosforylovaná Src kinasa	60	D49G4 / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:50
PARP-1	poly(ADP-ribose)polymerasa-1	89 + 116 (velký fragment + plná délka PARP-1)	46D11 / monoklonální králičí protilátka	Cell Signaling Technology (USA)	1:250
total pRb	retinoblastomový protein	110	D20 / monoklonální králičí protilátka	Cell Signaling Technology (USA)	1:500
p-pRb S807/S811	fosforylovaný retinoblastomový protein	110	D20B12 / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:500
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa	110 (podjednotka p110 $\alpha$ )	C73F8 / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:250
$\alpha$ -tubulin	$\alpha$ -tubulin	50	DM1A / monoklonální myší IgG1	Sigma-Aldrich (Německo)	1:500
Hsp90	protein teplotního šoku 90	90	C45G5 / monoklonální králičí IgG	Cell Signaling Technology (USA)	1:500
SWAR	swine anti-rabbit immunoglobulin	–	HRP-konjugát prasečí protilátky anti-králičí Ig	Cell Signaling Technology (USA)	1:1 000
RAM	rabbit anti-mouse immunoglobulin	–	HRP-konjugát králičí protilátky anti-myší Ig	Cell Signaling Technology (USA)	1:5 000

*TBS*: 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; v dH<sub>2</sub>O; pH upraveno pomocí koncentrované HCl na výslednou hodnotu 7,6

*TBS-T*: 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,05% (v/v) TWEEN 20; v dH<sub>2</sub>O; pH upraveno pomocí koncentrované HCl na výslednou hodnotu 7,6

*Blokovací roztok*: 5% (w/v) nízkotučné sušené kravské mléko v TBS s 0,05% (v/v) TWEEN 20

*chemiluminiscenční substrát West Femto*: 1:1 smíchané roztoky z kitu SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (1:1 roztok stabilizovaného peroxidu a luminolového HRP substrátu)

*chemiluminiscenční substrát West Pico*: 1:1 smíchané roztoky z kitu SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (1:1 roztok stabilizovaného peroxidu a luminolového HRP substrátu)

### **3.5.9 Izolace sodno-draselné ATPasy**

Izolace NKA byla s úpravami provedena podle protokolu Fedosova (2016) (detaily rozpracovány ve starší práci Klodos *et al.*, (2002)). Příprava roztoků probíhala za laboratorní teploty a úprava jejich pH po vychlazení na 4 °C. Izolace NKA byla provedena v chladové místnosti při 4 °C a používané laboratorní vybavení mělo stejnou teplotu.

Osm kusů prasečích ledvin přepravených z jatek na ledě bylo příčně nakrájeno skalpelem na plátky o tloušťce 0,5–1 cm, ze kterých byla vypreparována pomocí chirurgických kleští vnější část dřene. Vypreparovaná dřeň byla skalpelem dále rozřezána na menší části za současného odstraňování tukové tkáně a dále byla uchovávána na ledu ponořená v pufru 1 v objemovém poměru 1:1. Následně byl odlit pufr 1 a jeden hmotnostní díl tkáně samotné byl smíchán se třemi hmotnostními díly pufru 2 (z toho 25 hm% tekutý pufr 2 a 75 hm% pufr 2 ve formě ledových kostek). Poté byla provedena homogenizace směsi několika krátkými pulzy ve vychlazeném stolním mixéru, a pak prostřednictvím homogenizátoru Potterova typu pětinasobným projetím pístem.

Homogenát byl dále centrifugován (20 min, 3 700 g, 4 °C) za zisku supernatantu S1, který byl uchován na ledu, a peletu P1. Pelet P1 byl resuspendován v objemovém poměru 1:1 v pufru 2 a stejným množstvím pufru 2 byly vymyty centrifugační kyvety a pufr 2 z oplachu byl přidán k resuspendovanému peletu P1 – výsledná směs byla stejným postupem homogenizována pomocí homogenizátoru Potterova typu. Následovala centrifugace (20 min, 3 700 g, 4 °C) podruhé zhomogenizované tkáně za zisku supernatantu S2 a peletu P2. Supernatant S2 byl přidán k supernatantu S1 a pelet P2 byl

odstraněn. Směs supernatantů S1+S2 byla centrifugována (20 min, 3 700 g, 4 °C), čímž byl získán dále na ledu uchovávaný supernatant S3 a pelet P3, který byl odstraněn.

Supernatant S3 byl podroben ultracentrifugaci (40 min, 38 000 g, 4 °C) za zisku supernatantu S4 a peletu P4. V tomto případě byl odstraněn supernatant S4, zatímco pelet P4 byl resuspendován ve 30 ml pufru 2, a dále stejným postupem homogenizován pomocí homogenizátoru Potterova typu. Tak byla získána mikrosomální frakce, ve které byla stanovena koncentrace proteinů metodou dle Bradford (1976) s úpravami (záměna EtOH za MeOH). Jedna část mikrosomální frakce byla po úpravě koncentrace proteinů na požadovanou hodnotu rozaliquotována pro účely dlouhodobého skladování při -80 °C (možné až několik měsíců) a pro potřeby měření s NKA v mikrosomální frakci. Z druhé části mikrosomální frakce byla dále purifikována NKA (viz následující kapitola 3.5.10).

*Pufř 1:* 30 mmol·l<sup>-1</sup> L-histidin; 250 mmol·l<sup>-1</sup> sacharosa; v dH<sub>2</sub>O; pH upraveno pomocí 1 mol·l<sup>-1</sup> HCl na výslednou hodnotu 7,3

*Pufř 2:* 25 mmol·l<sup>-1</sup> imidazol; 250 mmol·l<sup>-1</sup> sacharosa; 1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA; v dH<sub>2</sub>O; pH upraveno pomocí 1 mol·l<sup>-1</sup> HCl na výslednou hodnotu 7,4

*Upravené Bradfordovo činidlo:* 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 5% (v/v) MeOH; 8,5% (v/v) kyselina fosforečná; v dH<sub>2</sub>O

*1% BSA pro kalibraci:* 1% (w/v) BSA v dH<sub>2</sub>O

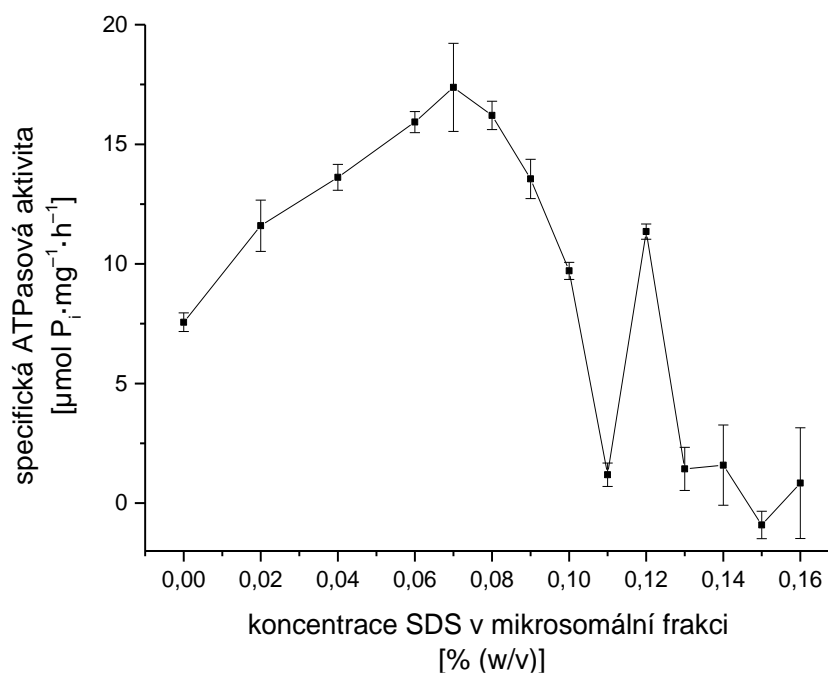
### **3.5.10 Optimalizace koncentrace SDS a purifikace sodno-draselné ATPasy z mikrosomů**

Získané mikrosomy mohou být za použití detergentu SDS dále solubilizovány a pomocí série ultracentrifugací může být izolována NKA o vyšší čistotě. Koncentrace proteinů v části mikrosomální frakce byla upravena na koncentraci 4,6 mg·ml<sup>-1</sup> přidáním pufru 2. Bylo připraveno celkem 14 vzorků o objemu 100 μl, které tvořilo vždy 80 μl mikrosomální frakce s koncentrací proteinů 4,6 mg·ml<sup>-1</sup> a 20 μl roztoku různě koncentrovaného SDS (roztoky SDS připraveny dle Tab. 4).

Vzorky mikrosomálních frakcí a roztoků SDS o daných koncentracích byly 15 h inkubovány za teploty 20 °C, a následně byla změřena ATPasová aktivita NKA v každém ze vzorků (viz kapitola 3.5.12) a byla vztažena na celkový obsah proteinů. Poté byl sestrojen graf závislosti specifické ATPasové aktivity mikrosomální frakce na obsahu SDS (viz Obr. 7) a z něj byla odečtena hodnota koncentrace SDS, při které byla specifická ATPasová aktivita nejvyšší, což bylo 0,07% SDS.

Tab. 4 Příprava roztoků SDS ředěním 1% SDS pufrům 2.

Číslo vzorku předředěného SDS	Koncentrace SDS [% (w/v)]	Objem 1% SDS [ $\mu$ l]	Objem pufru 2 [ $\mu$ l]
1	0	0	1 000
2	0,10	100	900
3	0,20	200	800
4	0,30	300	700
5	0,35	350	650
6	0,40	400	600
7	0,45	450	550
8	0,50	500	500
9	0,55	550	450
10	0,60	600	400
11	0,65	650	350
12	0,70	700	300
13	0,75	750	250
14	0,80	800	200



Obr. 7 Graf závislosti specifické ATPasové aktivity mikrosomální frakce po 15h inkubaci při 20 °C na koncentraci SDS. Koncentrace SDS 0,07% (w/v) odpovídající vrcholu křivky byla zvolena jako optimální. ( $n = 4$ , kromě 0,06; 0,09; 0,10; 0,11; 0,12 %, kde  $n = 3$ ).

Ve zbylé části mikrosomální frakce byla koncentrace proteinů pufrům 2 upravena na hodnotu  $4,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  a koncentrace SDS byla doplněna na optimalizovanou hodnotu 0,07 % (w/v). Následovala inkubace 15 h při 20 °C za současného míchání o rychlosti 150 RPM na magnetické míchačce. Po ošetření mikrosomů SDS byla aktivovaná mikrosomální frakce podrobena promývacím krokům prostřednictvím pěti kol

ultracentrifugací (50 min, 127 000 g, 4 °C), supernatant byl vždy odstraněn a pelet byl resuspendován ve vychlazeném pufru 3. Poslední resuspendování peletu bylo provedeno v 10 ml pufru 3 a byl stanoven obsah proteinů a specifická ATPasová aktivita, na základě čehož byl vyizolovaný protein naředěn na koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup>, rozalikovován po 1 ml a uložen do -80 °C. Tím byla získána purifikovaná NKA, jejíž čistota byla stanovena pomocí SDS-PAGE (viz následující kapitola 3.5.11).

*Pufř 2:* 25 mmol·l<sup>-1</sup> imidazol; 250 mmol·l<sup>-1</sup> sacharosa; 1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA; v dH<sub>2</sub>O; pH upraveno pomocí 1 mol·l<sup>-1</sup> HCl na výslednou hodnotu 7,4

*Pufř 3:* 20 mmol·l<sup>-1</sup> L-histidin; 250 mmol·l<sup>-1</sup> sacharosa; 0,9 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA; v dH<sub>2</sub>O; pH upraveno pomocí 1 mol·l<sup>-1</sup> HCl na výslednou hodnotu 7,0

*1% SDS:* 1% (w/v) SDS v pufru 2

*1% BSA pro kalibraci:* 1% (w/v) BSA v dH<sub>2</sub>O

### **3.5.11 Stanovení čistoty vyizolované sodno-draselné ATPasy metodou SDS-PAGE**

Čistota vyizolované NKA byla stanovena metodou SDS-PAGE vyhodnocovanou barvením proteinů v gelu stříbrem nebo Coomassie Brilliant Blue G-250 s následnou denzitometrií.

Metoda SDS-PAGE byla popsána v kapitole 3.5.7. Na gel bylo nanášeno 34,5 µg proteinů mikrosomální frakce a 7,5 µg proteinů frakce purifikované NKA a 5 µl standardu molekulových hmotností (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa). Po rozseparování proteinů metodou SDS-PAGE byly proteiny barveny stříbrem za použití komerčního kitu dle návodu poskytovaného výrobcem (metoda dle údajů výrobce dosahuje citlivosti 0,1 ng·mm<sup>-2</sup> pro BSA). V druhém případě byla použita metoda barvení proteinů barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250, která dosahuje nižší citlivosti.

Záznam gelů s obarvenými proteiny a denzitometrické vyhodnocení byly provedeny přístrojem Amersham Imager 600 (GE Healthcare Bio-Science AB, Švédsko).

*Roztok pro barvení gelu stříbrem:* připraveno dle komerčního kitu ProteoSilver Silver Stain Kit

*Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue G-250:* 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 5% (v/v) MeOH; 8,5% (v/v) kyselina fosforečná; v dH<sub>2</sub>O

### 3.5.12 Upravená Baginského metoda měření ATPasové aktivity

Aktivita NKA byla měřena pomocí Baginského metody (Baginski *et al.*, 1967) s úpravami dle Cariani *et al.* (2004) spočívajícími v náhradě arsenitanu sodného za méně toxický citrát bismutitý. Modifikovaná Baginského metoda stanovení fosfátů je spektrofotometrická metoda, ve které je měřena absorbance molybdenové modři při 710 nm. Pomocí kalibrační funkce stanovené měřením s hydrogenfosforečnanem draselným je poté kvantifikován obsah fosfátů ve vzorku, z čehož je možné zjistit ATPasovou aktivitu NKA.

ATPasová aktivita NKA je na konci inkubace za podmínek vhodných pro enzymatickou reakci inhibována snížením pH, čehož je docíleno přidavkem kyseliny chlorovodíkové (roztok 2). Reakcí ATPasovou aktivitou vyprodukovaného fosfátu a molybdenanu amonného vzniká kyselina fosfomolybdenová, která je redukcí kyselinou askorbovou převedena na molybdenovou modř. Inhibující roztok 2 kromě kyseliny chlorovodíkové zároveň obsahuje komponenty nutné pro zahájení barvení, tedy molybdenan amonný a kyselinu askorbovou. Barevný produkt je stabilizován přidavkem citrátu bismutitého (roztoku 3), který zároveň zvyšuje citlivost metody zintenzivněním zbarvení fosfomolybdátu jeho redukcí a zamezuje vzniku další molybdenové modře, protože vyváže nezreagovaný molybdenan do formy blíže necharakterizovaných Mo-Bi sloučenin, nejspíše směsných oxidů rozpustných za nízkého pH. Barevný produkt je stabilní v řádu hodin. Za podmínek bez přítomnosti citrátu bismutitého by molybdenan dále reagoval s fosfátem uvolněným neenzymatickou hydrolýzou ATP, takže by vývoj zbarvení pokračoval, a v důsledku by došlo k nadhodnocení koncentrace fosfátů ve vzorku po ukončení enzymatické reakce (Cariani *et al.*, 2004).

Množství fosfátu vyprodukovaného ATPasovou aktivitou pouze NKA je zjištěno jako rozdíl množství fosfátu vyprodukovaného reakcí bez přítomnosti inhibitoru a reakcí za přítomnosti vysoce selektivního inhibitoru NKA ouabainu. Vzorek obsahující vyzolovaný enzym totiž může obsahovat i další ATPasy izolované z tkáně zároveň s NKA, které také hydrolyzují ATP. Navíc i sám vzorek obsahuje fosfáty pocházející ať už z původní biologické tkáně, nebo vznikající neenzymatickou hydrolýzou přidaného ATP. Paralelním měřením ATPasové aktivity stejných vzorků obsahujících navíc ouabain se tak stanoví množství právě těchto fosfátů, které nejsou specifickým produktem ATPasové aktivity NKA.

Měření probíhalo v mikrotitrační desce za laboratorní teploty, pro přípravu roztoků byla použita Milli-Q H<sub>2</sub>O a pipetování v samotném měření bylo prováděno ručně nebo



za použití automatické pipetovací stanice Freedom EVO (Tecan, Švýcarsko). V měření ATPasové aktivity při izolaci NKA byla ATPasová reakce zahájena přidáním enzymu do reakční směsi. Po 6min průběhu ATPasové reakce došlo k jejímu zastavení přidáním roztoku 2, následoval vývoj barevného produktu po dobu 8 min, a poté bylo ukončeno barvení přidáním roztoku 3. Absorbance barevného produktu byla měřena při 710 nm prostřednictvím readeru mikrotitračních desek Synergy Mx (BioTek, USA). Postup měření při stanovování enzymové aktivity při izolaci NKA shrnují následující body:

- 1) Napipetováno 48  $\mu\text{l}$  ATPasového pufru obsahujícího ATP nebo ouabainového pufru obsahujícího ATP
- 2) Přidání 2  $\mu\text{l}$  roztoku vyizolovaného enzymu s koncentrací proteinů 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- 3) Inkubace 6 min
- 4) Přidáno 75  $\mu\text{l}$  roztoku 2
- 5) Inkubace 8 min
- 6) Přidáno 125  $\mu\text{l}$  roztoku 3
- 7) Absorbance měřena při 710 nm

V případě měření inhibiční aktivity zkoumaných rostlinných extraktů a jejich frakcí předcházela zahájení ATPasové reakce 5min inkubace enzymu s testovanou látkou o dané koncentraci a ATPasová reakce byla zahajována přidáním ATP. Konkrétní postup měření při stanovování inhibiční aktivity testovaných látek shrnují následující kroky:

- 1) Napipetováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku NKA nebo roztoku NKA s ouabainem
- 2) Přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky ředěné v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$
- 3) Inkubace 5 min
- 4) Přidáno 20  $\mu\text{l}$  7,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ATP
- 5) Inkubace 6 min
- 6) Přidáno 75  $\mu\text{l}$  roztoku 2
- 7) Inkubace 8 min
- 8) Přidáno 125  $\mu\text{l}$  roztoku 3
- 9) Absorbance měřena při 710 nm

Finální reakční směs s testovanou látkou o dané koncentraci, resp. finální reakční směs při měření ATPasové aktivity při izolaci NKA měla celkový objem 50  $\mu\text{l}$  a obsahovala 3  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ATP; 3  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 130  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl; 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol a vyizolovaný enzym s koncentrací proteinů 0,04  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a v případě měření za přítomnosti inhibitoru i 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ouabain.

Pro vytvoření kalibrační funkce byl aplikován postup, kdy bylo k 50  $\mu\text{l}$  vody obsahujícím 0; 2,5; 5; 10; 17,5; 25; 30 nebo 37,5 nmol  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  přidáno 75  $\mu\text{l}$  roztoku 2, následovala inkubace 8 min, a poté bylo přidáno 125  $\mu\text{l}$  roztoku 3. Nakonec byla změřena absorbance při 710 nm.

*ATPasový pufr obsahující ATP:* 3  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ATP; 4  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 130  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl; 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol; v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,2

*Ouabainový pufr obsahující ATP:* 3  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ATP; 4  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 130  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl; 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol; 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ouabain; v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,2

*ATPasový pufr 1,25x:* 162,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 25  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl; 3,75  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 37,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol; v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,2

*Roztok NKA:* 1,25x ATPasový pufr obsahující vyizolovaný enzym s koncentrací proteinů 0,04  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

*Roztok NKA s ouabainem:* 1,25x ATPasový pufr obsahující vyizolovaný enzym s koncentrací proteinů 0,04  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ouabainu

*Roztok 7,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ATP:* 7,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ATP v 1,25x ATPasovém pufru (aliquoty pro jedno použití skladované při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ )

*Roztok 1:* 10% (w/v) molybdenan amonný tetrahydrát v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$  (vždy připraven nový roztok)

*Roztok 2:* 4,4% (w/v) HCl; 2,86% SDS (w/v); 0,16  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyselina L-askorbová; 0,5% (w/v) molybdenan amonný tetrahydrát (doplněn nakonec přidáním roztoku 1); v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$  (vždy připraven nový roztok)

*Roztok 3:* 88  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  citrát bismutitý; 163  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  citrát sodný; 4,4% (w/v) HCl; v Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$  (skladováno v zatemněné lahvi při  $4\text{ }^\circ\text{C}$ )

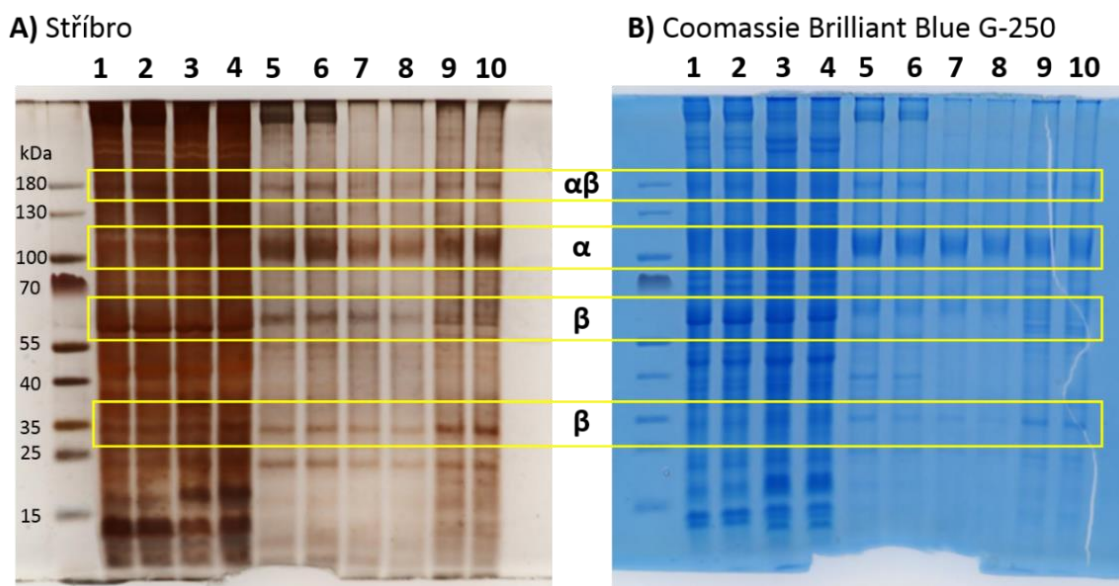
## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V praktické části bakalářské práce byly provedeny vybrané experimenty, které byly součástí rozsáhlejšího výzkumu biologické aktivity rostlinných extraktů prováděného v Laboratoři růstových regulátorů disponující rozsáhlou knihovnou extraktů přírodních produktů. Rozšíření této knihovny o nové položky bylo součástí přípravy na bakalářskou práci a na základě průzkumu aktivity desítek druhů extraktů byly dále vybrány pouze tři rostlinné druhy – vrbka úzkolistá, udatna lesní a violka vonná, kterým se bylo věnováno v této práci.

Na Oddělení biofyziky UP byla provedena izolace sodno-draselné ATPasy (NKA) pro účely měření ATPasové aktivity NKA v přítomnosti zkoumaných rostlinných extraktů. V případě extraktů tří zmíněných rostlinných druhů byla zkoumána také jejich cytotoxicita a byla provedena jejich frakcionace s následným sledováním distribuce inhibiční aktivity v NKA mezi jednotlivé frakce. Dále byl studován kardenolid ouabain jako modelová látka, vysoce selektivní inhibitor NKA, z hlediska jeho cytotoxického působení v buněčných liniích a byl sledován vliv ouabainu na proteiny účastníci se signálních drah souvisejících s NKA v linii chronické myelogenní leukemie K562.

### 4.1 Izolace sodno-draselné ATPasy

Stanovení čistoty vyizolované NKA bylo provedeno metodou SDS-PAGE s barvením proteinů v gelu stříbrem nebo Coomassie Brilliant Blue G-250 (viz Obr. 8). Procentuální čistota vyizolované NKA byla spočítána jako součet procentuálního zastoupení ploch bandů odpovídajících dimeru  $\alpha\beta$ , podjednotce  $\alpha$  a podjednotce  $\beta$  z celkové plochy všech bandů dráhy 6, resp. 7 (vyjádřeno jako průměr vzorků z dráhy 6 a 7). Jedná se o orientační stanovení čistoty, protože bez provedení imunodetekce není zcela jasné, které všechny bandy odpovídají podjednotce  $\beta$  s různým rozsahem glykosylace, čímž je pravděpodobně čistota mírně podhodnocena. Literatura uvádí zde při vyhodnocení uvažovaný rozsah molekulové hmotnosti podjednotky  $\beta$  v závislosti na míře glykosylace 35–55 kDa (Hundal *et al.*, 1993; Lingrel a Kuntzweiler, 1994). Gel barvený Coomassie Brilliant Blue G-250 byl nedopatřením roztržen, došlo však pouze k narušení oblasti, která nebyla denzitometricky vyhodnocována.



Obr. 8 Vyhodnocení SDS-PAGE barvením proteinů A) stříbrem a B) Coomassie Brilliant Blue G-250. *dráhy*: 1 a 2 – mikrosomy nové, 3 a 4 – mikrosomy 1 rok staré, 5 a 6 – purifikovaná sodno-draselná ATPasa (NKA) nová, 7 a 8 – purifikovaná NKA 0,5 roku stará, 9 a 10 – purifikovaná NKA 1 rok stará. Žluté rámečky ukazují oblasti výskytu bandů  $\alpha\beta$  dimeru NKA (~ [112 + 55] kDa), podjednotky  $\alpha$  (112 kDa) a podjednotky  $\beta$  (55 a 35 kDa).

Dráhy 1 a 2 obsahují mikrosomy vyizolované v rámci této bakalářské práce a dráhy 3 a 4 obsahují mikrosomy z předchozí izolace NKA (nanášeno vždy 34,5  $\mu\text{g}$  proteinů). Oproti drahám 5–10 s nanesenou vyizolovanou frakcí NKA je vidět intenzivní zbarvení drah s mikrosomálními frakcemi značící velký obsah znečišťujících proteinů. Intenzitu zbarvení však nelze porovnávat přímo, protože na dráhy 5–10 bylo nanášeno menší množství proteinů (7,5  $\mu\text{g}$  proteinů frakce purifikované NKA).

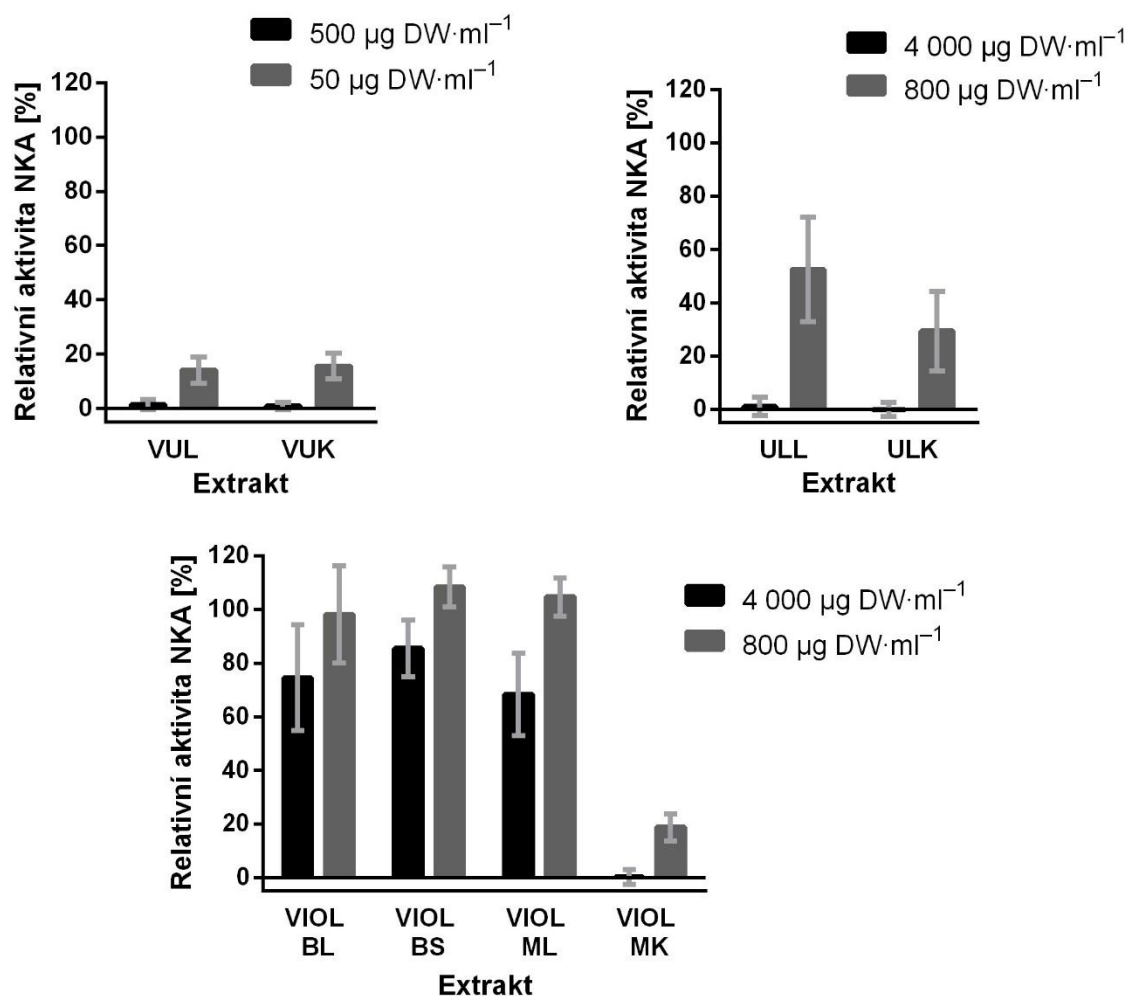
Dráhy 5–10 obsahují méně bandů oproti mikrosomálním frakcím, což je patrné i při citlivějším barvení proteinů stříbrem, a to značí úspěšné provedení promývacích kroků. Při těchto krocích byla k mikrosomální frakci přidána nalezená optimální koncentrace SDS a následovala série ultracentrifugací, při kterých se z mikrosomální frakce odmyvaly znečišťující proteiny a mikrosomy byly solubilizovány – při tomto purifikačním kroku je důležitý fakt, že NKA je poměrně rezistentní vůči denaturaci způsobované SDS (Ivanov *et al.*, 2004).

Při porovnání čistoty NKA vyizolované v rámci bakalářské práce (dráhy 5–6) s půl roku (dráhy 7–8) a rok (dráhy 9–10) starými izoláty lze vidět, že protein má střední čistotu vzhledem k starším vzorkům. Nový izolát má výraznější bandy příslušející NKA oproti půl roku starému vzorku a zároveň je méně znečištěný než rok starý vzorek. Barvením stříbrem byla čistota nově vyizolované purifikované NKA (dráhy 6 a 7) denzitometricky stanovena jako  $69 \pm 7 \%$  a barvením Coomassie Brilliant Blue G-250 jako  $66 \pm 6 \%$ .

## 4.2 Inhibiční účinek vybraných rostlinných extraktů a jejich frakcí na ATPasovou aktivitu sodno-draselné ATPasy

V rámci rozšiřování knihovny extraktů a průběžného testování biologické aktivity byly vybrány extrakty tří rostlinných druhů inhibující ATPasovou aktivitu NKA pro podrobnější výzkum. Jednalo se o druhy udatna lesní (*Aruncus vulgaris*), vrbka úzkolistá (*Chamerion angustifolium*) a violka vonná (*Viola odorata*). Literární rešerše nepotvrdila, že by bylo doposud publikováno měření prokazující inhibici ATPasové aktivity NKA studovanými extrakty. Pouze v případě vrbky je v listech popsána přítomnost kyseliny ursolové a oleanové, které jsou již známými mírnými inhibitory NKA (Glen *et al.*, 1967; Chen *et al.*, 2010).

Inhibiční aktivitu celkových MeOH extraktů ukazuje Obr. 9. Extrakty VUL (vrbka úzkolistá, list) a VUK (vrbka úzkolistá, květ) mají v obou testovaných koncentracích

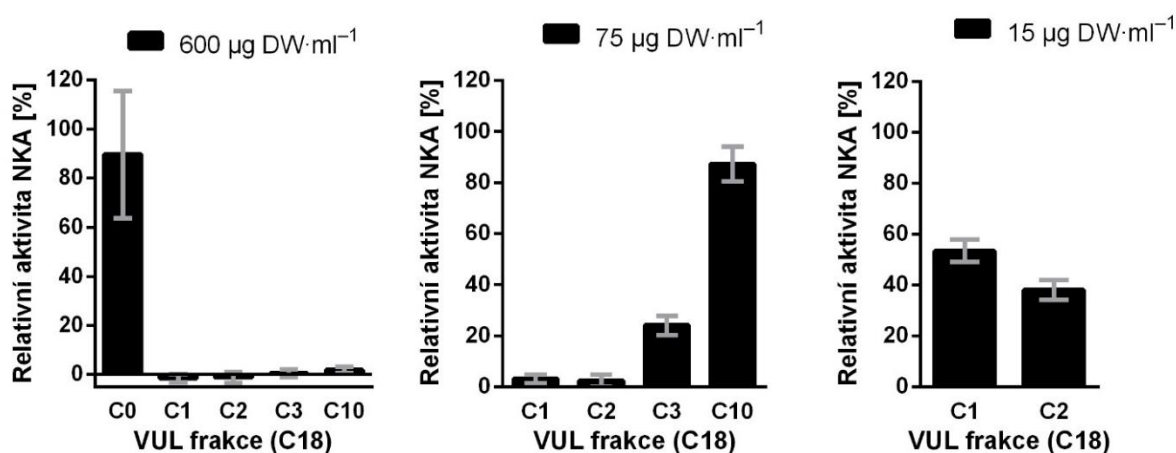


Obr. 9 Inhibice ATPasové aktivity NKA rostlinnými celkovými MeOH extrakty. VUL: vrbka úzkolistá, list; VUK: vrbka úzkolistá, květ; ULL: udatna lesní, list; ULK: udatna lesní, květ; VIOL: violka vonná – BL: bíle kvetoucí, list / BS: bíle kvetoucí, semeno / ML: modře kvetoucí, list / MK: modře kvetoucí, kořen. (průměr ± SD;  $n = 4$ ).

podobnou inhibiční aktivitu. Pro další analýzu SPE frakcionací byl vybrán extrakt VUL inhibující NKA při koncentraci  $50 \mu\text{g DW}\cdot\text{ml}^{-1}$  na  $14 \pm 5 \%$  relativní ATPasové aktivity. V případě extraktů ULL (udatna lesní, list) a ULK (udatna lesní, květ) vykazuje vyšší inhibiční aktivitu extrakt ULK ( $800 \mu\text{g DW}\cdot\text{ml}^{-1}$  inhibuje NKA na hodnotou  $29 \pm 15 \%$  relativní aktivity), který byl proto vybrán pro další analýzu SPE frakcionací. Ze vzorků extraktů violky vonné ATPasovou aktivitu nejvíce inhibuje vzorek VIOL MK (violka vonná, modře kvetoucí, kořen), který redukuje ATPasovou aktivitu na  $19 \pm 5 \%$  oproti kontrole při koncentraci  $800 \mu\text{g DW}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a proto byl vybrán pro další analýzu SPE frakcionací.

Nejprve byla s vybranými celkovými extrakty provedena SPE frakcionace za použití pevné fáze reverzní fáze C18 a byly změřeny inhibiční aktivity frakcí. V případě všech extraktů byla zachována aktivita i po frakcionaci a byla pozorována jednoznačná tendence zadržení aktivity v určitých frakcích. Tento fakt otvírá cestu pro další možné analýzy přístupem korelační metabolomiky s cílem identifikovat v extraktech účinné látky s inhibiční aktivitou.

Předběžnou analýzou extraktu VUL frakcionací prostřednictvím extrakce kapalina-kapalina (výsledky nejsou prezentovány) bylo zjištěno, že inhibiční aktivita extraktu je zadržována pouze v polárních frakcích. Na základě těchto předběžných výsledků byla tedy provedena SPE frakcionace s reverzní fází C18 pouze první sadou eluentů (C0–C3) a nakonec byla SPE kolona vymyta 100% MeOH (C10). Při dostatečném zředění frakcí bylo zjištěno, že aktivita je zadržována zejména ve frakcích C1 a C2 obsahujících semipolární látky zadržované na koloně a eluované 10%, resp. 20% MeOH (viz Obr. 10).

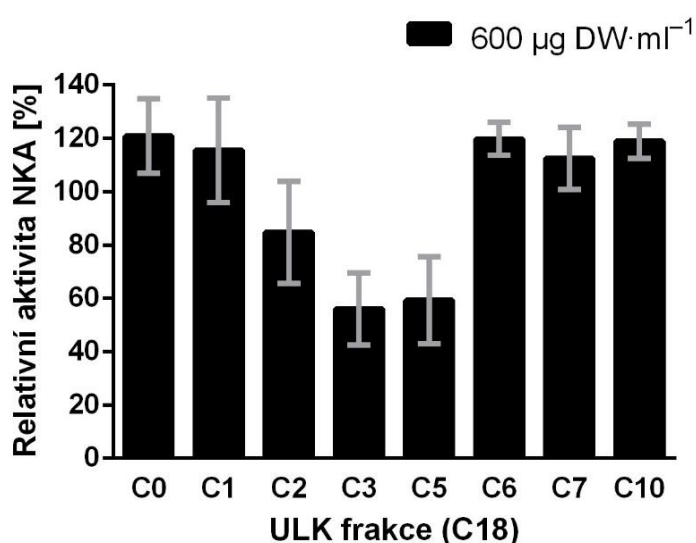


Obr. 10 Inhibice ATPasové aktivity NKA frakcemi MeOH extraktu VUL (vrbka úzkolistá, list) získanými SPE frakcionací pomocí pevné fáze reverzní fáze C18. Postupné ředění ukazuje, že inhibiční aktivita je koncentrována do frakcí C1 a C2. (průměr  $\pm$  SD;  $n = 4$ ).

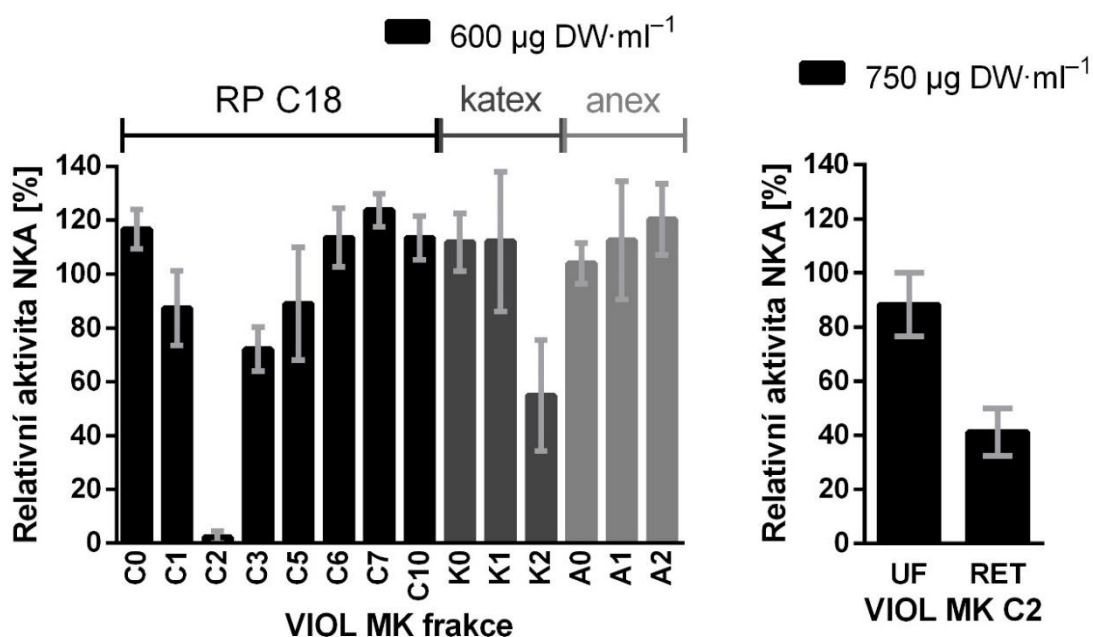
Nejvíce inhibovala ATPasovou aktivitu NKA frakce C2, která při zředění na koncentraci  $15 \mu\text{g DW}\cdot\text{ml}^{-1}$  snížila relativní ATPasovou aktivitu na hodnotu  $38 \pm 4 \%$ .

V případě C18-fraze extraktu ULK byla změřena nejnižší relativní ATPasová aktivita ve vzorcích C3 a C5 ( $600 \mu\text{g DW}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), a to  $56 \pm 14 \%$ , resp.  $59 \pm 16 \%$  (viz Obr. 11). Eluční profil inhibiční aktivity je v případě extraktu ULK plynulejší, dochází k zadržování potenciálního semipolárního inhibitoru na koloně a jeho eluci zejména 30% a 50% MeOH. Účinné frakce extraktu ULK vykazovaly nejnižší inhibiční aktivitu ze všech účinných frakcí tří vybraných studovaných extraktů.

Z extraktů VUL, ULK a VIOL MK byl na základě měření inhibiční aktivity C18-fraze vybrán extrakt VIOL MK pro další analýzu. Rozhodnutí bylo učiněno na základě zřetelného zadržení inhibiční aktivity ve frakci VIOL MK C2, což může naznačovat možný inhibiční vliv chemického individua namísto komplexní směsi různých látek. V případě synergického působení více látek najednou totiž při frakcionaci dochází důsledkem separace synergizujících látek často ke ztrátě aktivity, což u extraktů není pozorováno, a naopak zde dochází k výraznému zakoncentrování aktivity ve frakci VIOL MK C2 ( $2 \pm 2 \%$  relativní aktivity NKA při koncentraci  $600 \mu\text{g DW}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Frakce C2 obecně obsahuje semipolární látky zadržované na koloně, které se z ní eluují 20% MeOH. Podrobnější analýza extraktu VIOL MK zahrnovala další frakcionaci metodou SPE s pevnou fází katex a anex, dále byla použita frakcionace ultrafiltrací za použití ultrafiltrů Amicon Ultra (MWCO 3 kDa) – grafy aktivit těchto frakcí jsou ukázány na Obr. 12.



Obr. 11 Inhibice ATPasové aktivity NKA frakcemi MeOH extraktu ULK (udatna lesní, květ) získanými SPE frakcionací pomocí pevné fáze reverzní fáze C18. Inhibiční aktivita je koncentrována do frakcí C3 a C5. (průměr  $\pm$  SD;  $n = 4$ ).



Obr. 12 Inhibice ATPasové aktivity NKA frakcemi MeOH extraktu VIOL MK (violka vonná, modře kvetoucí, kořen). *vlevo*: inhibiční aktivity frakcí získaných SPE frakcionací pomocí reverzní fáze C18 (C), katexu (K) a anexu (A) – Inhibiční aktivita je koncentrována ve frakcích C2 a K2. *vpravo*: inhibiční aktivity frakcí VIOL MK C2 získaných ultrafiltrací – Inhibiční aktivita je zadržována v retentátu (RET), zatímco ultrafiltrát (UF) je méně aktivní. (průměr ± SD;  $n = 4$ ).

C18-frakce VIOL MK C2 byla dále frakcionována pomocí ultrafiltrů Amicon Ultra a byly získány dvě nové frakce – ultrafiltrát (VIOL MK C2 UF) a retentát (VIOL MK C2 RET). Jak je ukázáno na Obr. 12, došlo k zadržení inhibiční aktivity v retentátu. Předběžné výsledky necílené analýzy UHPLC-QTOF-MS obou frakcí (data nejsou součástí bakalářské práce) ovšem u ultrafiltrů Amicon Ultra prokázaly, že oproti cut-off hodnotě 3 kDa deklarované výrobcem dochází k zadržení početné skupiny látek s výrazně menší molekulovou hmotností v retentátu. Výsledky měření aktivit ultrafiltrátu a retentátu tedy nemusí poukazovat na to, že potenciální inhibitor obsažený v extraktu je vysokomolekulární látkou.

### 4.3 Cytotoxická aktivita vybraných rostlinných extraktů

Byla stanovena střední účinná koncentrace ( $EC_{50}$ ) vybraných rostlinných extraktů, tj. VUL, ULK a VIOL MK, v testech cytotoxického účinku (viz Tab. 5). Extrakty byly testovány v sérii trojnásobného ředění celkem o šesti koncentracích s nejvyšší dosaženou koncentrací extraktu 500 µg DW·ml<sup>-1</sup> a inkubace extraktu v buněčných kulturách byla 72 h. Použité buněčné kultury byly odvozeny od lidských kožních fibroblastů (BJ), chronické myelogenní leukemie (K562), akutní lymfoblastické leukemie (CCRF-CEM), cervikálního adenokarcinomu (HeLa) a prsního adenokarcinomu (MCF7).



Tab. 5 Střední účinná koncentrace (EC<sub>50</sub>) extraktů v testech cytotoxického účinku po 72h inkubaci v buněčných kulturách lidských kožních fibroblastů (BJ), chronické myelogenní leukemie (K562), akutní lymfoblastické leukemie (CCRF-CEM), cervikálního adenokarcinomu (HeLa) a prsního adenokarcinomu (MCF7). VUL: vrba úzkolistá, list; ULK: udatna lesní, květ; VIOL MK: violka vonná, modře kvetoucí, list. (průměr ± SD; n = 2; biologický replikát).

extrakt	buněčná kultura a EC <sub>50</sub> [μg DW·ml <sup>-1</sup> ] v 72h testu				
	BJ	K562	CCRF-CEM	HeLa	MCF7
VUL	202 ± 12	134 ± 58	160 ± 0,3	80 ± 21	113 ± 17
ULK	>500	>500	76 ± 18	>500	>500
VIOL MK	>500	>500	>500	>500	>500

Extrakt VIOL MK nebyl do koncentrace 500 μg DW·ml<sup>-1</sup> cytotoxický. Vyšší koncentrace extraktu nebyly testovány, protože hodnoty EC<sub>50</sub> extraktů ve vysokých koncentracích, jako jsou stovky μg DW·ml<sup>-1</sup>, již nejsou obvykle považovány za biologicky zajímavé, neboť se jedná o koncentrace příliš vysoké – látka v těchto koncentracích často vykazuje nespecifickou cytotoxicitu i v nenádorových liniích a vysoké hodnoty koncentrací látek nejsou mnohdy reálně dosažitelné *in vivo*. V různých orgánech violek však byl prokázán obsah cytotoxických cyklických peptidů – cyklotidů, na které se upírá pozornost moderního výzkumu (Trabi a Craik, 2004; Parsley *et al.*, 2018).

Extrakt ULK byl cytotoxický pouze v linii CCRF-CEM (EC<sub>50</sub> 76 ± 18 μg DW·ml<sup>-1</sup>), nevykazoval cytotoxicitu pro adherentní buňky (BJ, HeLa a MCF7) a ani pro druhou ze zastoupených suspenzních linií, K562. Působení ULK je tedy nejspíš založeno na jiných faktorech než těch, které odlišují suspenzní a adherentní buněčné linie (jedná se například o větší povrch suspenzních buněk a jejich obecně vyšší citlivost ke změnám vnějšího prostředí). Pozitivním výsledkem je, že ULK není cytotoxický pro nenádorové buňky BJ.

V práci Han *et al.*, (2012) byla zjištěna cytotoxická aktivita dichlormethanové frakce extraktu udatny lesní v řádu desítek μg·ml<sup>-1</sup> v buněčných liniích T-lymfocytárních leukemií Jurkat, akutní myelogenní leukemie HL60 a nádorové linie kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu, dále také nebyla zjištěna toxicita v nenádorových prsních epitelových buňkách. Mechanismem cytotoxického účinku je indukce apoptosy a jako účinná látka byl ve frakci identifikován aruncin B, jehož struktura byla později revidována (Ribaucourt a Hodgson, 2016). V rámci bakalářské práce nebyla zjištěna cytotoxicita ULK v nenádorových buňkách BJ ani v linii K562, která se liší od HL60 a Jurkat linie expresí fúzní kinasy BCR-ABL (Chai *et al.*, 2011). Apoptosa vyvolaná stejnou látkou může mít jiný mechanismus v liniích myelogenních leukemií K562 a HL60, jak bylo zjištěno například u inhibitoru proteasomu bortezomibu (Kliková *et al.*, 2015). Stejně tak citlivost leukemických linií na působení flavonoidů a mechanismus ovlivnění

buněčného cyklu flavonoidy, jako je kvercetin nebo kaempferol, které udatna lesní obsahuje (Fusani *et al.*, 2016), se napříč leukemickými liniemi liší v závislosti na buněčném typu (Sak a Everaus, 2017).

Z udatny lesní byly izolovány látky cytotoxické v liniích HeLa a MCF7, nebo pouze v jedné z těchto linií v koncentracích jednotek až desítek  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Vo *et al.*, 2014). K extrakci však byla využita celá nadzemní část rostliny a jako rozpouštědlo byl využit EtOH a tyto látky byly izolovány z *n*-butanolové frakce extraktu. Oproti tomu v této bakalářské práci je studován cytotoxický účinek extraktu pouze z květu, který tyto cytotoxické látky nemusí obsahovat, nebo je obsahuje v menší míře. Navíc je k extrakci využit více polární MeOH a extrahované látky ani dále nejsou zakoncentrovány do frakcí nepolárních rozpouštědel, proto se mohou extrahovat hůře a jejich obsah bude v testovaném extraktu zřejmě rozdílný. To může být příčinou, proč nebyla v bakalářské práci zjištěna cytotoxicita v liniích HeLa a MCF7. Nebyly nalezeny výzkumy soustředující se na cytotoxický účinek extraktu z květů udatny lesní, což znemožňuje dostatečné srovnání výsledků změřených v bakalářské práci s literaturou. Je však pravděpodobné, že v květech rostliny se nacházejí obsahové látky v jiných koncentracích nebo látky zcela odlišné než v často zkoumaných extraktech celé nadzemní části a možný je i výskyt selektivně cytotoxických sloučenin, jak naznačuje i srovnání s pracemi Vo *et al.* (2014) a Han *et al.* (2012), které u některých obsahových látek selektivitu v působení dokumentují.

Nejvíce cytotoxický byl extrakt VUL, u kterého bylo možné stanovit  $\text{EC}_{50}$  za daných podmínek ve všech buněčných kulturách s nejnižší dosaženou hodnotou v linii HeLa ( $80 \pm 21 \mu\text{g DW}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Signifikantní toxicita extraktu nadzemní části vrbky úzkolisté v linii MCF7 po 24h, 48h nebo 72h inkubaci byla prokázána u koncentrací v řádu stovek  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v práci Maruška *et al.* (2017). Ve studii Vitalone *et al.* (2003) je porovnáván cytotoxický účinek extraktů tří druhů vrbky ve čtyřech buněčných kulturách, z čehož pouze dvě jsou nádorové a hodnoty  $\text{IC}_{50}$  extraktů se pohybují v nádorových i nenádorových liniích v řadech desítek až stovek  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Studie naznačuje souvislost cytotoxicity s obsahem makrocyclického ellagotaniinu oenothenu B se zdokumentovanou cytotoxicitou z předchozích prací (Miyamoto *et al.*, 1993; Sakagami *et al.*, 2000).

Další studie prokazují cytotoxické působení extraktů vrbky úzkolisté i v nádorových liniích neuroblastomu SK-N-SK a adenokarcinomu prostaty LNCaP a PC-3 nebo hepatocelulárního karcinomu HepG2 (Stolarczyk *et al.*, 2013; Kiss *et al.*, 2006; Ostrovska

*et al.*, 2017). Současný výzkum se stále zaměřuje na využití vrbky úzkolisté v léčbě benigní hyperplazie prostaty (Deng *et al.*, 2019; Piwowarski *et al.*, 2017), jak plyne z využití vrbky v lidovém léčitelství (Granica *et al.*, 2014).

V této bakalářské práci je dokumentována ve všech pěti použitých buněčných kulturách vůbec poprvé cytotoxicita extraktu vrbky úzkolisté. Dále také literatura uvádí cytotoxické působení i v jiných buněčných typech, jak bylo popsáno výše. Tato fakta mohou být podnětem pro další zaměření výzkumu nejen specificky na oblast nádorů prostaty a benigní hyperplasii prostaty, ale také na obecné mechanismy cytotoxického působení extraktů vrbky úzkolisté s cílem nalézt obsahové látky odpovědné za tento účinek. Zajímavé by bylo porovnat výsledky se studiemi s prostatickými buňkami, zda je hlavní účinnou složkou také oenothin B, či jiná obsahová látka.

#### 4.4 Cytotoxická aktivita ouabainu

V rámci bakalářské práce byla v testech cytotoxického účinku v adherentních a suspenzních buněčných liniích stanovena střední účinná koncentrace ( $EC_{50}$ ) ouabainu jako modelové látky, známého inhibitoru NKA (viz Tab. 6). Ouabain je léčivo schválené v několika zemích pro léčbu srdečního selhání a arytmie. Je studováno jeho cytotoxické působení v mnoha buněčných modelech (Johansson *et al.*, 2001; Bielawski *et al.*, 2006; Hallböök *et al.*, 2011; Alonso *et al.*, 2013; Trenti *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2016).

Ouabain byl testován v sérii trojnásobného ředění o šesti koncentracích s nejvyšší dosaženou koncentrací  $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $250 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  nebo  $125 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Inkubace ouabainu v buněčných kulturách byla 24 h, 48 h nebo 72 h. Použité buněčné kultury byly odvozeny od lidských kožních fibroblastů (BJ), chronické myelogenní leukemie (K562), akutní lymfoblastické leukemie (CCRF-CEM), cervikálního adenokarcinomu (HeLa) a prsního adenokarcinomu (MCF7).

Tab. 6 Střední účinná koncentrace ( $EC_{50}$ ) ouabainu v testech cytotoxického účinku po 24h, 48h nebo 72h inkubaci v buněčných kulturách lidských kožních fibroblastů (BJ), chronické myelogenní leukemie (K562), akutní lymfoblastické leukemie (CCRF-CEM), cervikálního adenokarcinomu (HeLa) a prsního adenokarcinomu (MCF7). BJ konflu. – buňky BJ v konfluentním stavu; BJ subkonflu. – buňky BJ v subkonfluentním stavu. (průměr  $\pm$  SD;  $n = 2$ ; biologický replikát).

Inkubační doba	buněčná kultura a $EC_{50}$ [ $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]					
	BJ konflu.	BJ subkonflu.	K562	CCRF-CEM	HeLa	MCF7
24 h	>500	>500	>500	$97 \pm 10$	$117 \pm 4$	$93 \pm 4$
48 h	>500	$57 \pm 35$	$78 \pm 2$	$45 \pm 3$	$40 \pm 0,8$	$50 \pm 0,3$
72 h	>500	$37 \pm 0,8$	$60 \pm 2$	$45 \pm 4$	$62 \pm 3$	$40 \pm 2$

Po 24h inkubaci za daných podmínek nebyla  $EC_{50}$  měřitelná v buněčných kulturách BJ a K562, zatímco linie CCRF-CEM, HeLa a MCF7 reagovaly na ošetření ouabainem citlivěji a hodnota  $EC_{50}$  se pohybovala okolo  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Největší rozdíl v  $EC_{50}$  byl zaznamenán po 48h inkubaci, následně se po 72h inkubaci hodnota  $EC_{50}$  snížila již s menším rozdílem oproti 48h  $EC_{50}$ , což značí nástup cytotoxického účinku zejména do časového intervalu 48 h.

V případě konfluentních buněk BJ nebylo hodnoty  $EC_{50}$  dosaženo, což značí jejich rezistenci vůči ouabainu oproti subkonfluentním buňkám BJ. Konfluentní buňky BJ se nacházejí v  $G_0$  fázi buněčného cyklu navozené kontaktní inhibicí a o buňkách v této fázi je obecně známa jejich vyšší rezistence k toxinům, což je problém zejména v případě nádorových kmenových buněk (Grant a Cook, 2017). Konfluentní fibroblasty také v menší míře syntetizují DNA, RNA a proteiny, mění se také mechanismy intracelulární degradace proteinů, z čehož přirozeně plyne odlišná reaktivita konfluentních a subkonfluentních fibroblastů na vnější podněty, jako je například působení toxinu (Levine *et al.*, 1965; Zhang *et al.*, 2017).

V práci Mankovitz *et al.* (1974) je v kožních fibroblastech dosažena po čtyřech dech  $EC_{50}$  ouabainu  $18\text{--}50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V této bakalářské práci byla změřena v subkonfluentních fibroblastech hodnota  $EC_{50}$  ouabainu po 72h inkubaci  $37 \pm 0,8 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V jiné studii prováděné ve fibroblastech bylo potvrzeno antiapoptotické působení nízké koncentrace ouabainu ( $30 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a proapoptotické působení vysokých koncentrací ouabainu (nad  $300 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Jako mechanismus buněčné smrti je identifikována apoptosa a dále je detekována zvýšená intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a aktivace kaspasy 3 (Winnicka *et al.*, 2010).

V linii K562 bylo v této bakalářské práci dosaženo hodnoty  $EC_{50}$  až po 48h, resp. 72h inkubaci s ouabainem, a to  $78 \pm 2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , resp.  $60 \pm 2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ve studii Feng *et al.* (2016) je uváděna v linii K562 hodnota  $IC_{50}$  ouabainu  $127 \pm 31 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 24h inkubaci a  $63 \pm 15 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 48h inkubaci, dále je popsána indukce apoptosy ouabainem a po 24h působení  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ouabainu není detekován fragment štěpené kaspasy 3 ani 8, avšak je zaznamenáno štěpení poly(ADP-ribosa)polymerasy (PARP). Hodnota cytotoxicity ouabainu po 48 h uvedená v této studii je podobná hodnotě zjištěné v bakalářské práci. Naopak ve studii Umebayashi *et al.* (2003) není dosaženo 50% snížení počtu buněk linie K562 ani po 72h inkubaci se  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ouabainem, zato je detekován signifikantní nárůst počtu buněk se sníženou ploidií.

V bakalářské práci byla naměřena v linii CCRF-CEM hodnota 72h EC<sub>50</sub> ouabainu  $0,045 \pm 0,005 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , což je hodnota blízká výsledkům publikovaným ve studiích Hallböök *et al.* (2011) nebo Johansson *et al.* (2001), kde je uváděna 72h IC<sub>50</sub>  $0,04 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , resp.  $0,057 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

V linii HeLa byl v literatuře popsán proproliferální účinek nízkých koncentrací ouabainu (do  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  při 48h inkubaci), naopak při 72h inkubaci s koncentrací ouabainu nad  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  jsou detekovány morfologické změny buněk spojené s apoptosou a je prokázána indukce apoptosy mitochondriální cestou skrze uvolnění cytochromu *c* do cytoplasmy a dochází ke štěpení kaspasy 3 a 9, IC<sub>50</sub> ouabainu je  $18 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 96h inkubaci (Ramirez-Ortega *et al.*, 2006). Tento výsledek není přímo porovnatelný s hodnotami EC<sub>50</sub> uváděnými v bakalářské práci, protože testy probíhaly pouze s maximální inkubací 72 h. V bakalářské práci bylo zjištěno zvýšení hodnoty 72h EC<sub>50</sub> oproti 48h EC<sub>50</sub>, to lze považovat nejspíš za projev rezistence, nebo pouze artefakt, což by bylo nutné podrobit ověření v další sadě testů.

V další studii je při koncentraci ouabainu  $300 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 24 h detekováno  $51,7 \pm 6,7 \%$  apoptotických HeLa buněk, a to je blízké hodnotě EC<sub>50</sub> (Alonso *et al.*, 2013). V bakalářské práci byla změřena hodnota EC<sub>50</sub> po 24h inkubaci HeLa buněk s ouabainem  $117 \pm 4 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V citované studii Alonso *et al.* (2013) se dále jako mechanismus cytotoxického účinku ouabainu v HeLa buňkách prokázala apoptosa spojená s uvolněním cytochromu *c* a aktivací kaspas 3, 7 a 9 v souladu s předchozí studií Ramirez-Ortega *et al.* (2006). V práci je dále nastíněna možnost přímé interakce ouabainu s mitochondriemi, což je podpořeno pozorovanou remodelací mitochondriální sítě a fluorescenční kolokalizací ouabainu a mitochondrií.

Ve studii Bielawski *et al.* (2006) je v linii MCF7 uváděna hodnota 24h IC<sub>50</sub> ouabainu  $130 \pm 2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , zatímco v bakalářské práci byla zjištěna hodnota  $93 \pm 4 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V práci Clifford a Kaplan (2013) je uvedeno, že proliferace buněk MCF7 po 24 h nebyla ovlivněna ouabainem do koncentrace  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , což je v rozporu s prvně citovanou prací Bielawski *et al.* (2006) a také s hodnotou získanou v rámci bakalářské práce, kde je již za koncentrace ouabainu  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  změřeno přibližně poloviční množství buněk oproti kontrole. V této bakalářské práci je změřená 48h EC<sub>50</sub> ouabainu  $50 \pm 0,3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  blízká hodnotě uvedené v práci Calderón-Montaño *et al.* (2014), a to  $39,3 \pm 1,0 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  – jedná se tedy také o další práci potvrzující cytotoxický účinek ouabainu v linii MCF7.

#### 4.5 Vliv ouabainu na hladinu vybraných proteinů zapojených do apoptosy nebo regulace buněčného cyklu v linii K562

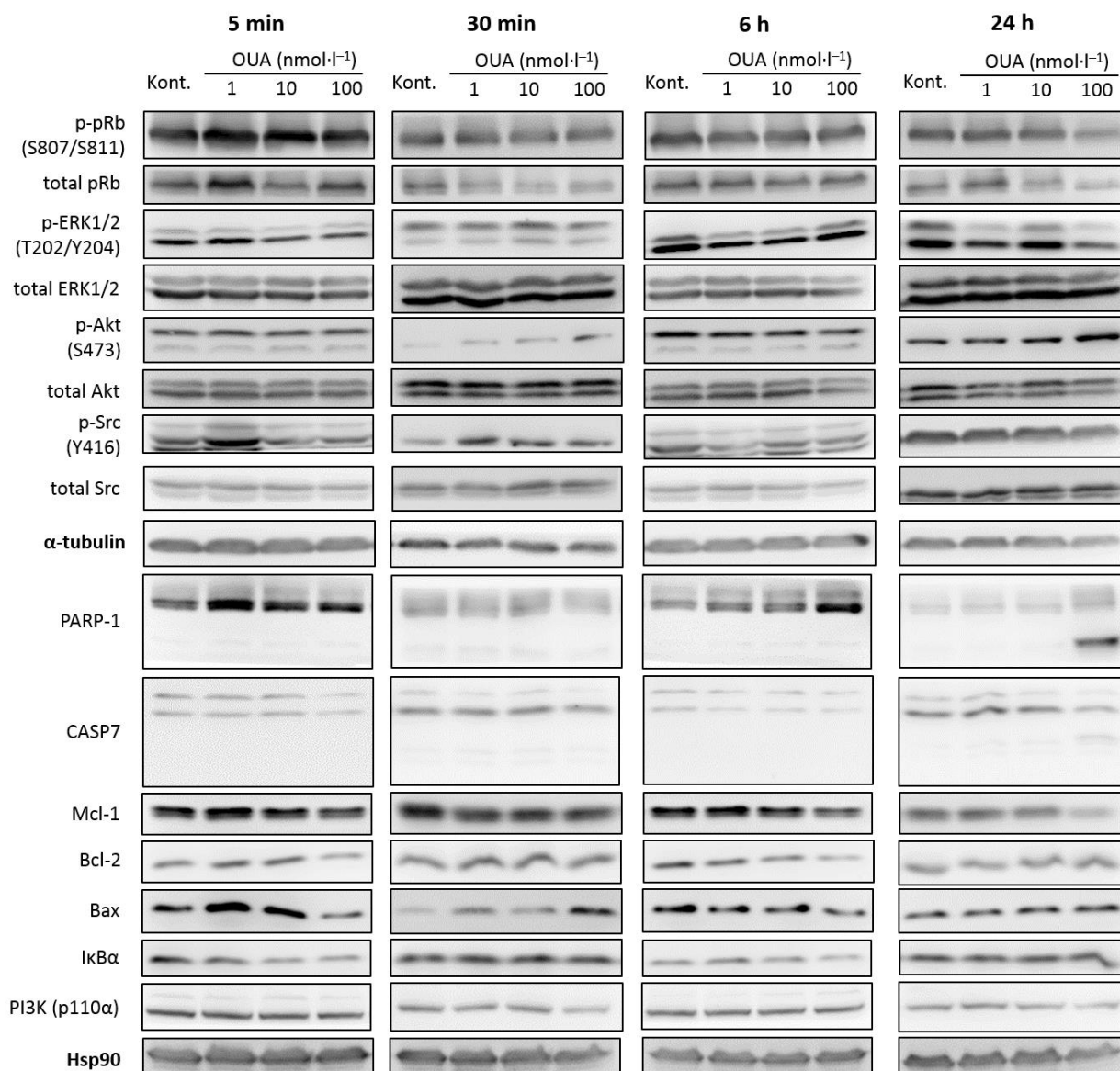
Jako modelová látka, známý inhibitor NKA, byl v experimentech v suspenzní buněčné linii K562 odvozené od chronické myelogenní leukemie zkoumán ouabain. Bylo sledováno působení různých koncentrací ouabainu ( $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v buněčné linii K562 při krátké inkubaci (5 min a 30 min) a při dlouhé inkubaci (6 h a 24 h). Cílem bylo vytvořit model, na kterém by bylo možné v navazujícím výzkumu testovat, zda aktivní frakce rostlinných extraktů nebo jejich obsahové látky vyvolávají podobnou buněčnou odezvu na úrovni proteinů jako již známý inhibitor NKA, ouabain. Dalším cílem bylo najít proteiny významně ovlivňované působením ouabainu, na které by bylo možné se zaměřit v navazujících experimentech s dalšími buněčnými liniemi. Výsledky experimentů v buněčné linii K562 shrnuje Obr. 13.

Nejvyšší testovaná koncentrace ouabainu,  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , nepřesahovala hodnotu  $\text{EC}_{50}$  cytotoxického účinku ouabainu, takže nedocházelo k nepříznivým vlivům v důsledku velké míry cytotoxicity, což například umožní sledovat počátky apoptosy na úrovni iniciace signálních drah (viz kapitola 4.4 –  $\text{EC}_{50}$  ouabainu v linii K562 přesahuje hodnotu nejvyšší testované koncentrace  $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Imunodetekce byla zaměřena na některé proteiny ovlivňované působením ouabainu, jak je diskutováno v teoretické části práce (viz kapitola 2.2.2).

Nejvýraznější známky apoptosy jsou detekovány při působení koncentrace ouabainu  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po čas 24 h. Dochází ke snížení fosforylace retinoblastomového proteinu (pRb). V případě, že je pRb hyperfosforylován, je umožněn přechod buněk z fáze buněčného cyklu  $G_1$  do fáze S, a tím je podpořena buněčná proliferace (Hossain *et al.*, 2018). Snížení fosforylace pRb lze tedy vnímat za antiproliferační mechanismus působení ouabainu. Je snížena také fosforylace extracelulárním signálem regulované kinasy 1 a 2 (ERK1/2), která opět ve fosforylované formě působí proproliferálně (Roskoski, 2019). Detekován je kaspasový fragment kaspasy 7 (CASP7) svědčící o proteolytické aktivaci prokaspasy 7. Aktivovaná CASP7 štěpením svých mnoha různorodých substrátů (proteiny regulující apoptosu, cytoskelet, buněčný cyklus atd.) navozuje programovanou buněčnou smrt (Timmer a Salvesen, 2007). Jedním ze substrátů CASP7 je i poly(ADP-ribose)polymerasa-1 (PARP-1), jejíž štěpení je v souladu s pozorovanou aktivací CASP7 detekováno (Boucher *et al.*, 2012). Proteolytická deaktivace PARP-1 umožňuje úpravou energetických poměrů v buňce směřovat procesy buněčné smrti k apoptose místo potenciální nekrózy (Nguewa *et al.*, 2003). Jako poslední ovlivněný

protein za těchto podmínek je detekován antiapoptotický člen rodiny Bcl-2 proteinů – myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), který je také substrátem kaspas a jehož hladina je snížena (Herrant *et al.*, 2004). Celkově tedy analýza proteinů po 24h působení ouabainu v koncentraci  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  prokazuje jeho proapoptotický účinek.

Významné snížení hladiny Mcl-1 v buňkách plicního karcinomu dokáže navozovat ouabain již v koncentraci  $0,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Chanvorachote a Pongrakhananon, 2013) a ke stejnému dramatickému snížení došlo i v buňkách HL60 při ovlivnění ouabainem již v nejnižší testované koncentraci  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 4h inkubaci (Tailleur *et al.*, 2012). Linie HL60 je odvozena od akutní formy myelogenní leukemie, zatímco v bakalářské práci použitá linie K562 je odvozena od chronické formy tohoto nádoru (viz také diskuse



Obr. 13 Záznam imunodetekce proteinů v buněčné linii K562 ovlivněné ouabainem v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po dobu 5 min, 30 min, 6 h a 24 h.

v kapitole 4.4). Jak po 6h, tak i po 24h ovlivnění buněk K562 ouabainem v koncentraci  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  je patrný pokles hladiny Mcl-1, jak ukazují výsledky bakalářské práce. To může naznačovat stejný mechanismus regulace Mcl-1 v obou liniích. V rámci navazující práce by bylo vhodné se zaměřit také na regulaci Mcl-1 v adherentních, případně dalších suspenzních liniích ovlivněných ouabainem, aby mohla být porovnána senzitivita různých buněčných typů na působení ouabainu, která by se mohla značně lišit, jak je vidět při porovnání vlastních výsledků s prací Chanvorachote a Pongrakhananon (2013).

Ve výše již citované práci Tailler *et al.* (2012) je při časovém experimentu prokázáno štěpení PARP-1 v buňkách HL60 ovlivněných ouabainem v koncentraci  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  až po 9h inkubaci a dřívějším měřením po 4 h není štěpení prokázáno. V porovnání s tím v experimentech v bakalářské práci dochází ke štěpení PARP-1 až při nejdelším čase inkubace, 24 h, zatímco po 6 h není štěpení detekováno. V práci Tailler *et al.* (2012) degradace PARP-1 koreluje se štěpením prokaspasy 3 a zde měření podobně prokazuje aktivaci CASP7, přičemž PARP-1 je substrátem jak CASP3, tak i CASP7 (Boucher *et al.*, 2012). Taktéž v buněčné linii K562 po 24h inkubaci s ouabainem v koncentraci  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  je detekováno štěpení PARP ve studii Feng *et al.* (2016), ve které se však současně neprokázala proteolytická aktivace CASP3 a CASP8.

U antiapoptického proteinu Bcl-2 a proapoptického proteinu Bax není možné vyvodit jednoznačný závěr, jakým způsobem jsou tyto proteiny ovlivňovány. Zatímco při 5min inkubaci buněk s ouabainem se jeví, že hladina obou proteinů ve skupině s koncentrací ouabainu  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  mírně klesá, tak po 30min inkubaci zase vzrůstá hladina Bax v ovlivněných skupinách, zejména ve skupině s ouabainem v koncentraci  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Po 6h inkubaci zase v závislosti na koncentraci ouabainu klesá hladina Bcl-2 i Bax a po 24 h nejsou oba proteiny ovlivněny. Dalšími experimenty by bylo nutné tyto trendy potvrdit, nebo vyvrátit, případně provést analýzu dalších proteinů, které by regulaci Bax a Bcl-2 vysvětlily. Vzhledem k nejednoznačnosti výsledků získaných v bakalářské práci a k rozdílným podmínkám publikovaných experimentů (viz literární rešerše v kapitole 2.2.2) není možné provést porovnání výsledků s literaturou uvádějící v různých buněčných modelech vliv jak antiapoptický (Golden a Martin, 2006; Sibarov *et al.*, 2012; Kinoshita *et al.*, 2014), tak i proapoptický (Meng *et al.*, 2016; Venugopal a Blanco, 2016; Luo *et al.*, 2018).

Jednoznačný trend nebylo možné vysledovat ani v případě fosforylace ERK1/2, zato v případě dalších proteinkinů Src a Akt byla pozorována zvyšující se míra fosforylace oproti kontrole ve ouabainem ovlivněných skupinách po 30min inkubaci.



ERK-dependentní aktivace Akt byla po 15min inkubaci s ouabainem o koncentraci  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  prokázána například v práci Khundmiri *et al.* (2007) v buňkách proximálních tubulů. Ve této studii byla detekována za stejných podmínek i zvýšená fosforylace ERK1/2, ve výsledcích bakalářské práce však tento efekt není po 5min ani po 30min ovlivnění buněk K562 pozorován. Opět v buňkách proximálních tubulů byla zjišťována také časová závislost aktivace Akt ouabainem o koncentraci  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a bylo zjištěno, že k aktivaci dochází v největší míře právě po 15min stimulaci, avšak signifikantní míra aktivace byla zaznamenána i po 5 min nebo 30 min (Khundmiri *et al.*, 2006). Ve výsledcích bakalářské práce lze vidět z 5min a z 30min inkubace aktivaci Akt fosforylací pouze v případě 30min inkubace.

Celková hladina katalytické podjednotky  $\alpha$  fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K p110 $\alpha$ ) nebyla ouabainem významně ovlivněna a v případě inhibitoru  $\alpha$  jaderného faktoru kappa B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) došlo k mírnému poklesu jeho hladiny v ošetřených skupinách pouze po 5min ovlivnění buněk. Většina publikovaných výzkumů se zaměřuje na regulaci I $\kappa$ B v řádu hodin a je zaznamenáván pokles hladiny inhibitoru (Li *et al.*, 2006; Kawamoto *et al.*, 2012; Tailler *et al.*, 2012), přičemž v těchto časech z výsledků bakalářské práce nebyly změny v hladině I $\kappa$ B $\alpha$  v linii K562 pozorovány a podobný výzkum studující vliv ouabainu na hladinu I $\kappa$ B $\alpha$  v minutových intervalech se nepodařilo při literární rešerši dohledat.

Jako nejvíce účinná z hlediska proapoptického vlivu se tedy jeví koncentrace ouabainu  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  při 24h ovlivnění buněk. Proapoptický vliv ouabainu je možné za těchto podmínek sledovat v aktivaci CASP7, štěpení PARP-1, snížení hladiny p-pRb a Mcl-1. Nejvyšší vliv na často studované proteinkinasy Src a Akt ve smyslu zvýšení jejich fosforylace je možné pozorovat po 30min inkubaci s ouabainem a regulace kinasy ERK1/2 je nejednoznačná. Vliv ouabainu na proteiny Bax a Bcl-2 se liší v závislosti na koncentraci ouabainu i čase – pro podrobnější osvětlení regulace těchto proteinů ouabainem by bylo třeba udělat rozsáhlejší experimenty. Ke snížení hladiny I $\kappa$ B $\alpha$  dochází pouze po 5min inkubaci buněk s ouabainem.

## 5 ZÁVĚR

V bakalářské práci je rozebrán význam sodno-draselné ATPasy (NKA) z hlediska její transportní funkce důležité pro fyziologii a signalizační funkce s potenciálem farmakologického cílení pomocí inhibitorů NKA, o kterých je také podrobněji pojednáváno. V teoretické části práce je předložen fytochemický rozbor rostlinných druhů violka vonná (*Viola odorata* L.), udatna lesní (*Aruncus vulgaris* Rafin) a vrbka úzkolistá (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub). Z provedené literární rešerše vyplývá, že doposud nebyla popsána inhibiční aktivita v NKA u extraktů těchto rostlin, pouze v případě vrbky byla v listech objevena kyselina ursolová a oleanová s mírným inhibičním účinkem v NKA.

V praktické části byla úspěšně provedena izolace NKA z prasečích ledvin a byla připravena knihovna rostlinných extraktů, ze kterých byly vybrány extrakty výše zmíněných rostlin inhibující ATPasovou aktivitu NKA. Tyto extrakty byly poté frakcionovány extrakcí na pevnou fázi s následnou elucí jednotlivých frakcí, případně byla provedena frakcionace pomocí ultrafiltrů. Úspěšně byl získán profil inhibiční aktivity ve frakcích extraktů, což je základ pro korelačně metabolickou analýzu, která bude předmětem navazující práce a umožní identifikaci potenciálních kandidátních molekul nesoucích inhibiční aktivitu.

Dále byl popsán cytotoxický účinek celkových extraktů zmíněných rostlin (testováno do  $500 \mu\text{g DW}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a známého inhibitoru NKA ouabainu (testováno do  $500 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v buněčných kulturách odvozených od lidských kožních fibroblastů (BJ), chronické myelogenní leukemie (K562), akutní lymfoblastické leukemie (CCRF-CEM), cervikálního adenokarcinomu (HeLa) a prsního adenokarcinomu (MCF7). V případě extraktu z listů vrbky byla prokázána cytotoxicita ve všech buněčných kulturách, u extraktu z květů udatny pouze v linii CCRF-CEM a extrakt z kořene violky nebyl cytotoxický. Cytotoxicita ouabainu byla po 24h inkubaci prokázána v buněčných liniích CCRF-CEM, HeLa a MCF7, zatímco po 48h a 72h inkubaci byl ouabain cytotoxický ve všech buněčných kulturách. Pouze konfluentní buňky BJ byly odolné proti cytotoxickému účinku ouabainu v případě všech tří inkubací. Nakonec byl také studován v závislosti na čase a koncentraci vliv ouabainu na hladinu vybraných signálních a apoptotických proteinů v buněčné linii K562. Proteinové markery probíhající apoptosu byly detekovány po 24h inkubaci buněk s ouabainem v koncentraci  $100 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , k ovlivnění proteinů p-Akt, p-Src, I $\kappa$ B $\alpha$ , Bax, Bcl-2 došlo v kratších inkubačních časech.

## 6 LITERATURA

- Ahn H., Kim J., Kim J., Auh J., Choe E. (2014): In vitro  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activities and antioxidants of Samnamul (*Aruncus dioicus*) during rehydration and cooking. *Food Science and Biotechnology* **23**, 1287–1293.
- Aizman O., Uhlen P., Lal M., Brismar H., Aperia A. (2001): Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 13420–13424.
- Akhbari M., Batooli H., Kashi F.J. (2012): Composition of essential oil and biological activity of extracts of *Viola odorata* L. from central Iran. *Natural Product Research* **26**, 802–809.
- Al-Snafi A.E. (2015): THERAPEUTIC PROPERTIES OF MEDICINAL PLANTS: A REVIEW OF PLANTS WITH CARDIOVASCULAR EFFECTS (PART 1). *International Journal of Pharmacology & Toxicology* **5**, 163–176.
- Albers R.W. (1967): Biochemical Aspects of Active Transport. *Annual Review of Biochemistry* **36**, 727–756.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M. Roberts K., Walter P. (2014a): Chapter 11 Membrane Transport of Small Molecules and the Electrical Properties of Membranes. In: *Molecular biology of the cell*. 6th ed., (Lewis S.G., Zayatz E., eds), Garland Science, Taylor & Francis Group, Abingdon, UK, 615–617
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M. Roberts K., Walter P. (2014b): Chapter 11 Membrane Transport of Small Molecules and the Electrical Properties of Membranes. In: *Molecular biology of the cell*. 6th ed., (Lewis S.G., Zayatz E., eds), Garland Science, Taylor & Francis Group, Abingdon, UK, 598–600
- Alevizopoulos K., Calogeropoulou T., Lang F., Stourmaras C. (2014):  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase inhibitors in cancer. *Current drug targets* **15**, 988–1000.
- Alonso E., Cano-Abad M.F., Moreno-Ortega A.J., Novalbos J., Milla J., García A.G., Ruiz-Nuño A. (2013): Nanomolar ouabain elicits apoptosis through a direct action on HeLa cell mitochondria. *Steroids* **78**, 1110–1118.
- Amaral M.M., Girard M.C., Álvarez R.S., Paton A.W., Paton J.C., Repetto H.A., Sacerdoti F., Ibarra C.A. (2017): Ouabain Protects Human Renal Cells against the Cytotoxic Effects of Shiga Toxin Type 2 and Subtilase Cytotoxin. *Toxins* **9**, 226.
- Aperia A., Akkuratov E.E., Fontana J.M., Brismar H. (2016):  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **310**, C491–C495.
- Artigas P., Gadsby D.C. (2003):  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 501–505.
- Aydemir-Koksoy A., Abramowitz J., Allen J.C. (2001): Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 46605–46611.
- Baecher S., Kroiss M., Fassnacht M., Vogeser M. (2014): No endogenous ouabain is detectable in human plasma by ultra-sensitive UPLC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta* **431**, 87–92.
- Baert N., Karonen M., Salminen J.-P. (2015): Isolation, characterisation and quantification of the main oligomeric macrocyclic ellagitannins in *Epilobium angustifolium* by ultra-high performance chromatography with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1419**, 26–36.
- Baginski E.S., Foà P.P., Zak B. (1967): Microdetermination of Inorganic Phosphate, Phospholipids, and Total Phosphate in Biologic Materials. *Clinical Chemistry* **13**, 326–332.
- Bielawski K., Winnicka K., Bielawska A. (2006): Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. *Biological & pharmaceutical bulletin* **29**, 1493–1497.
- Blanco G. (2005):  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase Subunit Heterogeneity as a Mechanism for Tissue-Specific Ion Regulation. *Seminars in Nephrology* **25**, 292–303.
- Boucher D., Blais V., Denault J.-B. (2012): Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* **109**, 5669–5674.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
- Bramer C., Dobler S., Deckert J., Stemmer M., Petschenka G. (2015): Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase resistance and cardenolide sequestration: basal adaptations to host plant toxins in the milkweed bugs (*Hemiptera: Lygaeidae: Lygaeinae*). *Proceedings. Biological sciences* **282**, 20142346.
- Bublitz M., Kjellerup L., Cohrt K.O., Gordon S., Mortensen A.L., Clausen J.D., Pallin T.D., Hansen J.B., Fuglsang A.T., Dalby-Brown W., Winther A.-M.L. (2018): Tetrahydrocarbazoles are a novel class of potent P-type ATPase inhibitors with antifungal activity. *PLoS One* **13**, e0188620.
- Burlaka I., Liu X.L., Rebetz J., Arvidsson I., Yang L., Brismar H., Karpman D., Aperia A. (2013): Ouabain protects against Shiga toxin-triggered apoptosis by reversing the imbalance between Bax and Bcl-xL. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* **24**, 1413–1423.
- Calderón-Montaña J.M., Burgos-Morón E., López-Lázaro M. (2014): The in vivo antitumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact. *Oncogene* **33**, 2947–2948.
- Cariani L., Thomas L., Brito J., del Castillo J.R. (2004): Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. *Analytical biochemistry* **324**, 79–83.
- Chai J.H., Zhang Y., Tan W.H., Chng W.J., Li B., Wang X. (2011): Regulation of hTERT by BCR-ABL at multiple levels in K562 cells. *BMC Cancer* **11**, 512.
- Chan H., Babayan V., Blyumin E., Gandhi C., Hak K., Harake D., Kumar K., Lee P., Li T.T., Liu H.Y., Lo T.C.T., Meyer C.J., Stanford S., Zamora K.S., Saier Jr. M.H. (2010): The P-Type ATPase Superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **19**, 5–104.
- Chanvorachote P., Pongrakhananon V. (2013): Ouabain downregulates Mcl-1 and sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **304**, C263–C272.
- Chen Q.-B., Aisa H.A. (2017): Alkaloid constituents from *Viola tianschanica*. *Phytochemistry* **144**, 233–242.
- Chen R.J.Y., Chung T., Li F., Yang W., Jinn T., Tzen J.T.C. (2010): Steroid-like compounds in Chinese medicines promote blood circulation via inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Acta pharmacologica Sinica* **31**, 696–702.
- Chen Y., Cai T., Yang C., Turner D.A., Giovannucci D.R., Xie Z. (2008): Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-mediated Calcium Release by the Na/K-ATPase in Cultured Renal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1128–1136.
- Clarke R.J., Catauro M., Rasmussen H.H., Apell H.-J. (2013): Quantitative calculation of the role of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in thermogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1827**, 1205–1212.
- Clausen M. V., Hilbers F., Poulsen H. (2017): The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Frontiers in physiology* **8**, 371.
- Clifford R.J., Kaplan J.H. (2013): Human Breast Tumor Cells Are More Resistant to Cardiac Glycoside Toxicity Than Non-Tumorigenic Breast Cells A. Ahmad, ed. *PLoS ONE* **8**, e84306.
- Cornelius F., Kanai R., Toyoshima C. (2013): A structural view on the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na,K-ATPase. *The Journal of biological chemistry* **288**, 6602–6616.
- Craik D.J., Daly N.L., Bond T., Waine C. (1999): Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *Journal of Molecular Biology* **294**, 1327–1336.
- Crambert G., Hasler U., Beggah A.T., Yu C., Modyanov N.N., Horisberger J.D., Lelièvre L., Geering K. (2000): Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1976–1986.
- Dempski R.E., Friedrich T., Bamberg E. (2005): The  $\beta$  Subunit of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Follows the Conformational State of the Holoenzyme. *The Journal of General Physiology* **125**, 505–520.
- Dempski R.E., Friedrich T., Bamberg E. (2009): Voltage clamp fluorometry: Combining

- fluorescence and electrophysiological methods to examine the structure–function of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**, 714–720.
- Deng L., Zong W., Tao X., Liu S., Feng Z., Lin Y., Liao Z., Chen M. (2019): Evaluation of the therapeutic effect against benign prostatic hyperplasia and the active constituents from *Epilobium angustifolium* L. *Journal of Ethnopharmacology* **232**, 1–10.
- Drummond C.A., Fan X., Haller S.T., Kennedy D.J., Liu J., Tian J. (2018): Na/K-ATPase signaling mediates miR-29b-3p regulation and cardiac fibrosis formation in mice with chronic kidney disease. *PloS one* **13**, e0197688.
- Ducrey B., Marston A., Göhring S., Hartmann R., Hostettmann K. (1997): Inhibition of 5 $\alpha$ -Reductase and Aromatase by the Ellagitannins Oenothin A and Oenothin B from *Epilobium* Species. *Planta Medica* **63**, 111–114.
- El-Seedi H.R., Khalifa S.A.M., Taher E.A., Farag M.A., Saeed A., Gamal M., Hegazy M.-E.F., Youssef D., Musharraf S.G., Alajlani M.M., Xiao J., Efferth T. (2019): Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility. *Pharmacological Research* **141**, 123–175.
- Fedosova N.U. (2016): Purification of Na,K-ATPase from Pig Kidney. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1377**, 5–10.
- Feng Q., Leong W.S., Liu L., Chan W.-I. (2016): Peruvoside, a Cardiac Glycoside, Induces Primitive Myeloid Leukemia Cell Death. *Molecules (Basel, Switzerland)* **21**, 534.
- Ferrandi M., Molinari I., Barassi P., Minotti E., Bianchi G., Ferrari P. (2004): Organ hypertrophic signaling within caveolae membrane subdomains triggered by ouabain and antagonized by PST 2238. *The Journal of biological chemistry* **279**, 33306–33314.
- Franz M.H., Birzoi R., Maftai C.-V., Maftai E., Kelter G., Fiebig H.-H., Neda I. (2018): Studies on the constituents of *Helleborus purpurascens*: analysis and biological activity of the aqueous and organic extracts. *Amino Acids* **50**, 163–188.
- Fusani P., Piwowarski J.P., Zidorn C., Kiss A.K., Scartezzini F., Granica S. (2016): Seasonal variation in secondary metabolites of edible shoots of Buck's beard [*Aruncus dioicus* (Walter) Fernald (*Rosaceae*)]. *Food Chemistry* **202**, 23–30.
- Glen A.T., Lawrie W., McLean J., Younes M.E.-G. (1967): Triterpenoid constituents of rose-bay willow-herb. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **0**, 510–515.
- Golden W.C., Martin L.J. (2006): Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 in vivo. *Neuroscience* **137**, 133–144.
- Granica S., Bazylo A., Kiss A.K. (2012): Determination of Macrocyclic Ellagitannin Oenothin B in Plant Materials by HPLC-DAD-MS: Method Development and Validation. *Phytochemical Analysis* **23**, 582–587.
- Granica S., Fusani P., Stanisławska I., Piwowarski J.P., Melck D., Motta A., Zidorn C. (2017): Monoterpenoids from the traditional North Italian vegetable *Aruncus dioicus* (Walter) Fernald var. *vulgaris* (Maxim.) H.Hara (*Rosaceae*). *Food Chemistry* **221**, 1851–1859.
- Granica S., Piwowarski J.P., Czerwińska M.E., Kiss A.K. (2014): Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (*Onagraceae*): A review. *Journal of Ethnopharmacology* **156**, 316–346.
- Grant G.D., Cook J.G. (2017): The Temporal Regulation of S Phase Proteins During G<sub>1</sub>. *Advances in experimental medicine and biology* **1042**, 335–369.
- Gronquist M., Meinwald J., Eisner T., Schroeder F.C. (2005): Exploring Uncharted Terrain in Nature's Structure Space Using Capillary NMR Spectroscopy: 13 Steroids from 50 Fireflies.
- Groves M.J., Bisset N.G. (1991): A note on the use of topical *Digitalis* prior to William Withering. *Journal of Ethnopharmacology* **35**, 99–103.
- Grycova L., Sklenovsky P., Lansky Z., Janovska M., Otyepka M., Amler E., Teisinger J., Kubala M. (2009): ATP and magnesium drive conformational changes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase cytoplasmic headpiece. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 1081–1091.
- Gryszczyńska A., Dreger M., Piasecka A., Kachlicki P., Witaszak N., Sawikowska A., Ożarowski M., Opala B., Łowicki Z., Pietrowiak A., Miklaś M., Mikołajczak Przemysław Ł., Wielgus K. (2018): Qualitative and quantitative analyses of bioactive compounds from ex vitro *Chamaenerion angustifolium* (L.) (*Epilobium angustifolium*) herb in different harvest times.

- Industrial Crops and Products* **123**, 208–220.
- Haas M., Wang H., Tian J., Xie Z. (2002): Src-mediated Inter-receptor Cross-talk between the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and the Epidermal Growth Factor Receptor Relays the Signal from Ouabain to Mitogen-activated Protein Kinases. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 18694–18702.
- Habeck M., Tokhtaeva E., Nadav Y., Ben Zeev E., Ferris S.P., Kaufman R.J., Bab-Dinitz E., Kaplan J.H., Dada L.A., Farfel Z., Tal D.M., Katz A., Sachs G., Vagin O., Karlisch S.J.D. (2016): Selective Assembly of Na,K-ATPase  $\alpha\beta 2$  Heterodimers in the Heart. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 23159–23174.
- Hallböök H., Felth J., Eriksson A., Fryknäs M., Bohlin L., Larsson R., Gullbo J. (2011): Ex Vivo Activity of Cardiac Glycosides in Acute Leukaemia. *PLoS ONE* **6**, e15718.
- Hamlyn J.M., Blaustein M.P., Bova S., DuCharme D.W., Harris D.W., Mandel F., Mathews W.R., Ludens J.H. (1991): Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 6259–6263.
- Hamlyn J.M., Linde C.I., Gao J., Huang B.S., Golovina V.A., Blaustein M.P., Leenen F.H.H. (2014): Neuroendocrine Humoral and Vascular Components in the Pressor Pathway for Brain Angiotensin II: A New Axis in Long Term Blood Pressure Control. *PLoS ONE* **9**, e108916.
- Han C.R., Jun D.Y., Woo H.J., Jeong S.-Y., Woo M.-H., Kim Y.H. (2012): Induction of microtubule-damage, mitotic arrest, Bcl-2 phosphorylation, Bak activation, and mitochondria-dependent caspase cascade is involved in human Jurkat T-cell apoptosis by aruncin B from *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**, 945–953.
- Herrant M., Jacquél A., Marchetti S., Belhacène N., Colosetti P., Luciano F., Auberger P. (2004): Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* **23**, 7863–7873.
- Hoesel B., Schmid J.A. (2013): The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* **12**, 86.
- Horvat A., Momić T., Petrović S., Nikezić G., Demajo M. (2006): Selective inhibition of brain Na,K-ATPase by drugs. *Physiological research* **55**, 325–338.
- Hossain S., Iwasa H., Sarkar A., Maruyama J., Arimoto-Matsuzaki K., Hata Y. (2018): The RASSF6 Tumor Suppressor Protein Regulates Apoptosis and Cell Cycle Progression via Retinoblastoma Protein. *Molecular and cellular biology* **38**, e00046-18.
- Hundal H.S., Marette A., Ramlal T., Liu Z., Klip A. (1993): Expression of beta subunit isoforms of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is muscle type-specific. *FEBS letters* **328**, 253–258.
- Ivanov A. V., Gable M.E., Askari A. (2004): Interaction of SDS with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: SDS-solubilized enzyme retains partial structure and function. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 29832–29840.
- Iwamoto T., Kita S., Zhang J., Blaustein M.P., Arai Y., Yoshida S., Wakimoto K., Komuro I., Katsuragi T. (2004): Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca<sup>2+</sup> entry via Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nature Medicine* **10**, 1193–1199.
- Jacobs B.E., Liu Y., Pulina M. V., Golovina V.A., Hamlyn J.M. (2012): Normal pregnancy: mechanisms underlying the paradox of a ouabain-resistant state with elevated endogenous ouabain, suppressed arterial sodium calcium exchange, and low blood pressure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **302**, H1317–H1329.
- Jeong S.Y., Jun D.Y., Kim Y.H., Min B.-S., Min B.K., Woo M.H. (2011): Monoterpenoids from the aerial parts of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* and their antioxidant and cytotoxic activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 3252–3256.
- Johansson S., Lindholm P., Gullbo J., Larsson R., Bohlin L., Claesson P. (2001): Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. *Anti-cancer drugs* **12**, 475–83.
- Jones P.L., Petschenka G., Flacht L., Agrawal A.A. (2019): Cardenolide Intake, Sequestration, and Excretion by the Monarch Butterfly along Gradients of Plant Toxicity and Larval Ontogeny. *Journal of Chemical Ecology* **45**, 264–277.
- Kanai R., Ogawa H., Vilsen B., Cornelius F., Toyoshima C. (2013): Crystal structure of a Na<sup>+</sup>-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase preceding the E1P state. *Nature* **502**, 201–206.
- Kaplan J.H. (2002): Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 511–535.
- Karim N., Khan I., Abdelhalim A., Khan A., Halim S.A. (2018): Antidepressant potential of novel

- flavonoids derivatives from sweet violet (*Viola odorata* L): Pharmacological, biochemical and computational evidences for possible involvement of serotonergic mechanism. *Fitoterapia* **128**, 148–161.
- Karioti A., Furlan C., Vincieri F.F., Bilia A.R. (2011): Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**, 1715–1723.
- Katz A., Lifshitz Y., Bab-Dinitz E., Kapri-Pardes E., Goldshleger R., Tal D.M., Karlisch S.J.D. (2010): Selectivity of Digitalis Glycosides for Isoforms of Human Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 19582–19592.
- Kawamoto E.M., Lima L.S., Munhoz C.D., Yshii L.M., Kinoshita P.F., Amara F.G., Pestana R.R.F., Orellana A.M.M., Cipolla-Neto J., Britto L.R.G., Avellar M.C.W., Rossoni L.V., Scavone C. (2012): Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor- $\kappa$ B in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* **90**, 213–228.
- Kawamura A., Guo J., Itagaki Y., Bell C., Wang Y., Hauptert G.T., Magil S., Gallagher R.T., Berova N., Nakanishi K., Nakanishi Koji (1999): On the structure of endogenous ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6654–6659.
- Khalid M., Cornelius F., Clarke R.J. (2010): Dual mechanisms of allosteric acceleration of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by ATP. *Biophysical journal* **98**, 2290–2298.
- Khundmiri S.J., Amin V., Henson J., Lewis J., Ameen M., Rane M.J., Delamere N.A. (2007): Ouabain stimulates protein kinase B (Akt) phosphorylation in opossum kidney proximal tubule cells through an ERK-dependent pathway. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **293**, C1171–C1180.
- Khundmiri S.J., Metzler M.A., Ameen M., Amin V., Rane M.J., Delamere N.A. (2006): Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **291**, C1247–C1257.
- Kim D.-H., Moon Y.-S., An B.-J., Son J.-H. (2012): Potent anti-aging activity of *Aruncus dioicus*, a native plant of Ulleung-do, South Korea, in CCD-986sk fibroblasts via suppression of matrix metalloproteinases. *Journal of Natural Medicines* **66**, 631–636.
- Kinoshita P.F., Yshii L.M., Vasconcelos A.R., Orellana A.M.M., Lima L. de S., Davel A.P.C., Rossoni L.V., Kawamoto E.M., Scavone C. (2014): Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. *Journal of Neuroinflammation* **11**, 218.
- Kiss A., Kowalski J., Melzig M.F. (2006): Effect of *Epilobium angustifolium* L. extracts and polyphenols on cell proliferation and neutral endopeptidase activity in selected cell lines. *Die Pharmazie* **61**, 66–69.
- Kliková K., Štefániková A., Pilchová I., Hatok J., Chudý P., Chudej J., Dobrota D., Račay P. (2015): Differential impact of bortezomib on HL-60 and K562 cells. *General physiology and biophysics* **34**, 33–42.
- Klodos I., Esmann M., Post R.L. (2002): Large-scale preparation of sodium-potassium ATPase from kidney outer medulla. *Kidney International* **62**, 2097–2100.
- Knittel D.N., Lorenz P., Huber U., Stintzing F.C., Kammerer D.R. (2016): Characterization of the cardiac glycoside and lipid profiles of *Strophanthus kombé* Oliv. seeds. *Zeitschrift für Naturforschung C* **71**, 55–64.
- Koch E., Malek F. (2011): Standardized Extracts from Hawthorn Leaves and Flowers in the Treatment of Cardiovascular Disorders – Preclinical and Clinical Studies. *Planta Medica* **77**, 1123–1128.
- Kolodziejczyk-Czepas J., Stochmal A. (2017): Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. *Phytochemistry Reviews* **16**, 1155–1171.
- Komiyama Y., Nishimura N., Dong X.H., Hirose S., Kosaka C., Masaki H., Masuda M., Takahashi H. (2000): Liquid chromatography mass spectrometric analysis of ouabainlike factor in biological fluid. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **23 Suppl**, S21-S27.

- Kopp B., Krenn L., Kubelka E., Kubelka W. (1992): Cardenolides from *Adonis aestivalis*. *Phytochemistry* **31**, 3195–3198.
- Kubala M., Čechová P., Geletičová J., Biler M., Štenclová T., Trouillas P., Biedermann D. (2016): Flavonolignans As a Novel Class of Sodium Pump Inhibitors. *Frontiers in physiology* **7**, 115.
- Kubo S., Kuroda M., Matsuo Y., Masatani D., Sakagami H., Mimaki Y. (2012): New cardenolides from the seeds of *Adonis aestivalis*. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **60**, 1275–1282.
- Laursen M., Gregersen J.L., Yatime L., Nissen P., Fedosova N.U. (2015): Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 1755–1760.
- Laursen M., Yatime L., Nissen P., Fedosova N.U. (2013): Crystal structure of the high-affinity Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase-ouabain complex with Mg<sup>2+</sup> bound in the cation binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 10958–10963.
- Levine E.M., Becker Y., Boone C.W., Eagle H. (1965): CONTACT INHIBITION, MACROMOLECULAR SYNTHESIS, AND POLYRIBOSOMES IN CULTURED HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **53**, 350–356.
- Lewis L.K., Yandle T.G., Lewis J.G., Richards A.M., Pidgeon G.B., Kaaja R.J., Nicholls M.G. (1994): Ouabain is not detectable in human plasma. *Hypertension* **24**, 549–555.
- Li H., Yin A., Cheng Z., Feng M., Zhang H., Xu J., Wang F., Qian L. (2018): Attenuation of Na/K-ATPase/Src/ROS amplification signal pathway with pNaktide ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury. *International Journal of Biological Macromolecules* **118**, 1142–1148.
- Li J., Khodus G.R., Kruusmägi M., Kamali-Zare P., Liu X.-L., Eklöf A.-C., Zelenin S., Brismar H., Aperia A. (2010): Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney. *Nature Communications* **1**, 1–7.
- Li J., Zelenin S., Aperia A., Aizman O. (2006): Low Doses of Ouabain Protect from Serum Deprivation–Triggered Apoptosis and Stimulate Kidney Cell Proliferation via Activation of NF-κB. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 1848–1857.
- Li Z., Cai T., Tian J., Xie J.X., Zhao X., Liu L., Shapiro J.I., Xie Z. (2009): NaKtide, a Na/K-ATPase-derived peptide Src inhibitor, antagonizes ouabain-activated signal transduction in cultured cells. *The Journal of biological chemistry* **284**, 21066–21076.
- Lin N.-H., Chung T.-Y., Li F.-Y., Chen H.-A., Tzen J.T.C. (2013): Enhancing the potency of lithospermate B for inhibiting Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by forming transition metal ion complexes. *Acta pharmacologica Sinica* **34**, 893–900.
- Lingrel J.B., Kuntzweiler T. (1994): Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of biological chemistry* **269**, 19659–19662.
- Liu J., Tian J., Haas M., Shapiro J.I., Askari A., Xie Z. (2000): Ouabain interaction with cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations. *The Journal of biological chemistry* **275**, 27838–27844.
- Liu L., Ivanov A. V., Gable M.E., Jolivel F., Morrill G.A., Askari A. (2011): Comparative properties of caveolar and noncaveolar preparations of kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochemistry* **50**, 8664–8673.
- Liu L., Zhao X., Pierre S. V., Askari A. (2007): Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **293**, C1489–C1497.
- Liu X., Špicarová Z., Rydholm S., Li J., Brismar H., Aperia A. (2008): Ankyrin B Modulates the Function of Na,K-ATPase/Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Signaling Microdomain. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 11461–11468.
- Liu X., Xu Y., Zhou Q., Chen M., Zhang Y., Liang H., Zhao J., Zhong W., Wang M. (2018): PI3K in cancer: its structure, activation modes and role in shaping tumor microenvironment. *Future Oncology* **14**, 665–674.
- Luo Y., Qin H., Zhao L., Jin L., Jiang A., Li X., Li M., Wang X. (2018): Ouabain inhibits RAW264.7 cells proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and bax expression. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* **31**, 1997–2003.



- Ma X., Su Y., Li Z., Que M., Li L. (2018): A New Monoterpene Glucoside from the Roots of *Aruncus sylvestris*. *Chemistry of Natural Compounds* **54**, 1085–1087.
- Mahboubi M., Taghizadeh Kashani L.M. (2018): A Narrative study about the role of *Viola odorata* as traditional medicinal plant in management of respiratory problems. *Advances in Integrative Medicine* **5**, 112–118.
- Mankovitz R., Buchwald M., Baker R.M. (1974): Isolation of ouabain-resistant human diploid fibroblasts. *Cell* **3**, 221–226.
- Maruška A., Ugenskienė R., Raulinaitytė D., Juozaitytė E., Kaškonienė V., Drevinskas T., Stelmakienė A., Akuneca I., Makaravičius T., Tiso N., Bartkuvienė V., Kornysšova O., Ragažinskienė O., Ramanauskienė K., Briedis V. (2017): Analysis of antiproliferative effect of *Chamerion angustifolium* water extract and its fractions on several breast cancer cell lines. *Advances in Medical Sciences* **62**, 158–164.
- Melero C., Medarde M., San Feliciano A. (2000): A Short Review on Cardiotonic Steroids and Their Aminoguanidine Analogues. *Molecules* **5**, 51–81.
- Meng L., Wen Y., Zhou M., Li J., Wang T., Xu P., Ouyang J. (2016): Ouabain induces apoptosis and autophagy in Burkitt's lymphoma Raji cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **84**, 1841–1848.
- Miyakawa-Naito A., Uhlén P., Lal M., Aizman O., Mikoshiba K., Brismar H., Zelenin S., Aperia A. (2003): Cell Signaling Microdomain with Na,K-ATPase and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Generates Calcium Oscillations. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 50355–50361.
- Miyamoto K., Nomura M., Sasakura M., Matsui E., Koshiura R., Murayama T., Furukawa T., Hatano T., Yoshida T., Okuda T. (1993): Antitumor activity of oenonein B, a unique macrocyclic ellagitannin. *Japanese journal of cancer research : Gann* **84**, 99–103.
- Mohammadi K., Kometiani P., Xie Z., Askari A. (2001): Role of Protein Kinase C in the Signal Pathways That Link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to ERK1/2. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 42050–42056.
- Nguewa P.A., Fuertes M.A., Alonso C., Perez J.M. (2003): Pharmacological Modulation of Poly(ADP-ribose) Polymerase-Mediated Cell Death: Exploitation in Cancer Chemotherapy. *Molecular Pharmacology* **64**, 1007–1014.
- Nyblom M., Poulsen H., Gourdon P., Reinhard L., Andersson M., Lindahl E., Fedosova N., Nissen P. (2013): Crystal Structure of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the Na<sup>+</sup>-Bound State. *Science* **342**, 123–127.
- Opitz S.E.W., Müller C. (2009): Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* **19**, 117–154.
- Ostrowska H., Oleshchuk O., Vannini S., Cataldi S., Albi E., Codini M., Moulas A., Marchyshyn S., Beccari T., Ceccarini M.R. (2017): *Epilobium angustifolium* L.: A medicinal plant with therapeutic properties. *The EuroBiotech Journal* **1**, 126–131.
- Padilla-Benavides T., Roldán M.L., Larre I., Flores-Benitez D., Villegas-Sepúlveda N., Contreras R.G., Cerejido M., Shoshani L. (2010): The polarized distribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: role of the interaction between beta subunits. *Molecular biology of the cell* **21**, 2217–25.
- Parsley N.C., Kirkpatrick C.L., Crittenden C.M., Rad J.G., Hoskin D.W., Brodbelt J.S., Hicks L.M. (2018): PepSAVI-MS reveals anticancer and antifungal cycloviolacins in *Viola odorata*. *Phytochemistry* **152**, 61–70.
- Patel S. (2016): Plant-derived cardiac glycosides: Role in heart ailments and cancer management. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **84**, 1036–1041.
- Piwowski J., Bobrowska-Korczak B., Stanisławska I., Bielecki W., Wrzesien R., Granica S., Krupa K., Kiss A. (2017): Evaluation of the Effect of *Epilobium angustifolium* Aqueous Extract on LNCaP Cell Proliferation in *In Vitro* and *In Vivo* Models. *Planta Medica* **83**, 1159–1168.
- Post R.L., Jolly P.C. (1957): The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **25**, 118–128.
- Post R.L., Kume S., Tobin T., Orcutt B., Sen A.K. (1969): Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *The Journal of general physiology* **54**, 306–326.

- Prassas I., Diamandis E.P. (2008): Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 926–935.
- Que M., Su Y.-F., Yan S.-L., Zhou Y.-H., Gao X.-M. (2014): Two new phenylpropanoid glycosides from the roots of *Aruncus sylvestris*. *Journal of Asian Natural Products Research* **16**, 158–162.
- Ramirez-Ortega M., Maldonado-Lagunas V., Melendez-Zajgla J., Carrillo-Hernandez J.F., Pastelín-Hernandez G., Picazo-Picazo O., Ceballos-Reyes G. (2006): Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis. *European Journal of Pharmacology* **534**, 71–76.
- Raynal N.J.-M., Da Costa E.M., Lee J.T., Gharibyan V., Ahmed S., Zhang H., Sato T., Malouf G.G., Issa J.-P.J. (2017): Repositioning FDA-Approved Drugs in Combination with Epigenetic Drugs to Reprogram Colon Cancer Epigenome. *Molecular Cancer Therapeutics* **16**, 397–407.
- Ribaucourt A., Hodgson D.M. (2016): Total Synthesis and Structural Revision of the Cytotoxin Aruncin B. *Organic Letters* **18**, 4364–4367.
- Roskoski R. (2019): Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacological Research* **142**, 151–168.
- Rui H., Artigas P., Roux B. (2016): The selectivity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump is controlled by binding site protonation and self-correcting occlusion. *eLife* **5**, e16616.
- Sak K., Everaus H. (2017): Established Human Cell Lines as Models to Study Anti-leukemic Effects of Flavonoids. *Current genomics* **18**, 3–26.
- Sakagami H., Jiang Y., Kusama K., Atsumi T., Ueha T., Toguchi M., Iwakura I., Satoh K., Ito H., Hatano T., Yoshida T. (2000): Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines – A possible mechanism. *Phytomedicine* **7**, 39–47.
- Schepetkin I.A., Ramstead A.G., Kirpotina L.N., Voyich J.M., Jutila M.A., Quinn M.T. (2016): Therapeutic Potential of Polyphenols from *Epilobium Angustifolium* (Fireweed). *Phytotherapy research : PTR* **30**, 1287–1297.
- Schneider R., Wray V., Nimtz M., Lehmann W.D., Kirch U., Antolovic R., Schoner W. (1998): Bovine Adrenals Contain, in Addition to Ouabain, a Second Inhibitor of the Sodium Pump. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 784–792.
- Schwaiger S., Zeilner M., Ellmerer E., Antal D., Rollinger J., Stuppner H. (2009): Bioactivity-guided isolation of acetylcholinesterase inhibiting constituents of the flowers of Bride's Feathers (*Aruncus dioicus*). *Planta Medica* **75**, PA18.
- Šeflová J., Čechová P., Biler M., Hradil P., Kubala M. (2017): Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by 5,6,7,8-tetrafluoro-3-hydroxy-2-phenylquinolin-4(1H)-one. *Biochimie* **138**, 56–61.
- Sibarov D.A., Bolshakov A.E., Abushik P.A., Krivoi I.I., Antonov S.M. (2012): Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Functionally Interacts with the Plasma Membrane Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> Exchanger to Prevent Ca<sup>2+</sup> Overload and Neuronal Apoptosis in Excitotoxic Stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **343**, 596–607.
- Siddiqi H.S., Mehmood M.H., Rehman N.U., Gilani A.H. (2012): Studies on the antihypertensive and antidyslipidemic activities of *Viola odorata* leaves extract. *Lipids in health and disease* **11**, 6.
- Siddiqui B.S., Khatoon N., Begum S., Farooq A.D., Qamar K., Bhatti H.A., Ali S.K. (2012): Flavonoid and cardenolide glycosides and a pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* and evaluation of cytotoxicity. *Phytochemistry* **77**, 238–244.
- Skou J.C. (1998): The Identification of the Sodium-Potassium Pump (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **37**, 2320–2328.
- Skou J.C. (1957): The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta* **23**, 394–401.
- Slazak B., Kapusta M., Strömstedt A.A., Słomka A., Krychowiak M., Shariatgorji M., Andrén P.E., Bohdanowicz J., Kuta E., Göransson U. (2018): How Does the Sweet Violet (*Viola odorata* L.) Fight Pathogens and Pests – Cyclotides as a Comprehensive Plant Host Defense System. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1296.
- Sousa L.Q. de, Machado K. da C., Oliveira S.F. de C., Araújo L. da S., Monção-Filho E. dos S., Melo-Cavalcante A.A. de C., Vieira-Júnior G.M., Ferreira P.M.P. (2017): Bufadienolides

- from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition. *Toxicol* **127**, 63–76.
- Stolarczyk M., Naruszewicz M., Kiss A.K. (2013): Extracts from *Epilobium* sp. herbs induce apoptosis in human hormone-dependent prostate cancer cells by activating the mitochondrial pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **65**, 1044–1054.
- Tailler M., Senovilla L., Lainey E., Thépot S., Métivier D., Sébert M., Baud V., Billot K., Fenaux P., Galluzzi L., Boehrer S., Kroemer G., Kepp O. (2012): Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia. *Oncogene* **31**, 3536–3546.
- Takeuchi H., Savitzky A.H., Ding L., de Silva A., Das I., Nguyen T.T., Tsai T.-S., Jono T., Zhu G.-X., Mahaulpatha D., Tang Y., Mori A. (2018): Evolution of nuchal glands, unusual defensive organs of Asian natricine snakes (*Serpentes: Colubridae*), inferred from a molecular phylogeny. *Ecology and Evolution* **8**, 10219–10232.
- Tian J., Cai T., Yuan Z., Wang H., Liu L., Haas M., Maksimova E., Huang X.-Y., Xie Z.-J. (2006): Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Forms a Functional Signaling Complex. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 317–326.
- Timmer J.C., Salvesen G.S. (2007): Caspase substrates. *Cell Death & Differentiation* **14**, 66–72.
- Tiwari K.N., Khare N.K., Khare A., Khare M.P. (1984): Structure of digoxose. *Carbohydrate Research* **129**, 179–187.
- Trabi M., Craik D.J. (2004): Tissue-specific expression of head-to-tail cyclized miniproteins in *Violaceae* and structure determination of the root cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide1. *The Plant cell* **16**, 2204–2216.
- Trabi M., Svängård E., Herrmann A., Göransson U., Claeson P., Craik D.J., Bohlin L. (2004): Variations in Cyclotide Expression in *Viola* Species. *Journal of Natural Products* **67**, 806–810.
- Trenti A., Grumati P., Cusinato F., Orso G., Bonaldo P., Trevisi L. (2014): Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2. *Biochemical Pharmacology* **89**, 197–209.
- Umebayashi C., Yamamoto N., Nakao H., Toi Y., Chikahisa-Muramatsu L., Kanemaru K., Masuda T., Oyama Y. (2003): Flow cytometric estimation of cytotoxic activity of rhodexin A isolated from *Rhodea japonica* in human leukemia K562 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* **26**, 627–630.
- Venugopal J., Blanco G. (2016): Ouabain Enhances ADPKD Cell Apoptosis via the Intrinsic Pathway. *Frontiers in Physiology* **7**, 107.
- Vitalone A., McColl J., Thome D., Costa L.G., Tita B. (2003): Characterization of the Effect of *Epilobium* Extracts on Human Cell Proliferation. *Pharmacology* **69**, 79–87.
- Vo Q.H., Hung Nguyen P., Bingtian Z., Nguyen Y., Hung Nguyen D., Il Kim W., Seo M., Sun Min B., Hee Woo M. (2014): Bioactive Constituents from the n-Butanolic Fraction of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus*. *Natural Product Sciences* **20**, 274–280.
- Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z. (2004): Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 17250–17259.
- Winnicka K., Bielawski K., Bielawska A., Milyk W. (2010): Dual effects of ouabain, digoxin and proscillaridin A on the regulation of apoptosis in human fibroblasts. *Natural Product Research* **24**, 274–285.
- Wu J., Akkuratov E.E., Bai Y., Gaskill C.M., Askari A., Liu L. (2013): Cell Signaling Associated with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: Activation of Phosphatidylinositide 3-Kinase IA/Akt by Ouabain Is Independent of Src. *Biochemistry* **52**, 9059–9067.
- Xie Z., Kometiani P., Liu J., Li J., Shapiro J.I., Askari A. (1999): Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **274**, 19323–19328.
- Yan Y., Shapiro A.P., Haller S., Katragadda V., Liu L., Tian J., Basrur V., Malhotra D., Xie Z., Abraham N.G., Shapiro J.I., Liu J. (2013): Involvement of Reactive Oxygen Species in a Feed-forward Mechanism of Na/K-ATPase-mediated Signaling Transduction. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 34249–34258.
- Yatime L., Laursen M., Morth J.P., Esmann M., Nissen P., Fedosova N.U. (2011): Structural

- insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Structural Biology* **174**, 296–306.
- Yosef E., Katz A., Peleg Y., Mehlman T., Karlish S.J.D. (2016): Do Src Kinase and Caveolin Interact Directly with Na,K-ATPase? *The Journal of biological chemistry* **291**, 11736–11750.
- Yudowski G.A., Efendiev R., Pedemonte C.H., Katz A.I., Berggren P.O., Bertorello A.M. (2000): Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6556–6561.
- Zeino M., Brenk R., Gruber L., Zehl M., Urban E., Kopp B., Efferth T. (2015): Cytotoxicity of cardiotonic steroids in sensitive and multidrug-resistant leukemia cells and the link with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **150**, 97–111.
- Zhang S., Fritz N., Ibarra C., Uhlén P. (2011): Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subtype-Specific Regulation of Calcium Oscillations. *Neurochemical Research* **36**, 1175–1185.
- Zhang S., Malmersjö S., Li J., Ando H., Aizman O., Uhlén P., Mikoshiba K., Aperia A. (2006): Distinct Role of the N-terminal Tail of the Na,K-ATPase Catalytic Subunit as a Signal Transducer. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 21954–21962.
- Zhang T., Wolfe C., Pierle A., Welle K.A., Hryhorenko J.R., Ghaemmaghami S. (2017): Proteome-wide modulation of degradation dynamics in response to growth arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E10329–E10338.
- Zhang Z., Li Zhichuan, Tian J., Jiang W., Wang Y., Zhang X., Li Zhuorong, You Q., Shapiro J.I., Si S., Xie Z. (2010): Identification of Hydroxyxanthenes as Na/K-ATPase Ligands. *Molecular Pharmacology* **77**, 961–967.
- Zheng J., Koh X., Hua F., Li G., Larrick J.W., Bian J.-S. (2011): Cardioprotection induced by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cardiovascular Research* **89**, 51–59.
- Zhou X., Jiang G., Zhao A., Bondeva T., Hirszel P., Balla T. (2001): Inhibition of Na,K-ATPase Activates PI3 Kinase and Inhibits Apoptosis in LLC-PK1 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **285**, 46–51.
- Züst T., Petschenka G., Hastings A.P., Agrawal A.A. (2019): Toxicity of Milkweed Leaves and Latex: Chromatographic Quantification Versus Biological Activity of Cardenolides in 16 *Asclepias* Species. *Journal of Chemical Ecology* **45**, 50–60.

## Webové zdroje

- AdisInsight: Comparison of Efficacy and Safety of Icaritin Versus Cinobufotalin in First-line Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma Subjects: a Multicenter, Randomized, Double-blind, Double-dummy Phase III Clinical Trial. Dostupné z: [adisinsight.springer.com/trials/700287519](https://adisinsight.springer.com/trials/700287519) (6. 5. 2019).
- AdisInsight: PBI 05204 - Phoenix Biotechnology. Dostupné z: [adisinsight.springer.com/drugs/800029125](https://adisinsight.springer.com/drugs/800029125) (6. 5. 2019).
- AdisInsight: RX 108. Dostupné z: [adisinsight.springer.com/drugs/800042632](https://adisinsight.springer.com/drugs/800042632) (30. 12. 2018).
- Státní ústav pro kontrolu léčiv: Databáze léků, ATC skupina C01AA05. Dostupné z: [www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[atc\\_group\]=C01AA05&data\[with\\_adv\]=0](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[atc_group]=C01AA05&data[with_adv]=0) (6. 5. 2019).
- The Nobel Prize: The Nobel Prize in Chemistry 1997. Dostupné z: [www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1997/summary/](http://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1997/summary/) (6. 5. 2019)
- Assay Guidance Manual: Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L. (2004): Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. Dostupné z: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/) (6. 5. 2019)

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	akrylamid
AP-1	aktivátorový protein 1
APS	ammonium persulfate – peroxodisíran amonný
Bax	protein X asociovaný s Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bis	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
CASP7	kaspasa 7
CTS	cardiotonic steroids – kardiotonické steroidy
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
DTT	dithiothreitol
DW	dry weight – suchá hmota
EC <sub>50</sub>	střední účinná koncentrace
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ERK1/2	extracelulárním signálem regulovaná kinasa 1 a 2
FRET	fluorescence resonance energy transfer – fluorescenční rezonanční přenos energie
FS	fetální bovinní sérum
HPR	horseradish peroxidase – křenová peroxidasa
Hsp90	protein teplotního šoku 90
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace
IκBα	inhibitor α jaderného faktoru kappa B
IP3R	receptor pro inositol-1,4,5-tris(fosfát)
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kinasa
Mcl-1	myeloid cell leukemia-1
2-ME	2-merkptoethanol
NF-κB	jaderný faktor kappa B
NKA	sodno-draselná ATPasa
PARP-1	poly(ADP-ribose)polymerasa-1
PBS	phosphate buffered saline – fyziologický roztok pufrovaný fosfáty
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
pRb	retinoblastomový protein
RAM	rabbit anti-mouse immunoglobulin
RPMI 1640	médium Roswell Park Memorial Institute 1640
SPE	solid phase extraction – extrakce na pevnou fázi
SWAR	swine anti-rabbit immunoglobulin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan