UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie

Zdeněk DOSTÁL

Diplomová práce

Studijní obor: Bioorganická chemie N1407

Vedoucí práce: doc. Mgr. Martin Modrianský Ph.D.

Olomouc 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně a čerpal jen z pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 30. 4. 2013 ….....

Zdeněk Dostál

Upřímné poděkování patří všem pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci za vytvoření velmi vhodného a příjemného pracovního prostředí a pomoc, především Doc. Mgr. Martinu Modrianskému, PhD. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, vzácný čas, důkladné přečtení práce a připomínky, které mi během plnění zadané práce poskytl.
Ing. Evě Gabrielove PhD. za odborné vedení a Evě Lepařove za pomoc při práci v laboratoři.
MUDr. Josefu Srovnalovi Ph.D. a Bc. Michaele Sedláčkové za pomoc při zpracování miRNA čipů. Mgr. Lence Radové Ph.D. za převedení dat z formátu cel. do tabulkového editoru.
A také poděkování za financování této práce internímu grantu LF-2012_010.
Tato práce by nevznikla bez podpory mé rodiny, které patři také mé poděkování.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora	Zdeněk Dostál
Název práce	Vliv přírodních látek na expresi mikroRNA v buněčné linii HepG2
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce	Doc. Mgr. Martin Modrianský, PhD.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	MikroRNA jsou krátké nekódující molekuly RNA se schopností regulace exprese proteinů na posttranskripční úrovni. V současnosti je na mikroRNA z pohledu karcinogeneze nahlíženo jako na onkogeny nebo naopak jako nádorové supresory s ochrannou funkcí proti maligním onemocněním. Cílem diplomové práce bylo zhodnotit, zda vybrané přírodní látky vykazují globální účinek na expresi mikroRNA v lidské hepatocelulární linii HepG2. Dosažené výsledky ukazují, že tyto látky ovlivňují expresi některých mikroRNA.

Klíčová slova	mikroRNA, polyfenony, all-trans-retinová kyselina,
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Autor's first name and surname	Zdeněk Dostál
Title	Influence of natural substances on microRNA expression in HepG2 cells
Type of thesis	Master
Department	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký university, Olomouc
Supervisor	Doc. Mgr. Martin Modrianský, PhD.
The year of presentation	2013
Abstract	MikroRNAs are short non-coding RNA molecules that regulace protein expression on post-transcriptional level. The current view of microRNA role in carcinogenesis is dual: microRNAs may be both oncogenes as well as tumor suppressors with cytoprotective aktivity against malign diseases. Aim of the diploma thesis was to evaluate whether selected natural substance display global influence on microRNA expression in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Results show that the tested substance indeed affect the expression of several microRNAs.
Keywords	microRNA, polyphenols, all-trans-retinoic acid,
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

1. **Úvod** **8**

2. **Teoretická část** **9**

2.1. **Přírodní látky s možností ovlivnění exprese mikroRNA** **9**

2.1.1. **Polyfenoly** **9**

2.1.1.1. Fenolické kyseliny **9**

Kyselina kávová **9**

Kyselina gallová **12**

Kyselina vanillová **14**

2.1.1.2. Flavonoidy **15**

Kvercetin **15**

Taxifolin **18**

2.1.1.3. Stilbeny **20**

Resveratrol **20**

2.1.1.4. Lignany **23**

Silybin **23**

Dehydrosilybin **25**

2.2. **Kyselina retinová (derivát vitamínu A)** **27**

2.3. **MikroRNA** **29**

2.3.1. První objev **30**

2.3.2. Biogeneze mikroRNA **30**

2.3.3. Mechanismus účinku mikroRNA **31**

3. **Cíl práce** **33**

4. **Experimentální část** **33**

4.1. Chemikálie **33**

4.2. Biologický materiál **33**

4.3. Roztoky **34**

4.4. Kultivační médium **35**

4.5. Přístroje **35**

4.6. Použité metody **36**

5. **Výsledky** **45**

6. **Diskuse a závěr** **62**

7. **Seznam použitých zkratek** **64**

8. **Literatura** **65**

1. Úvod

MikroRNA jsou malé regulační molekuly RNA o velikosti 18 až 22 nukleotidů. Hrají důležitou roli v regulaci transkripce a zasahují tak do genové exprese mnoha proteinů. Nezřídka se výraznější změny mikroRNA projevují u různých chorob, obzvláště u nádorových onemocnění byly zaznamenány markantní rozdíly v expresi mikroRNA. Takové molekuly pak mohou vystupovat jako onkogeny, což je charakterizováno zvýšením exprese, nebo naopak nádorové supresory, což je charakterizováno snížením exprese. Pokud se prokáže souvislost dané změny specificky s určitou chorobou, vede tento objev k navržení dané molekuly jako diagnostického markeru pro diagnostické účely s možností sledování úspěšnosti léčby. Velkou výhodou je zapojení mikroRNA již v počátcích choroby, což znamená detekci v časných fázích nemoci a lepší prognózu pro pacienta. Pokud se při dalším výzkumu ukáže její zapojení do regulace důležitého proteinu pro danou chorobu, může být testována jako možný terapeutický cíl nebo označena jako vhodný cíl pro prevenci.

Cílem naší práce bylo zjistit, zda vybrané přírodní látky, které jsou známy svými cytoprotektivními účinky pleiotropního charakteru, ovlivňují expresi mikroRNA. Pokud by některá z látek vykazovala schopnost modulovat expresi některých mikroRNA se známými cílovými geny, pak může mít daná látka výhodné, např. tumor supresivní, vlastnosti pro organizmus. Pro naše testování jsme vybrali zástupce z přírodních látek, jmenovitě fenolické kyseliny (kyselina gallová, kávová a vanillová), flavonoidy (silybin, dehydrosilybin, kvercetin a taxifolin) a metabolit vitaminu A, (kyselinu all trans retinovou). Většina látek je velmi bohatě zastoupena v jídelníčku populace. Tyto látky jsou velice dobře známé pro své antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální a protinádorové vlastnosti. Otázkou je, zda k těmto vlastnostem nepřispívá i modulace exprese mikroRNA a následná regulace transkripce klíčových proteinů. Kromě vlastní experimentální práce bylo cílem vytvořit rešerši o testovaných zástupcích a dalších přírodních látkách ovlivňujících mikroRNA

2. Teoretická část

2.1. Přírodní látky s možností ovlivnění exprese miRNA

Po objevu miRNA vyvstalo mnoho zajímavých otázek, mimo jiné možnosti modulace exprese mikroRNA xenobiotiky a eubiotiky. Kromě různých léčiv a syntetických látek[1] byly mnohdy zkoumány i vlivy přírodních látek, které do organizmu přijímáme v nemalém množství v dietě a mohou se podílet na modulaci exprese miRNA a následně upravovat genovou expresi různých významných či méně významných proteinů. Jednou ze skupin bohatě zastoupených ve stravě jsou polyfenoly[2]. Kromě této skupiny sloučenin byla pozorována změna v expresi i u některých vitaminů a jejich derivátů, kurkuminu, saponinů, antrachinonů, také u polynenasycených mastných kyselin[1] a mnoha dalších látek.

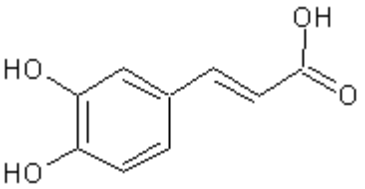
2.1.1. Polyfenoly

Jedná se o rozšířenou skupinu látek (několik set sloučenin) obsaženou hojně v ovoci, zelenině, celozrnném pečivu a nápojích jako jsou čaj, káva nebo víno. Skupina polyfenolů se dále dělí podle chemické struktury na fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany[3]. Obecně jde o látky s antioxidační aktivitou, nicméně se ukazuje, že mnohé z nich ovlivňují buněčné signální kaskády, které regulují transkripční faktory a tím i genovou expresi. Což vede k úvahám, za jaké procento účinku jsou odpovědné antioxidační vlastnosti a ovlivnění signálních drah. Někteří autoři navrhují ovlivnění signálních drah jako významnější příspěvek[2]. V rostlinách jsou tyto látky produkovány jako sekundární metabolity s ochrannou funkcí proti UV záření a jsou zapojeny do procesu výroby energie[4].

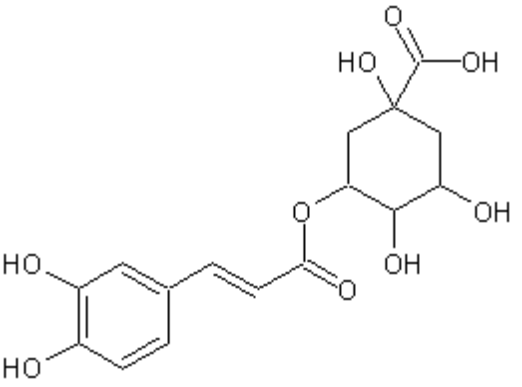
2.1.1.1 Fenolické kyseliny

Kyselina kávová

Kyselina kávová se nejčastěji získává z rostlinných materiálů: jablka, hrušky, jahody, artyčoky, káva a lilek[5, 6], kde se často vyskytuje v konjugované formě jako chlorogenová kyselina, což je ester kyseliny kávové s kyselinou chinovou[6, 7]. K izolaci se používají rostlinné zdroje, jako jsou nepražená nebo pražená káva a můžeme ji nalézt i v arganovém oleji a Perile křovité[8]. Studium kyseliny kávové a chlorogenové je zajímavé nejenom díky jejich užitečným vlastnostem pro organizmus, ale i požitou denní dávkou, která u lidí popíjejících kávu může dosáhnout hodnot 1 g/den[5, 9].



Obr. 1: Struktura kyseliny kávové



Obr. 2: Struktura kyseliny chlorogenové

Základní vlastnosti

Jedná se o nažloutlou pevnou látku, dobře rozpustnou v DMSO (40 mg/ml) a hůře v ethanolu (7 mg/ml) nebo PBS (0,65 mg/ml)[10]. Z chlorogenové kyseliny se kyselina kávová získá kyselou hydrolýzou[11].

Absorpce a metabolismus

Kyselá hydrolýza je typický děj probíhající v žaludku, kde je optimální pH asi 1,5 – 2, a částečně se může vyskytovat i v tenkém střevě, kde je optimální pH duodena kolem 6[9, 12, 13]. Dochází tedy k rozkladu za vzniku volné kyseliny kávové. Kromě kyselého pH působí na rozpad kyseliny chlorogenové a tvorbu různých metabolitů i střevní mikroflóra[9] a laktasa, která je lokalizovaná na vnější membráně enterocytů kartáčového lemu tenkého střeva. Ta se významně podílí na enzymatické deglykosilaci[14]. Tato hypotéza by mohla obstojně vysvětlit i podobnost detekovaných vlastností kyseliny kávové a chlorogenové v organizmu. Kyselina kávová může být vstřebávána pomocí pasivní difuze. Naopak dále v tenkém střevě se pH zvyšuje na hodnotu přibližně 7 a pasivní transport je dosti nepravděpodobný, protože dochází k deprotonizaci a celá molekula nese záporný náboj. To vedlo vědce k názoru, že dále v tenkém střevu dochází k aktivnímu transportu závislému na Na^+. Na druhou stranu byla v moči pozorována i kyselina chlorogenová, což naznačuje její absorpci jako intaktní molekuly[5, 14] a lze tedy úspěšně předpokládat, že není zhydrolyzována na 100 %. To bylo ověřeno ve studii na pacientech trpících ileostomií, ze kterých vznikl článek, kde Margreet R. Olthof a kolegové tvrdí, že hydrolýza chlorogenové kyseliny není tak výrazná, jak se dříve předpokládalo[5]. Resorpce kyseliny kávové a kyseliny chlorogenové je u pacientů s ileostomií asi 95 % a 33 %[5].

Metabolizace kyseliny kávové byla zkoumána například na krysích hepatocytech, kde bylo pozorováno zapojení enzymů první fáze biotransformace na *O*-demethylaci, hydrogenaci a dehydrogenaci[15].

Při metabolizaci u krys bylo pozorováno zapojení enzymů druhé fáze biotransformace, což vede k tvorbě různých glukuronidů, sulfátů a methylovaných derivátů (methoxy). Nakonec dochází k rychlé exkreci močí a v menší míře stolicí. 68 % absorbované kyseliny se vyloučí močí, která obsahuje i nepatrné množství nezmetabolizované kyseliny kávové a dále tyto metabolity 4′-*O*-glukuronid kyseliny kávové (38%), 3′-*O*-glukuronid kyseliny kávové (2.1%), 4′-*O*-glukuronid kyseliny ferulové (3.2%), 4′-*O*-sulfát kyseliny kávové (16%), 3′-*O*-sulfát kyseliny kávové (11%), 4′-*O*-sulfát kyseliny ferulové (28%), a 3′-*O*-sulfát kyseliny isoferulové[6].

Biologická aktivita

Významnou a dosti studovanou vlastností je antioxidační aktivita kyseliny kávové. Bylo prokázáno, že kyselina kávová chrání Apolipoprotein B100 před oxidačními modifikacemi, před oxidací cholesterolu (IC_{50} = 1,5 μM) a zvyšuje rezistenci LDL částic vůči peroxidaci (IC_{50} = 0,33 μM)[16]. Se sníženým počtem modifikovaných LDL částic se snižuje i pravděpodobnost aktivace makrofágů, tvorba pěnových buněk a postupně vznikající aterosklerotické pláty (aterosklerózy)[5], [17].

S antioxidačními vlastnostmi souvisí i hepatoprotektivní funkce, tedy ochrana struktur hepatocytů před poškozením, a svým způsobem i protinádorová aktivita[18]. Například ochrana buněk žaludeční sliznice před chloraminem[19] a jinými mutagenními a karcinogenními N-nitrososloučeninami (N-nitrosaminy)[20] způsobujícími zlomy v DNA[19] a různé modifikace bazí, z nich pak nejčastěji tvorba 8-hydroxydeoxy guanosinu[18]. Chloramin je tvořen v žaludku za přispění bakterie *Helicobacter pylori*, která tvoří amoniak a ten reaguje s trávícími šťávami[19].

Podávání kyseliny kávové při ischemii a následné reperfuzi vede k vychytávání reaktivních kyslíkových forem (ROS)[13] a může tak přispět ke zlepšení klinického stavu pacienta. Zdrojem volných radikálů je pravděpodobně hypoxantin-xantin oxidáza[13]. Příznivý efekt má také na hladinu redukovaného intracelulárního glutathionu[8].

Kromě toho byly u kyseliny kávové pozorovány antivirotické vlastnosti proti množení viru herpes symplex typ 1 *in vitro*, ale jen pokud se podala v časném stádiu po infekci, tj. dříve než dojde ke kompletní replikaci genomu viru. Protivirový účinek je pravděpodobně způsoben specifickou vazbou kyseliny kávové s virem nebo s molekulami zapojenými do

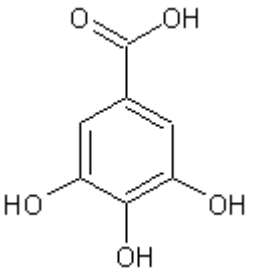
virové replikace[7].

Vliv na mikroRNA

U kyseliny kávové byla pozorována schopnost modifikovat expresi mikroRNA u apoE deficientních myší. Při pokusu došlo ke zvýšení exprese jedenácti mikroRNA (např. miR-291b-5p nebo miR-296-5p) a ke snížení exprese osmnácti mikroRNA (např. 30c-1, miR-374 a miR-467b)[2].

Kyselina gallová

Hlavními zdroji kyseliny gallové jsou čajové lístky, dubová kůra, duběnky a ořechy[21, 22]. Po izolaci získáme bílou až béžovou krystalickou látku[21, 23]. Běžně se vyskytuje jako volná kyselina nebo vázaná ve formě esterů jako třísloviny, ze kterých se získává chemickou nebo enzymatickou hydrolýzou[22]. Zástupcem kyseliny gallové ve vázané formě je například epikatechin gallát.



Obr. 3: Struktura kyseliny gallové

Základní vlastnosti

Kyselina gallová je relativně dobře rozpustná v ethanolu (50 mg/ml)[23] a o něco hůře ve vodě (11,9 mg/ml)[24].

Absorpce a metabolismus

Nutriční význam a distribuce kyseliny gallové v potravě člověka je omezená. To je pravděpodobně jeden z důvodů menšího zájmu o studium a s ním související menší množství informací o absorpci a metabolismu kyseliny gallové[25, 26]. Z dostupných informací je patrné, že absorpce kyseliny gallové při orálním podání je velmi rychlá[25, 27].

Jako hlavní metabolit kyseliny gallové u člověka, ale i u krysy nebo králíka, byla označena 4-*O*-methylgallová kyselina. U látek tohoto typu obvykle dochází ke konjugacím s kyselinou glukuronovou, sírovou nebo methylaci[26]. Po metabolizaci dochází jako obvykle k exkreci močí, kde byly sledovány kromě malého množství kyseliny gallové hlavně její metabolity, například 4-*O*-methylgallová kyselina[27], a také žlučí[26].

Biologická aktivita

Jelikož se kyselina gallová řadí mezi polyfenoly, očekávala se u ní podobná antioxidační aktivita jako u dalších členů této skupiny látek. Při následném testování se tato vlastnost potvrdila. Kyselina gallová vykazovala antioxidační vlastnosti a je schopna eliminovat peroxylové radikály nebo DPPH radikály (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl)[28]. Dále byla antioxidační aktivita sledována u rychle stárnoucích myší, u kterých dochází během stárnutí ke zvýšení (6 měsíců) a následně snížení (9 měsíc) aktivity katalasy v játrech. Devět měsíců staří jedinci vykazovali po třiceti denní léčbě kyselinou gallovou (80 mg/kg) zvýšenou hladinu katalasy v játrech a pokles rozsahu peroxidace oproti kontrole[29].

Na druhou stranu byly u kyseliny gallové zjištěny i prooxidační účinky, Především při interakci s přechodnými kovy. Dále se podobné účinky objevily i při *in vitro* testování při absenci H_2O_2 u HMEC-1 buněk. Naopak při přítomnosti H_2O_2 vystupuje kyselina gallová jako antioxidant[30].

Kromě jiného se kyselina gallová vyznačuje protizánětlivými vlastnostmi, které jsou založeny na kompetitivní inhibici enzymu cyklooxygenasa. Cyklooxygenasa má tři isoformy (COX-1, COX-2 a COX-3)[31], z nichž nejdůležitější pro testování inhibitorů jsou isoforma 1 (konstitutivní) a 2 (inducibilní), ke které má kyselina gallová vyšší afinitu. COX-2 je zodpovědná za tvorbu prostaglandinů z kyseliny arachidonové[21]. Prostaglandiny pak ovlivňují tvorbu trávících šťáv, iniciují zvýšení tělesné teploty, způsobují lokální vasodilataci a zvyšují stahy svalů dělohy. Nicméně ne vždy mají na organizmus pozitivní vliv. Například prostaglandin E2 a jeho imunosupresivní role při chronickém zánětu nebo u některých typů nádorů (tlustého střeva, prsu, jícnu, žaludku)[21, 32]. V některých případech byla u těchto onemocnění pozorována zvýšená exprese COX-2.

Během revmatoidní artritidy dochází k infiltraci zánětlivých buněk a vzniku zánětu, který vede k destrukci chrupavky a zvýšené proliferaci fibroblast-like synoviocytů. Nedávno byla detekována indukce apoptosy u fibroblast-like synoviocytů kyselinou gallovou. Po 48 hodinách došlo při koncentracích 0,1 a 1 μM k výraznému navýšení aktivity kaspasy-3 oproti kontrole (1,96krát a 2,36krát). Apoptosa synoviocytů bude pravděpodobně vyvolána přes

zvýšení exprese proapoptotického proteinu BAX a proteinu p53 a redukci exprese proteinu BCL-2[22]. Podobné výsledky lze sledovat i u některých nádorových buněk, například buněk pankreatu nebo u HL-60RG[29, 33].

Kyselina gallová vykazuje určitou protinádorovou aktivitu související s její schopností inhibovat ribonukleotid reduktasu, která má u nádorové buňky obecně zvýšenou expresi. Inhibice vyvolaná kyselinou gallovou vede ke snížení intracelulární koncentrace nukleotid trifosfátů. Vzniká nedostatek dNTP, který vyústí v zastavení syntézy DNA, obzvláště u nádorových buněk. U zasažených buněk pak dochází k narušení buněčného cyklu a k navození apoptózy[21, 34]. Při testování na buňkách HL-60 byl objeven velmi slibný synergický efekt kyseliny gallové a trimidoxu[34].

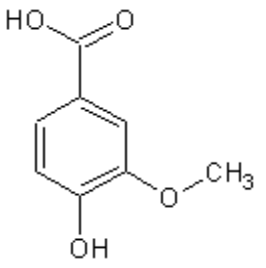
Mimo jiné byla u kyseliny gallové pozorována i vlastnost působící proti obesitě a snižování množství přijímané potravy krysami[35].

Vliv na mikroRNA

Během sestavování rešerše jsme nenarazili na článek zaměřující se na modulaci mikroRNA kyselinou gallovou.

Kyselina vanillová

S kyselinou vanillovou se můžeme často setkat v rostlinných materiálech. Obzvláště v jitrocelu, semenech papáji a v extraktu z *Angelica decursiva*[36, 37, 38].



Obr. 4: Struktura kyseliny vanillové

Základní vlastnosti

Jedná se o nažloutlou pevnou látku mírně rozpustnou ve vodě (1,5 mg/ml)[39].

Absorpce a metabolismus

Kyselinu vanillovou obvykle získáváme z rostlinných zdrojů. Velmi často se vyskytuje ve formě esterů, glykosidů nebo vázaná ve formě komplexů. Ve volném stavu se nachází jen zřídka, avšak vykazuje vyšší biodostupnost. Pokud se kyselina vanillová dostane do trávícího ústrojí ve vázané formě, dochází pravděpodobně k její částečné hydrolýze za pomoci střevní mikroflóry, obdobně jako u jiných zástupců této skupiny. Tato biotransformace ve střevech hraje esenciální roli v biodostupnosti kyseliny vanillové[40, 41].

Při metabolizaci kyseliny vanillové lze očekávat podobně jako u jiných sloučenin této skupiny, zapojení enzymů druhé fáze biotransformace, což vede k tvorbě různých glukuronidů, sulfátů a methylovaných derivátů (methoxy)[41].

Biologická aktivita

Kyselina vanillová vykazuje podobně jako jiné látky s této skupiny antiradikálové a protizánětlivé vlastnosti. Antiradikálová aktivita byla pozorována při *in vitro* testech ABTS (IC_{50}= 1,39 μg/mL), NO (IC_{50}= 23,38 μg/mL) a $ONOO^-$ (IC_{50}= 1,29 μg/mL) skavengerové aktivity a velice omezeně u DPPH testu (IC_{50}= 725,79 μg/mL)[38].

Dále byl pozorován její příznivý účinek na ulcerózní kolitidu. Pravděpodobně působí přes signifikantní inhibici cyklooxygenázy-2. Kromě COX-2 byla při pokusech na myších detekována redukce hodnot IL-6 zvýšených pomocí expozice DSS. DSS je celým názvem dextran sulfát sodný a používá se u myší pro vyvolání ulcerózní kolitidy[42].

Vliv na mikroRNA

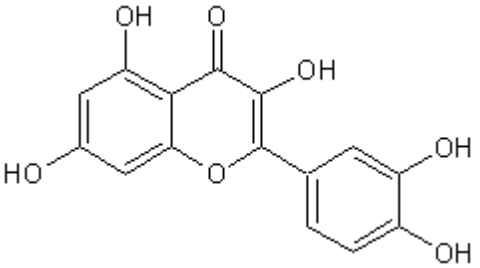
Během sestavování rešerše jsme nenarazili na článek zaměřující se na modulaci mikroRNA kyselinou vanillovou.

2.1.1.2. flavonoidy

Kvercetin

Kvercetin je v potravě široce zastoupeným flavonoidem, který se řadí do podskupiny flavonolů a je jejím hlavním zástupcem[43, 44]. Nachází se v obrovském množství rostlin, nápojů a pochutin obvykle v glykosidované formě např. glukózou, jako hyperosid nebo isokvercetin[45]. Můžeme ho nalézt například v mléce, čokoládě, kaparech, kopru, oreganu,

bramborách, jablkách a mnoha dalších[46, 47].



Obr. 5: Struktura kvercetinu

Základní vlastnosti

Jedná se o citronově žlutou krystalickou látku s velmi dobrou rozpustností v etheru a methanolu, horší v ethanolu a je prakticky nerozpustný ve vodě (60 mg/l)[47].

Absorpce a metabolismus

Z odkazů na starší literaturu se dá vyčíst špatná orální biodostupnost kvercetinu při jednorázových dávkách (asi 2 %)[44, 45]. Biodostupnost hraje důležitou roli u jakékoli biologicky aktivní látky, jež má vykazovat *in vivo* účinky v organizmu. Proto se vědci následně pokoušeli zvýšit gastrointestinální biodostupnost pomocí pevných lipidových nanočástic, což je alternativní systém vůči tradičním koloidním systémům, jako jsou emulze nebo liposomy. Jedná se o nanočástice přírodních nebo syntetických tuhých lipidů s průměrem 10 – 1000 nm, do kterých je kvercetin zabalen. Modifikovaný tímto způsobem vykazoval u krys více než 5krát lepší relativní biodostupnost[44]. Nicméně dnešní studie ukazují, že biodostupnost kvercetinu není zase až tak špatná. Při dlouhodobém podávání i nižších dávek byl pozorován výraznější nárůst hodnot v plazmě zdravých dobrovolníků. Zde byla naměřena velká variabilita v hodnotách jak před, tak i na konci pokusu (pravděpodobně způsobena polymorfizmem enzymů nebo transportérů)[48]. Dále se také uvažuje, že kvercetin může díky své lipofilitě procházet přes membránu enterocytů prostou difuzí[45].

Jelikož se kvercetin vyskytuje spíše ve formě glykosidů, dochází v trávicím ústrojí k postupné hydrolýze pomocí trávících enzymů a enzymů střevní mikroflóry na kvercetin[45]. Po absorpci se dostává do krve, kde se z větší části váže na albumin.

Po absorpci kvercetinu dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou, sírovou a dochází také k metylaci. Takto modifikovaný kvercetin je pak vyloučen z organizmu močí, žlučí do stolice nebo dále metabolizován a u jistého množství může docházet k další metabolizaci a tvorbě CO_2, který je vydýchán přes plíce[45]. Dále může docházet ke tvorbě glukuronidů a sulfátů již v střevních epiteliálních buňkách během absorpce a může se

docházet i k enterohepatální cirkulaci kvercetinu způsobené štěpením glukuronidu zpět na aglykon. Větší množství může být také podrobeno mikrobiálnímu rozkladu ve střevě na fenolické kyseliny a CO_2, který je odstraněn přes plíce[4].

Biologická aktivita

Kvercetin se vyznačuje svými dobrými antioxidačními, protizánětlivými, antibakteriálními a antivirálními vlastnostmi[49]. Dále schopností snižovat rizikové faktory kardiovaskulárních chorob, např. krevní tlak, klidový srdeční puls[50], *in vitro* a na zvířecích modelech. Ale u mnoha studií na lidech se vlastnosti jako snížení krevního tlaku, srdečního rytmu nebo úprava hodnot HDL či LDL nepotvrdily[49], což může být způsobeno testováním na zdravých a dobře živených dobrovolnících[45].

Antioxidační vlastnosti a schopnost vychytávat volné radikály jsou z velké části připisované struktuře kvercetinu. Někteří autoři právě těmto vlastnostem připisují i souvislost s anti-karcinogenními a anti-mutagenními vlastnostmi[4]. Nicméně ve chvíli, kdy se kvercetin zapojí jako antioxidant, může být přeměněn na reaktivní produkty a naopak působit prooxidačně. Při *in vitro* pokusech se ukázalo, že kvercetin může podléhat enzymatické oxidativní degradaci a tvořit ortho-semichinon, tedy volný radikál. Následnou reakcí se za tvorby reaktivních forem kyslíku, jako je superoxidový radikál, přeměňuje na ortho-chinon a tři chinon methidové intermediáty. Tyto intermediáty se pak vůči DNA chovají jako alkylační činidla. V takovém případě však může působit naopak jako mutagen a napadat DNA v buňce[51]. Poškození DNA jader izolovaných z krysích jater vyvolané kvercetinem je závislé na dávce[4]. Jiný článek navrhuje souvislost dvojí role kvercetinu, jak prooxidační, tak antioxidační, v závislosti na prostředí[52].

Akutní toxicita kvercetinu je velice nízká. A to jak při orálním, tak intravenózním podání. U králíků nebyly zaznamenány žádné symptomy i při intravenózní dávce 150 mg/kg tělesné váhy[4].

Další využití

Kvercetin nebo jeho stabilnější modifikaci, což je kvercetin asociovaný s cyklodextrinem, je mimo jiné možné použít jako barvivo a antioxidant do potravin[53].

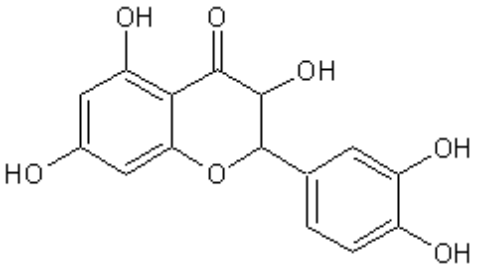
Vliv na mikroRNA

U kvercetinu byla zjištěna schopnost modulovat expresi mikroRNA. U myší byla

pozorována zvýšená exprese miR-122 a miR-125b v játrech jako reakce na zvýšený příjem kvercetinu v potravě[43]. Obecně byla pozorována snížená exprese miR-122 u HCC pacientů asociovaných s chronickou hepatitidou B (respektive u pacientů jen s HCC a jen s chronickou hepatitidou B. Jedná se o specifickou jaterní mikroRNA a její ztráta přispívá k malignímu fenotypu buněk HCC. Nicméně u pacientů lze pozorovat i vzrůst hodnot této mikroRNA, ale zvýšení pravděpodobně reflektuje jaterní poškození způsobené zánětem. Pokud by byla miR-122 použita jako marker HCC, je důležité s touto možností počítat[54].
Validované cíle pro miR-122 jsou například ADAM10 (Protein obsahující desintegrázovou a metaloproteinázovou doménu), serum response factor (SRF) a insulin-like growth factor 1 receptor (Igf1R), které podporují tumorogenezi[55].
Jako přímý cíl miR-125b v buňkách A2780 byl sledován HER3[56].

Taxifolin

Taxifolin se v přírodě běžně nachází v modřínu sibiřském, semenech ostropestřce mariánského[57, 58, 59], palmě Açaí a také nepatrném množství v červené cibuli[59, 60]. Pro laboratorní účely je k dispozici jako světlehnědý prášek[61]. A je též znám pod názvem dihydrokvercetin.



Obr. 6: Struktura taxifolinu

Základní vlastnosti

Taxifolin je relativně dobře rozpustný v ethanolu (61 mg/ml), DMSO (61 mg/ml) a velmi málo rozpustný ve vodě (méně než 1 mg/ml)[59, 62]. Některé vědecké skupiny se pokoušely tuto velmi nízkou rozpustnost ve vodě upravit. Možným přístupem je tvorba mikronizovaného taxifolinu za pomoci metod jako sprejové sušení nebo superkritické krystalizace (the supercritical antisolvent method - SAS). Základem této metody je zvětšit

specifickou plochu a tím zrychlit rozpouštění problematické látky[60]. Při SAS metodě se taxifolin rozpustí v organickém rozpouštědle a následně se pod tlakem přidá CO_2 v superkritickém stavu. Po promíchání dojde ke změně podmínek a dojde k vysrážení taxifolinu ve formě částic s velmi malým průměrem Úpravou různých parametrů se dosahuje změna tvaru a velikosti vznikajících částic.

Absorpce a metabolismus

Znalosti o absorpci a metabolizaci taxifolinu jsou dosti omezené. Absorpce taxifolinu je doprovázena jeho rozsáhlou konjugací a následným metabolismem. Mezi identifikované metabolity taxifolinu patří 3,4-dihydroxyfenyl-octová, m-hydroxyfenyloctová a 3-methoxy-4-hydroxyfenyloctová kyselina[59].

Biologická aktivita

Jak by se dalo očekávat ze struktury, bude mít velmi podobné vlastnosti jako kvercetin[63]. Od něj se liší, jak alternativní název taxifolinu - dihydrokvercetin napovídá, pouhou jednou vazbou[59]. Taxifolin je velmi dobrý přírodní antioxidant, vykazuje jisté protizánětlivé a protinádorové vlastnosti.

Taxifolin vykazuje určité schopnosti chemoprevence. Podle definice by taková látka měla zabraňovat, inhibovat[64] nebo zvrátit karcinogenezi a ochraňovat před vývojem invazivní formy rakoviny[57]. Chemoprevenční vlastnosti taxifolinu byly testovány například na buňkách kolorektálního karcinomu HCT116, kde byl pozorován mírný nárůst hodnot aktivity NAD(P)H chinon oxidoreduktasy při koncentracích 31,3 – 62,5 μM. Tento enzym hraje důležitou roli ve druhé fázi biotransformace některých karcinogenů.

Kromě modulace exprese genu pro NAD(P)H chinon oxidoreduktasu byla pozorována i upregulace a snížení exprese některých genů růstových faktorů (PDGFB, FGF18, FGF3a EGF) a genů spojených s buněčným cyklem (CCNA1 a CDC25A)[57].

U taxifolinu byl také studován efekt na syntézu cholesterolu a triacylglycerolů HepG2 buněk. Jeden z důvodů byla nejspíše i homologie se silybinem, u kterého byla tato vlastnost pozorována. Andre Theriault a jeho kolegové zjistili s pomocí značeného acetátu, že taxifolin inhibuje syntézu cholesterolu *de novo* v přímo úměrně koncentraci. Dále publikovali výrazný vliv na syntézu a sekreci triacylglycerolů a fosfolipidů[58]. Tato biologická aktivita má

zajímavý potenciál, neboť počet pacientů s hyperlipidemií neustále narůstá. Ať je dědičná nebo způsobená nevhodným životním stylem.

Taxifolin sám o sobě nevyvolává apoptosu u nádorových buněk. Nicméně se u něj objevuje synergizmus při použití v kombinaci s andrografolidem u buněk DU-145, což je buněčná linie odvozená od karcinomu prostaty. Andrografolid u výše zmíněných buněk způsobuje zastavení buněčného cyklu, apoptosu a diferenciaci. Při použití v kombinaci s taxifolinem dojde k zesílení indukce apoptosy. Zastavení buněčného cyklu je způsobeno zvýšením hladiny proteinu p21 a zvýšením množství fosforylovaného cdc25c[63].

Dále taxifolin vykazuje antioxidační vlastnosti. Vychytávání radikálů bylo sledováno v mnoha studiích s využitím různých metod a různých přístupů. Jako jeden příklad za všechny uvádíme studii, kdy Shuchong Zu a kolegové pozorovali antioxidační aktivitu na zhášení DPPH. Zjistili, že mikronizovaný taxifolin měl výrazně větší antioxidační aktivitu než kyselina askorbová a nezpracovaný taxifolin[60].

Vliv na mikroRNA

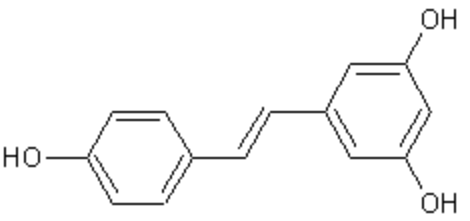
Během sestavování rešerše jsme nenarazili na článek zaměřující se na modulaci mikroRNA taxifolinem.

2.1.1.3. Stilbeny

Resveratrol

Resveratrol se běžně nachází v hroznovém víně, nejvíce pak ve slupce a semenech, ale i ve víně jako nápoji, hlavně červeném. Dále jej můžeme stanovit v cibuli, čekance, červeném zelí, arašídech, brusinkách a borůvkách[65, 66, 67, 68]. Vyizolovaný resveratrol je bílý prášek s nádechem žluté[69].

Resveratrol patří opět mezi sekundární metabolity rostlin (fitoalexiny).



Obr. 7: Struktura resveratrolu

Základní vlastnosti

Resveratrol je dobře rozpustný v ethanolu (50 mg/ml), ale již méně v DMSO (16 mg/ml) a prakticky nerozpustný ve vodě (3 mg/100ml)[69]. Jeho funkce ještě není zcela známá, nicméně působí jako ochranná látka rostliny proti UV záření[70], bakteriím[68] a plísním[65]. Resveratrol se vyskytuje ve dvou možných geometrických izomerech v cis a trans, který v přírodním materiálu převažuje ze sterických důvodů.

Nedílnou součástí testování biologicky aktivní látky je i toxicita, která hraje výraznou roli v určení dávky. Nejinak tomu bylo u resveratrolu. Ten při testování na krysách nevykazoval známky toxicity do dávky 300 mg/kg živé váhy podávané 1x denně sondou po dobu čtyř týdnů, naopak u dávky 3000 mg/kg se již projevovalo významné poškození ledvin ve formě nefropatie a papilární nekrózy, dále se projevila ztráta tělesné hmotnosti a zvýšené hodnoty alkalické fosfatasy. Nicméně po podání jednorázové dávky 2000 mg/kg nevykazovaly krysy žádné výrazné změny[71].

Absorpce a metabolismus

U resveratrolu sice můžeme pozorovat relativně vysokou absorpci[72], nicméně jeho biodostupnost je u člověka velmi malá. Hovoří se o hodnotách menších než 1 %, které jsou pravděpodobně způsobeny rozsáhlým metabolismem resveratrolu ve střevě a játrech. Zejména zmíněná biodostupnost hraje důležitou roli v pozorovaných rozdílech ve vlastnostech látky při *in vivo* a *in vitro* pokusech[73, 74]. Jako je tomu u jiných látek s výhodnými vlastnostmi, i zde se některé vědecké týmy pokoušely zvýšit parametr biodostupnosti. Postupně bylo vyvinuto několik strategií od podávání společně s inhibitory metabolismu resveratrolu, hledání jeho analogů s lepšími vlastnostmi, až po přírodní resveratrol rozpuštěný v komplexním lipidovém roztoku[74].

Během metabolizace dochází ke tvorbě tří různých glukuronidů a dvou sulfátů resveratrolu a dihydroresveratrolu, z nichž majoritní je resveratrol monosulfát. Ty se následně vylučují převážně močí[72, 74] a minoritně žlučí. Dále je pozorována tvorba dihydroderivátu, nejspíše za pomoci bakterií trávícího traktu[72].

Biologická aktivita

Pro resveratrol a výzkum kolem něj byl velice důležitý Francouzský paradox, díky kterému se resveratrol na určitou dobu stal nejstudovanější přírodní látkou. Francouzský paradox je situace pozorovaná na francouzské populaci, která konzumuje stravu obecně bohatou na tuky, nicméně úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění spojené s požíváním

velkého množství lipidů je mnohem nižší než u jiných národů. Úmrtnost na ischemickou chorobu srdeční v Toulouse je 78/100 000 obyvatel, ale v Belfastu 348[66]. To vedlo ke zkoumání tohoto fenoménu a sledování rozdílů v chování a stravování. Ve výsledku bylo navrženo, že zmiňované účinky jsou příčinou kombinace konzumace velkého množství zeleniny a vína[75].

S výše zmiňovanými informacemi souvisí i ateroskleróza. Jedná se o specifický děj, na jehož počátku dochází k oxidaci LDL. Takto pozměněné LDL částice pak nemohou reagovat s LDL receptory a naopak reagují se scavengerovými receptory, které se nachází na makrofázích a aktivují je. Aktivovaný makrofág pohlcuje modifikované LDL částice a postupně se přeměňuje na pěnové buňky. Současně oxidované LDL stimulují endoteliální buňky, které začnou produkovat MCP-1. Ty fungují jako chemoatraktanty a přitahují monocyty do arteriální stěny. Resveratrol zde vystupuje jako antioxidant a inhibuje produkci intracelulárních a extracelulárních ROS. Výsledkem je zvýšená aktivita enzymů, jako jsou superoxid dismutasa nebo glutathion reduktasa, které jsou kritickou součástí antioxidační ochrany organizmu[76].

Resveratrol působí na regulaci apoptosy a proliferace buněk přes redistribuci CD95 a jiných faktorů smrti na lipidových raftech a jejich senzibilizaci vůči jejich ligandům. Dále zvyšují expresi proapoptotických genů a současně snižují expresi genů antiapoptotických[68].

Je také významným hráčem s protizánětlivými vlastnostmi. Snižování zánětlivé reakce zahrnuje inhibici enzymů cyklooxygenasy (COX, IC_{50} < 1 μM)[76] COX-1 a COX-2, které syntetizují prozánětlivé mediátory. Další inhibiční účinek směřuje na transkripční faktory jako je NF-κB a AP-1, které ovlivňují expresi genů důležitých pro imunitní a zánětlivou odpověď[68, 71].

Ribonukleotid reduktasa a DNA polymerasa jsou dva klíčové enzymy pro syntézu DNA. Při pohledu na nádorovou buňku, která se vyznačuje oproti normální rychlým buněčným cyklem, pak inhibice tvorby deoxyribonukleotidů a blokace DNA polymeras α a δ (IC_{50} 3,3 a 5 μM) resveratrolem[77] působí protinádorově. Výsledkem blokace bude snížení proliferace nádorových buněk.

Vliv na mikroRNA

Během testování v preklinických studiích byl u resveratrolu objeven potenciál pro modulaci hladiny mikroRNA. Tyto změny se týkaly zvýšení exprese tumor-supresivní a potizánětlivé miR-663 a snížení exprese prozánětlivých miR-21 a miR-155[68].

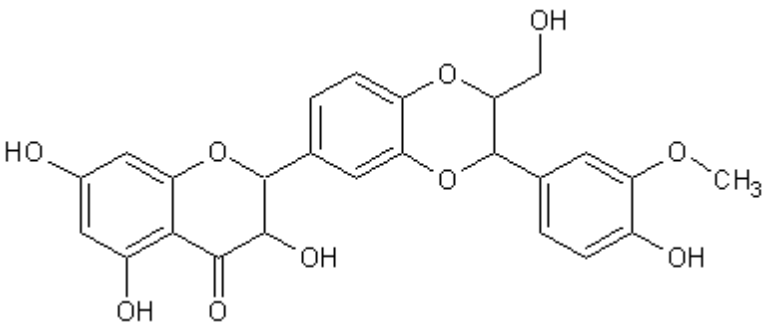
Pokud se podíváme na srdce a kardiovaskulární onemocnění je velkým problémem

ischemie a následná reperfuze. Ischemie je nedostatečně prokrvení tkáně způsobené okluzí přívodní tepny. Zasažená tkáň reaguje na nedostatek kyslíku, živin a postupně přechází na anaerobní metabolizmus. Ischemie je nebezpečná, ale možná i větší riziko se skrývá v následné reperfuzi, tedy uvolnění/odstranění překážky a obnovení průtoku. Při opětovném okysličení tkáně dochází ke tvorbě a uvolňování velkého množství radikálů, které následně poškozují sledovanou tkáň. Během reperfuze byla pozorována i modulace více než 50 mikroRNA, z nichž některé mohou hrát klíčovou roli v redukci zmiňovaného poškození. Během studia resveratrolu na zmiňovaný děj byl pozorován vliv na expresi miR-21, miR-20b, miR-27a a miR-9[66].

2.1.1.4. Lignany

Silybin

Jedná se o látku přírodního původu a o hlavní aktivní složku silymarinu, což je standardizovaná směs obsahující přibližně 70 až 80 % silymarinových flavonolignanů a 20 až 30 % směsi je nedefinováno[78]. Získává se extrakcí ze semen Ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Ostropestřec mariánský, jedno až dvouletá rostlina řadící se do čeledi hvězdicovitých, dorůstá velikosti asi 30 až 200 cm a pro léčebné účely se používá již více než 2000 let[79].



Obr. 8: Struktura silybinu

Základní vlastnosti

Po izolaci a separaci získáme silybin ve formě bílého až nažloutlého prášku, jež je směsí dvou diastereomerů v poměru 1 : 1, silybinu A a silybinu B. Výhodnou vlastností je

nepatrná toxicita (hodnota LD_{50} při intravenózním podání je 400 mg/kg u myší a u perorálního podání dosahuje hodnot více než 10 g/kg)[80] a absence výrazných nežádoucích účinků při použití vysokých dávek[81]. Situace se může změnit při podání některých léčiv v důsledku inhibice CYP 3A4, který hraje důležitou roli v metabolizaci léčiv. Výsledkem je zvýšená hladina léčiva v krvi[79]. Rozpustnost silybinu v DMSO (10 mg/ml DMSO) je v porovnání se 100% ethanolem (0.1 mg/ml ethanolu) obstojná[82]. Velký problém však způsobuje velmi nízká rozpustnost ve vodě (asi 0,5 mg/ml vody)[78], která úzce souvisí s biodostupností silybinu a jeho účinky na organizmus.

Absorpce a metabolismus

Hlavním problémem je řešení nízké rozpustnosti ve vodě. V praxi se tato situace řeší například tvorbou s lipidy kompatibilních molekulárních komplexů (fytosomů) jako je silybin-fosfatidylcholinový komplex[83]. Fytosomy lépe procházejí z hydrofilního prostředí střeva přes lipofilní membránu enterocytu, skrz buňku až do krve. Další možné řešení je tvorba glykosidů, například silybin-galaktosid, glukosid, maltosid a laktosid, které mají sami o sobě výrazně vyšší biodostupnost, stabilitu a účinnost v ochraně před lipoperoxidací a volnými radikály[84]. Úprava rozpustnosti silybinu zvyšuje pravděpodobnost uplatnění v různých oblastech lékařství a prevence.

Po absorpci je silybin metabolizován v játrech. Ve I. fázi biotransformace dochází k jeho demethylaci nebo hydroxylaci a minoritně dihydroxylaci. Následná II. fáze biotransformace se vyznačuje velkou rychlostí konjugace se sulfáty a kyselinou glukuronovou. Nakonec je silybin vyloučen majoritně žlučí a minoritně močí (asi 5 % dávky)[79].

Biologická aktivita

Nejčastěji je silybin používán k léčbě jaterních poruch včetně hepatitidy, cirhózy, žloutenky a k ochraně jater před otravou různými chemickými a přírodními toxiny díky svým hepatoprotektivním účinkům[78].

Ochrana je způsobena dvěma základními mechanizmy. Cytoprotektivní účinky jsou zajišťovány pomocí antioxidačních vlastností silybinu a také přímou interakcí se složkami buněčných membrán. Druhý mechanizmus je založen na pozitivním ovlivnění syntézy buněčných proteinů stimulací DNA dependentní RNA polymerasy I[84].

Silybin také vykazuje výraznější vzrůst aktivity glutathion reduktasy v žaludku, tenkém střevě, kůži a plicích v rozmezí dávek 100 a 200 mg/kg a obecně GIT soustavy[81].

Kromě jeho antioxidačních vlastností se používá jako protizánětlivé a antifibrotické agens[81].

Silybin se velmi často používá i do různých přípravků pro ochranu kůže, kdy po ozáření UVA a UVB dochází ke tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty způsobují poruchy na kůži, jako jsou edém, hyperplazie nebo poškození DNA. Silybin problémy výrazně zredukuje díky již zmiňované antioxidační aktivitě[85].

Využití silybinu jako přídavné látky v jiných léčivech[86]

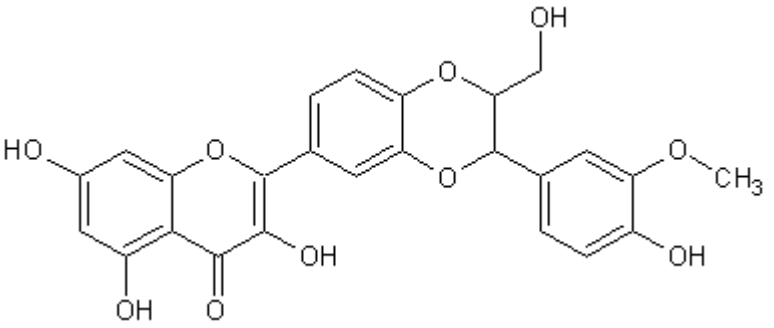
Po objevení schopnosti silybinu interagovat s p-glykoproteiny buněk střevní stěny a cytochromy CYP 3A4, kdy dochází k jejich inhibici, se začalo uvažovat o novém využití silybinu jako adjuvantní látky k jiným léčivům jako je paklitaxel. V takové kombinaci pak silybin ovlivňuje biodostupnost paklitaxelu zvýšeným transportem přes tenké střevo způsobeným inhibicí p-glykoproteinu (vzrůst inhibice je statisticky významný od koncentrace 100 μmol/l), který vrací paklitaxel do střeva a současnou blokací jaterních nebo intestinálních CYP 3A4 (inhibice je závislá na koncentraci, IC_{50} = 1.8 μmol/l), následek je snížení jeho metabolizace a exkrece žlučí zpět do střeva a ven ve stolci.

Vliv na mikroRNA

Během sestavování rešerše jsme nenarazili na článek zaměřující se na modulaci mikroRNA silybinem

Dehydrosilybin

Dehydrosilybin je obsažen jako minoritní složka v extraktu ze semen Ostropestřce mariánského, což je tzv. silymarin[87, 88]. Dehydrosilybin může být vhodně připraven zahříváním silybinu za přítomnosti vzduchu a báze[88].



Obr. 9: Struktura dehydrosilybinu

Základní vlastnosti

Jedná se o žlutou pevnou látku[87, 88] rozpustnou v DMSO a mnohem hůře rozpustnou ve vodě.

Absorpce a metabolismus

O absorpci a metabolismu dehydrosilybinu neuvádí literatura žádné informace. Vzhledem k tomu, že je lipofilnější než siylbin, pravděpodobně se jeho vlastnosti budou od silybinu lišit.

Biologická aktivita

U dehydrosilybinu bychom očekávali velice podobné vlastnosti jako u silybinu. Toto tvrzení můžeme pozorovat například u antioxidačních vlastností, které můžeme pozorovat u obou látek. Nicméně v experimentech se ukázalo, že dehydrosilybin má vyšší antioxidační aktivitu. Při inhibici tvorby reaktivních forem kyslíku glukosa-glukosa oxidázovým systémem u HepG2 buněk je IC_{50} dehydrosilybinu 3krát nižší než u silybinu. Dále je ve srovnání se silybinem cytotoxičtější při zabíjení nádorových buněk[87]. Reaktivní formy kyslíku dále hrají roly v regulaci metaloproteinas 2 a 9, které se zapojují do degradace kolagenu typu IV. Ta se ukazuje jako kritická při invazi a metastazování nádorů[87].

Další zajímavou vlastností dehydrosilybinu je schopnost inhibice topoisomerasy I. Při srovnání této schopnosti s redukovanou formou, silybinem, vykazoval dehydrosilybin vyšší inhibiční aktivitu u fibroblast-like HPV16 E6/E7 imortalizovaných keratinocitů z gingivální sliznice. U dehydrosilybinu se objevila výrazná inhibice při nižších koncentracích (30 μM) jako u silybinu, kde se při stejné koncentraci sledovaný efekt nedostavil. Podobné výsledky vykazoval i experiment pouze s enzymem[88].

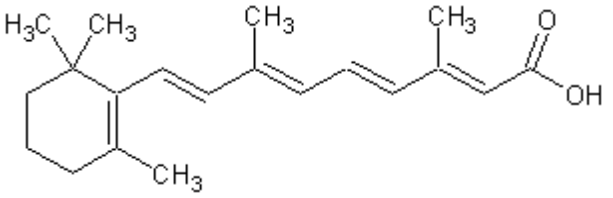
Podobně jako silybin i jeho 2,3-oxidovaná forma má schopnost snižovat příjem glukosy pomocí inhibice GLUT proteinů[89]. GLUT zprostředkovávají transport glukosy do buňky jako transportéry.

Vliv na mikroRNA

Během sestavování rešerše jsme nenarazili na článek zaměřující se na modulaci mikroRNA dehydrosilybinem.

2.2. Kyselina retinová (derivát vitamínu A)

Kyselina retinová je žlutá krystalická látka. Pro laboratorní účely se vyrábí plně synteticky[90]. V lidském těle se kyselina retinová syntetizuje z vitamínu A, který je přijímán potravou. Jedná se o derivát vitamínu A, řadí se mezi retinoidy[91].



Obr. 10: Kyselina all trans retinová

Základní vlastnosti

Kyselina retinová je v roztoku velice nestabilní, je citlivá na světlo, teplo a extrémně rychle se oxiduje. Je prakticky nerozpustná ve vodě, lépe rozpustná v 95 % ethanolu (2,7 mg/ml) a DMSO (40 mg/ml)[90]. Kyselina retinová a retinoidy obecně jsou rozpustné v tucích a procházejí přes hematoencefalitickou bariéru[92].

Velkým problémem kyseliny retinové je její toxicita. Při jejím použití se objevují bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, nepravidelný srdeční tep a u těhotných žen vykazuje teratogenní účinky[93].

Absorpce a metabolismus

Přirozenou cestou se do těla dostává ve formě retinyl esterů ze zvířecích zdrojů nebo ve formě β-karotenu z rostlin. Retinyl estery se ve střevě hydrolyzují na vitamín A a β-karoten je ve střevech přeměňován na vitamín A za pomoci enzymu beta-karoten-15,15´-dioxygenasy na retinal a následně redukcí retinol dehydrogenasou v přítomnosti NADH na retinol[94]. Ten je uchováván v játrech ve formě retinyl esterů. Z jater se uvolňuje jako retinol hydrolýzou retinyl esterů do krevního oběhu a tvoří komplex s RBP proteinem a transthyretinem. Z nich se následně uvolňuje a vstupuje do cílových buněk, např. neuronů. Vstup umožňuje specifický receptor stra6 a transport je obousměrný[95]. Po vstupu se naváže na celulární RBP a dvěma enzymy se konvertuje na retinovou kyselinu [96], která je po navázání na CRABP translokována do jádra.

Při léčbě chorob se podává přímo kyselina retinová. Ta je vstřebávána střevy a putuje

do krve. Zde se váže na krevní albumin a následně vstupuje do cílových buněk, kde plní úlohu transkripčního faktoru.

Exkrece je renální a stolicí, kdy bylo za použití radioaktivně značné kyseliny retinové prokázáno vyloučení 63% značených produktů metabolismu v moči během 3 dnů a 31% ve stolici do 6 dnů[97].

Biologická aktivita

Je důležité zmínit vazbu kyseliny retinové na retinoidní receptor, která má ve výsledku vliv na transkripci některých genů[96]. Transkripční aktivita ATRA je v lékařství využívána jako možná léčba akutní promyelocytické leukemie (APL).

Retinová kyselina se zdá být potenciálním léčivem a chemoprevenční látkou proti nemalobuněčnému karcinomu plic. ATRA inhibuje proliferaci buněk, indukuje diferenciaci a markery apoptosy. Problémem retinové kyseliny jsou ovšem její nežádoucí účinky při perorálním podáním. Nedávno byla vyvinuta inhalační metoda s potenciálem zajištění dostatečné koncentrace v plicích a redukcí nežádoucích účinků, díky zamezení systémové expozici organizmu[97].

ATRA v topické formě se používá proti mírné a střední akné, protože stimuluje růst nových buněk a pročištění pórů. A také díky svým protizánětlivým účinkům působením na fagocytózu, respirační vzplanutí a NO syntasu [98].

Vliv na mikroRNA

Kyselina retinová vykazuje schopnosti modulovat množství mikroRNA v různých nádorových buňkách *in vitro*. Jedním z ukázkových případů můžou být buňky odvozené od buněk kostní dřeně pacienta s recidivou akutní promyelocytické leukemie (NB4 – promyelocytická buněčná linie)[99], u které dochází po vystavení kyselině retinové k regulaci mikroRNA a navození diferenciace. To nám umožňuje eliminovat negativní efekt fúzního genu PML-RARα u promyelocytů, což jsou nezralé granulocyty[100]. Při podání kyseliny retinové dojde v porovnání s kontrolními NB4 ke zvýšení exprese miR-186, miR-215 a miR-223, kdežto u miR-17-5p, miR-25, miR-193, miR-195, and let-7a můžeme pozorovat jejich snížení[100].

Modulace exprese kyselinou retinovou byla pozorována i u buněčné linie HL-60. Zde došlo po expozici xenobiotiku ke zvýšení exprese u miR-22, miR-145, miR-223, miR-363, miR-494, miR-663 a snížení u miR-10a, miR-181 a miR-612[101]. Jedná se o jeden z možných důvodů diferenciace HL-60.

Jiná vědecká skupina objevila indukci miR-21 vyvolanou u NCF-7, buněk karcinomu plic pozitivních na estrogenový receptor, po vystavení kyselině retinové. Ta sice vede proti snížení proliferace, ale působí na zvýšení pohyblivosti buněk. Jmenované vlastnosti jsou výsledkem ovlivnění genové exprese prozánětlivého cytokinu IL1B, adhezní molekuly ICAM-1 (intercelulární adhezivní molekula 1 – protein lokalizovaný na buněčném povrchu) a tkáňový aktivátoru plazminogenu PLAT, který hraje důležitou roli v motilitě buněk a v remodelaci tkáně. Snížení exprese miR-21 má účinky opačné.
Kdežto buňky karcinomu plic negativních na estrogenový receptor na léčbu kyselinou retinovou nereagují[102].

2.3. MikroRNA

MikroRNA jsou malé, asi 18 – 22 nukleotidů dlouhé molekuly RNA vyskytující se jak v rostlinných, tak i živočišných buňkách. V hierarchii molekul RNA se řadí do skupiny malých endogenních nekódujících RNA[103, 104]. Zde zastávají regulační funkci exprese proteinů, ke které dochází na post-transkripční úrovni. Váží se na komplementární část řetězce cílové mRNA a regulují tím tvorbu příslušných proteinů. Tyto regulační sítě jsou často velmi složité, protože jediná mikroRNA může regulovat více mRNA nebo naopak. Tímto způsobem mohou ovlivňovat morfologii tkání, diferenciaci buněk a buněčné procesy jako je apoptosa, proliferace nebo hlavní buněčné dráhy[104]. Nejčastěji je mikroRNA kódována v intronech nebo v antisense orientaci na geny, ke kterým jsou komplementární. Bylo zjištěno, že u některých nádorů nedochází k deregulaci exprese určitých mikroRNA, například u nádoru prostaty byla pozorována miR-141[105]. Její exprese je tkáňově specifická. MikroRNA byla objevena i v séru jako stabilní cirkulující struktura v měřitelném množství[105], které je detekovatelné i v séru zdravých jedinců. Velice zajímavá je také jejich vysoká stabilita v krvi a odolnost vůči RNAsam[105]. Zmiňované vlastnosti mikroRNA předurčují pro využití v diagnostice jako blood-based marker[105]. Výsledkem mohou být testy na přítomnost nádorů z krve ve snaze provést co nejméně invazivní vyšetření a pokusit se snížit tlak na fyzickou a psychickou stránku pacienta. Cíl tohoto úsilí je také snaha o detekci nádorů již v brzkém stádiu a tím zvýšení šance na přežití respektive zlepšení jeho prognózy. Což může vést mimo jiné i ke snížení celkových nákladů na léčbu[106]. Neméně významnou vlastností mikroRNA je její zapojení do kontroly a regulace buněčné diferenciace a vývoje. Tato hypotéza byla prokázána experimentem na embryonálních buňkách myší, u nichž byla geneticky vypnuta

transkripce mikroRNA. Buňky sice žily, ale nedocházelo k jejich diferenciaci[107]. Další funkcí je regulace apoptosy, například u hepatocelulárního karcinomu je v kontrastu s normální tkání pozorováno snížení exprese miR-29[108].

2.3.1. První objev

První mikroRNA byla objevena v roce 1993[109] u hlísta *Caenorhabditis elegans* při studiu jeho genu lin-14. Vědci z Harvardské univerzity objevili, že dochází k regulaci proteinu kódovaného tímto genem krátkým řetězcem RNA, který je kódován v genu lin-4. Primární transkript sledované mikroRNA obsahuje 61 nukleotidů, nicméně během svého putování projde několika úpravami a jako finální (zralá) mikroRNA se skládá pouze asi z 22 nukleotidů, které jsou komplementární k 3´ nepřekládané sekvenci,(3´ UTR) mRNA lin-14[109]. Celý proces je zakončen inhibicí translace mRNA lin-14 na protein, která vyvolá buď předčasný, nebo retardovaný vývoj larvy. Po tomto objevu se rozhořel velký zájem o tyto molekuly a rozjel se obrovský výzkum této problematiky. Během krátkého období bylo popsáno obrovské množství mikroRNA, do dnešní doby již bylo objeveno více než 1600 mikroRNA (1600 prekurzorů)[104].

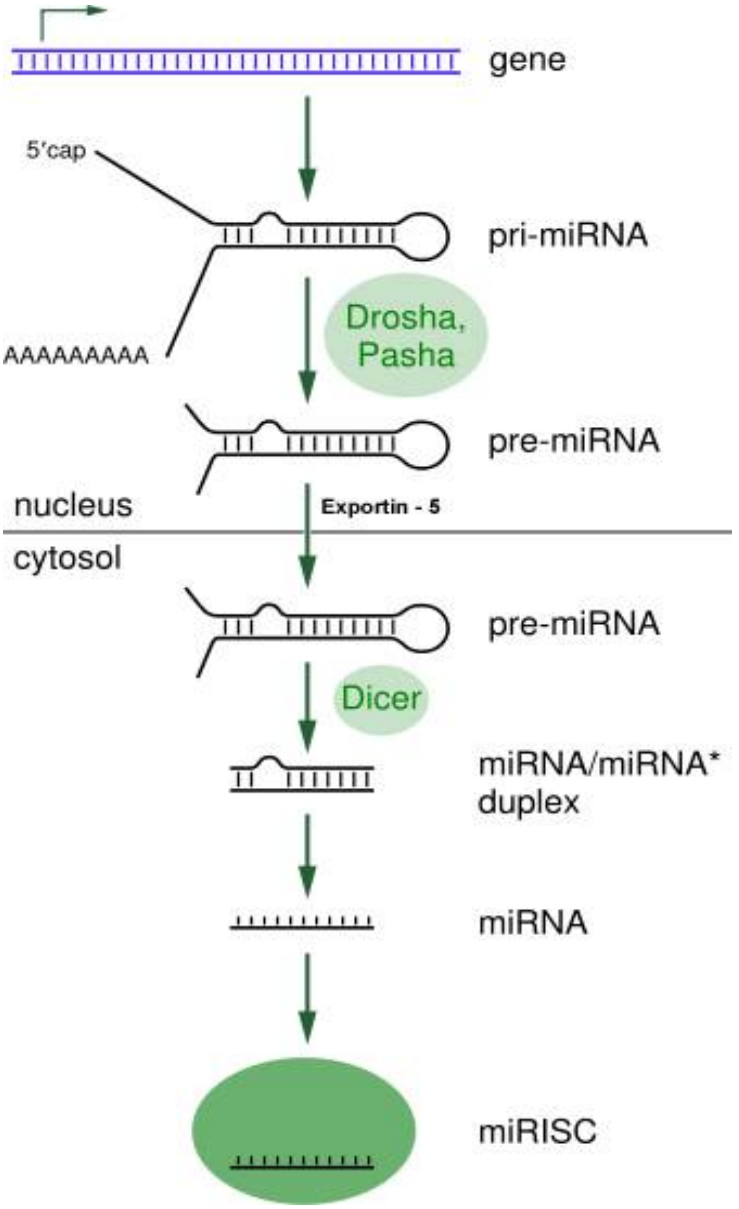
2.3.2. Biogeneze mikroRNA

V prvním kroku dochází k hrubému přepisu RNA-polymerasou II z DNA[109]. Tímto přepisem vzniká pri-miRNA, takzvaný primární transkript. Jeho vlákno je dlouhé stovky až tisíce nukleotidů. Zpracování primárního transkriptu začíná již v jádře. Nejprve proběhnou úpravy drobnějšího charakteru zahrnující tvorbu guanidinové čepičky na 5´ konci a na 3´ konci dojde k syntéze poly-A konce. Poté přistupují jaderné endonukleasy Drosha[110] a Pasha, které provedou razantnější proces zahrnující sestřih mikroRNA transkriptu. Tato mikroRNA se po sestřihu tvaruje do smyčky a tvoří se tzv. pre-miRNA, jež má délku kolem 70 nukleotidů (precursor-miRNA)[111].

Vytvořená pre-miRNA je následně exportována z jádra do cytosolu za pomoci nukleocytoplasmatického transportního proteinu Exportin-5. Jedná se o protein, který můžeme zařadit do proteinové rodiny karyopherin. V cytosolu pak dochází k dalším úpravám pre-miRNA[110].

V cytoplasmě dochází k interakci s enzymem Dicer, což je fakticky RNAsa III[112], která zkracuje mikroRNA sestřihem na finální délku vlákna asi 18-22 nukleotidů. Tvoří se dvouvláknová mikroRNA (duplex), která je neznámým enzymem štěpena, jedno vlákno je degradováno endonukleasou, na zralé mikroRNA molekuly[110], které již vykazují schopnost

posttranskripčně regulovat expresi proteinů (genů).



Obr. 11: Grafické schéma biogeneze mikroRNA.
Na obrázku je zachycena biogeneze mikroRNA od transkripce mikroRNA na primární transkript, přes následné posttranskripční úpravy, export z jádra a její zpracování na zralou mikroRNA. poslední část schématu, zahrnuje tvorbu komplexu RISC.
(Převzato http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:MiRNA_processing.svg 5. 4. 2013)

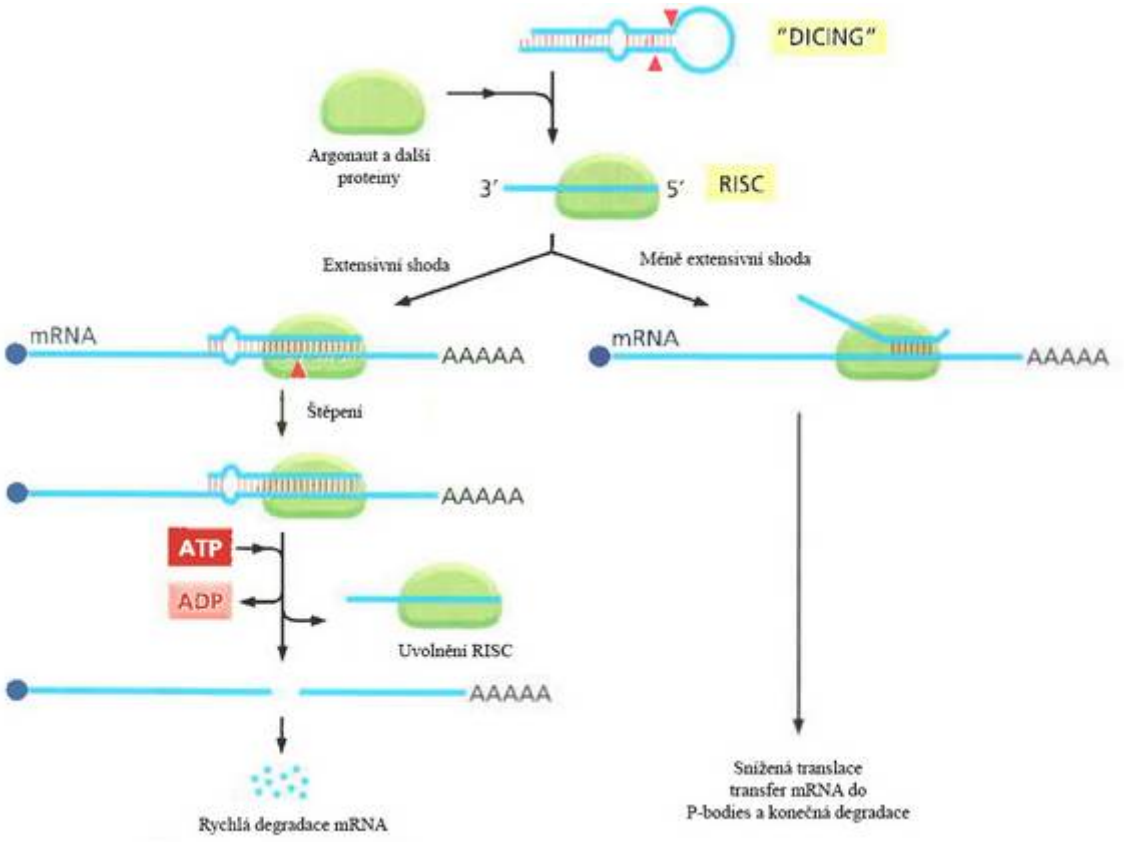
2.3.3. Mechanismus účinku mikroRNA[113]

MikroRNA má principielně dva mechanismy účinku, které se dělí podle míry komplementarity vůči cílové mRNA.

- Schéma na Obr. 11 znázorňuje, jak se mikroRNA inkorporuje do komplexu RISC (RNA induced silencing complex), který se skládá z proteinu argonaut a dalších komponent (proteinů). Tento komplex pak nasedá na mRNA s komplementární 3´

UTR sekvencí. Po rozeznání této sekvence dochází navázání na příslušnou mRNA a započne štěpení proteinem argonaut a velmi rychlý proces degradace. mRNA je tímto komplexem štěpena na fragmenty a tím se stává pro ribozomy nepoužitelná. Tento mechanismus je běžně pozorován u rostlin.

- Druhá část schématu je typická spíše pro živočichy, kde není komplementarita mikroRNA : mRNA tak extensivní. Což vede k inhibici transkripce, destabilizaci a transportu do P-bodies (processing bodies). Zde je z mRNA odstraněna čepička na 5´konci a je štěpena přítomnými enzymy. Efekt destabilizace je spojen se zkracováním poly-A konce mRNA. P-bodies jsou vesikuly lokalizované v cytoplazmě a obsahující enzymy degradující mRNA, odstraňující 5´ čepičku a poly adenylační enzymy. Kromě degradace zde může docházet ke krátkodobému skladování mRNA, která se může vrátit zpět a zapojit se do proteosyntézy. Zjednodušeně řečeno ve srovnání s předchozím mechanismem nedochází k tak prudkému poklesu hodnot mRNA v buňce. mRNA tak zůstává přítomna v buňce, ale nedochází k translaci.



Obr. 12: Grafické schéma mechanismu účinku mikroRNA.
Na obrázku jsou zachyceny dva možné mechanismy účinku mikroRNA.
(převzato z Alberts B. et al. Molecular Biology of the cell (5th edition))

3. Cíl práce

Cílem práce bylo testovat globální účinek přírodních látek na expresi mikroRNA v lidské hepatocelulární linii HepG2. Jako srovnávací látka byla použita kyselina all-trans retinová, o které je známo, jakým mechanismem reguluje transkripci genů.

Součástí tohoto cíle bylo zhodnotit případnou toxicitu testovaných látek a také možnou interakci s retinoidním receptorem.

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie

Dimethylsulfoxid, kyselina ethylen-diamintetraoctová, neesenciální aminokyseliny, fetální hovězí sérum, penicilin/streptomycin, L-glutamin, TriZOL Reagens, trypanová modř (0,4% roztok), trypsin – EDTA (0,25% roztok), Triton TX-100, (3-(4,5-dimethylthyazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid, N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N´-2-etansulfonová kyselina, dithiothreitol, KCl, chloroform, 0,01% Coomassie brilliant blue, Lipofectamin 2000, ethanol, Na_2HPO_4, isopropanol, 85% H_3PO_4, NaCl, Opti-MEM, Dual-light system (Lyzační pufr, Pufr A, Pufr B, Galaction-PLUS substrát a Accelerator-II) a roztoky využité pro stanovení miRNA array čipů Affymatrix (10x reaction buffer, 25mM $MnCl_2$, ATP mix, PAP enzyme, voda prostá nukleas, 1 mM Tris, eucariotic hybridization kontrol kit, kontrol oligonucleotide B2, Stain Cocktail 1, Stain Cocktail 2, Stain Cocktail 3, HT Array Holding Buffer, HT Wash Buffer A, or HT Wash Buffer B).

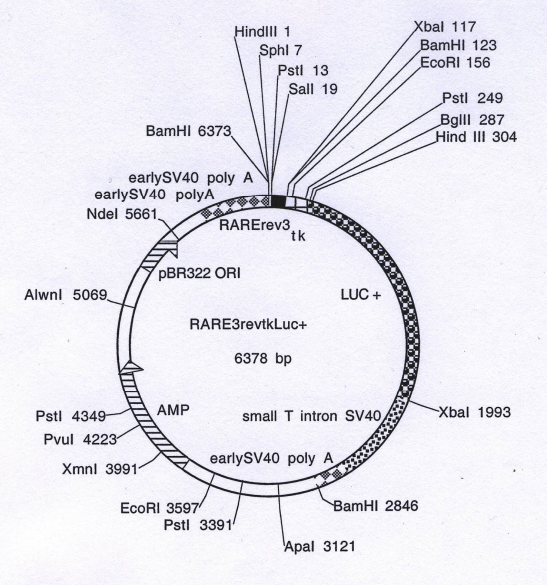
4.2. Biologický materiál

V rámci všech experimentů byla využita buněčná linie HepG2 (lidský hepatocelulární karcinom).

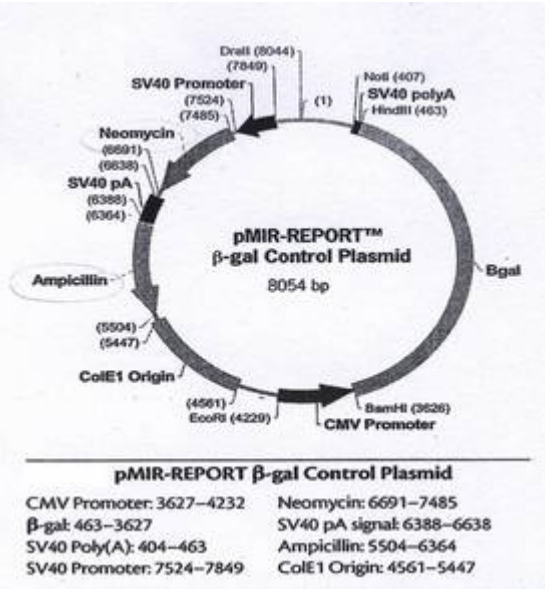
Pro transfekce byly použity plasmidy RARe-luc, dar dr. Patricka Balaguera, a komerčně dostupný plasmid β-gal (Ambion)

Plasmid RARe-luc, celým názvem RARE3revtkLuc+ je kruhový plasmid o velikosti 6378 párů bazí. Byl originálně vyroben Patrickem Balaguerem a Anne-Marie Boussiouxovou v roce 1996. Jeho podrobný popis poskytuje Obr. 13.

Plasmid β-gal, celým názvem pMIR-REPORT β-gal control plasmid byl komerčně dodán firmou Ambion. Opět se jedná o kruhový plasmid s velikostí 8054 párů bazí. Jeho podrobný popis je obsažen v Obr. 14.



Obr. 13: plasmid RARe-luc



Obr. 14: plasmid β-gal

4.3. Roztoky

Fosfátový pufr:

NaCl (0,137 mol/l), KCl (0,00268 mol/l), KH_2PO_4 (0,00147 mol/l), Na_2HPO_4 (0,00896 mol/l), pro pokusy byl zředěn zásobní roztok 10x.

Roztoky využité pro stanovení aktivity kaspasy 3

- lyzační pufr

HEPES (0,05 mol/l), pH 7,4; Triton X-100 (0,5 %, v/v), inhibitor proteas Complete^{TM} (1 tableta v 50 ml), DTT (0,005 mol/l)

- reakční pufr

HEPES (0,02 mol/l), pH 7,1; EDTA (0,002 mol/l), inhibitor proteas Complete^{TM} (1 tableta v 50 ml), DTT (0,005 mol/l)

- zásobní roztok substrátu pro kaspasu 3

10 mM Ac-DEVD-AMC v DMSO

- zásobní roztok inhibitoru pro kaspasu 3

2 mM Ac-DEVD-CHO v DMSO

Roztoky využité pro stanovení proteinů metodou podle Bradfordové

0,01% Coomassie brilliant blue v 100 ml 85% H_3PO_4, 50 ml 95% etanolu a do objemu 1000 ml doplnit ddH_2O.

Pro tvorbu kalibračních roztoků byl využit hovězí sérový albumin o různých koncentracích.

4.4. Kultivační médium

Dulbeccem modifikované Eaglovo medium

+ neesenciální aminokyseliny
+ penicilin, streptomycin
+ fetální bovinní sérum
+ pyruvát sodný
+ L-glutamin

4.5. Přístroje

Chlazená centrifuga *Mikro 22* (Hettich Zentrifugen, Německo)

Centrifugy *MiniSpin*® (Eppendorf, Německo)

Centrifuga *Labofuge 400* (Heraeus, Německo)

UV-VIS spektrofotometr *UV-2401PC* (Shimadzu, Japonsko)

Nanophotometer® P 300 (IMPLEN, Německo)

Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

Mikroskop *CK40-F200* (Olympus Optical, Japonsko)

Termocykler *MiniOpticon*™ (BioRad, USA)

Vakuové čerpadlo *Vacc-space* (Chromservis, Slovensko)

Váhy *AX105 DeltaRange*® (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Hlubokomrazící box *VX 380* (Jouan, Francie)

Ultrazvuková termostatová vodní lázeň *PS 01000A* (Notus-Powersonic, Slovensko)

Laminární box *CLF* (Schoeller Instruments, ČR)

Laminární box pro RT-PCR (BioAir Instruments, ČR)

Zařízení pro přípravu deionizované vody *Ultrapur* (Watrex, ČR)

Fotometr pro měření absorbance v 96-jamkových deskách (Tecan, Salzburg, Rakousko)

Inkubátor *MCO-17AIC* (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

Mixér *REAX top* (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)

Luminometr *FB 12* pro měření chemiluminiscence (Berthold Detection System, Německo)

GeneChip® Fluidics station 450 (Affymatrix, USA)

GeneChip® Hybridization Oven 645 (Affymatrix, USA)
GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymatrix, USA)

4.6. Použité metody

Kultivace buněk:

Buňky se kultivují v inkubátoru při teplotě 37 ^{O}C, v atmosféře obsahující 5% CO_2 a prostoru nasyceném vodními parami.

Během kultivace je potřeba pravidelně měnit kultivační médium a zajistit tak přísun nových živin, odstranění toxických metabolitů a jiných faktorů, které mohou působit jako signál pro zastavení růstu či vyvolání apoptosy. Výměna se provádí každých 24 – 72 hodin v závislosti na množství buněk v lahvi. Před dosažením konfluence je potřeba buňky pasážovat, nejlépe při 60 – 80 % pokrytí povrchu kultivační láhve. Jedná se o proces zahrnující v první fázi oplach buněk pomocí PBS, kterým se odstraní přebytečné médium a metabolity. Bez potřebného oplachu by byl následující krok neúčinný. Uvolnění buněk z podložky se provede inkubací s 0,25 % roztokem trypsinu s EDTA pro narušení kontaktu buněk se stěnou kultivační nádoby. Nakonec se přidá čerstvé médium, buňky se šetrně homogenizují a suspenze se po stanovení počtu buněk v 1 ml použije na vysetí desek pro experiment a část se vrátí do kultivační lahve k další proliferaci.

Počítání buněk

Vlastní počítání buněk se obvykle provádí za pomoci Bürkerovy komůrky.

Výsev buněk

Buňky se v rámci experimentů vysévají na šesti, dvaceti čtyř a devadesáti šesti jamkové desky. Jamky mají různou plochu, což se odrazí na množství vysetých buněk.

Výsledná suspenze se musí připravit tak, aby splňovala tyto kritéria:

Šesti jamkové desky - na jamku se vysévá 1.10^6 buněk v 1,5 ml média

Dvaceti čtyř jamkové desky - na jamku se vysévá 8.10^4 buněk v 0,5 ml média

Devadesáti šesti jamkové desky - na jamku se vysévá 3.10^4 buněk ve 200 µl média.

Při našich experimentech jsme pravidelně využívali všechny uvedené typy desek.
Po zjištění počtu buněk v základní suspenzi se s využitím trojčlenky vypočítá jaký objem základní suspenze je potřeba naředit kultivačním médiem pro vytvoření optimální vysévací suspenze. Před vlastním vysséváním se doporučuje suspenzi homogenizovat, protože buňky sedimentují ke dnu falkony, a následně rychle přepipetovat do jamek.

Detekce kaspasy 3 pomocí fluorescenčně značeného substrátu:

- princip

Metoda je založena na odštěpení fluorescenční sondy navázané na substrátu pro kaspasu 3[114]. Po odštěpení sondy dochází k signifikantnímu zvýšení intenzity její fluorescence. Intenzita fluorescence se následně detekuje za pomocí readru. Dále je nutné provést korekci pozadí, protože i navázaná sonda fluoreskuje. Měření je provedeno paralelně na dvou identických vzorcích, kdy v prvním případě je ke vzorku přidán pouze substrát a ve druhém případě substrát a příslušný inhibitor.

- vlastní provedení

Buňky se po intoxikaci xenobiotikem seškrábou do PBS a převedou do mikrozkumavek. Ty se následně zcentrifugují při 200 x g. Supernatant se odsaje a k sedlině se přidá 50 µl lyzačního pufru. Směs se jemně zhomogenizuje pipetováním. Po rozpuštění peletu se vzorky vloží na led a 10 minut inkubují. Poté se opět zcentrifugují při 15 000 x g a teplotě 4 ^{O}C po dobu 10 minut. K vlastnímu stanovení aktivity kaspasy 3 se odeberou 4 µl buněčného lyzátu a smíchají se s 80 µl reakčního pufru. Pro ošetření pozadí provádíme experiment v dubletu, a to ve dvojici se substrátem nebo substrátem a inhibitorem. Po 60 minutové inkubaci při 37 ^{O}C ve tmě se proměří fluorescence při parametrech 380 nm pro excitaci a 450 nm emisi.

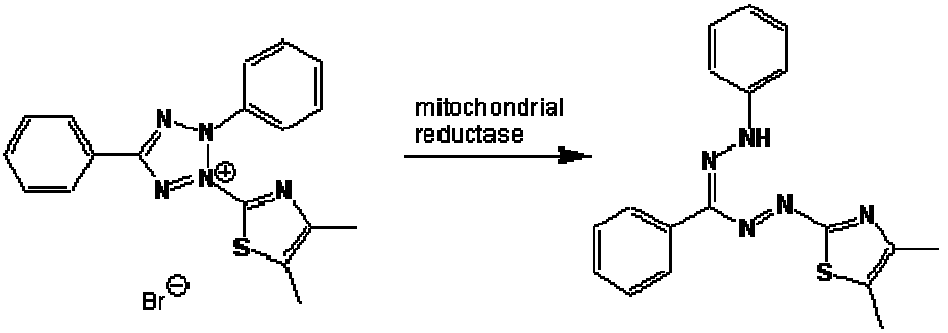
Výpočet:

Výsledná fluorescence přepočtena na obsah proteinu ve vzorku naměřeným stanovením celkového proteinu podle Bradfordové. Tím se získá specifická aktivita kaspasy 3. Tento krok částečně ošetřuje chybu způsobenou rozdílným počtem buněk v jednotlivých jamkách.

Detekce viability buněk pomocí MTT testu:

- princip

Metoda je založena na předpokladu, že MTT je redukováno na formazánové barvivo[115]. K této redukci může docházet pouze u živých a metabolicky aktivních buněk pomocí mitochondriálních dehydrogenáz, nicméně redukci mohou zprostředkovat i jiné oxidoreduktázy. U metody se mohou zřídka objevit falešně pozitivní data způsobená některými sloučeninami s redukčními vlastnostmi, které tuto přeměnu podporují.



Obr. 15: Redukce MTT.

Obrázek demonstruje redukci MTT na formazánové barvivo mitochondriálními reduktasami.
(Převzato http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mttscheme.png 24. 3. 2013)

- vlastní stanovení

Po inkubaci s xenobiotikem se buňky opatrně opláchnou PBS (odstranění média, mrtvých buněk, metabolitů a hlavně xenobiotik, které mohou znehodnotit měření), následně se do jamek přidá čerstvé médium smíchané s MTT v poměru 10:1. Následuje 1 – 2 hodinová inkubace při 37 ^{O}C. Po odsátí média se do jamek přidá roztok DMSO s 0,1% NH_3. Absorbance se měří při vlnové délce 540 nm. Výpočtem dle vzorce (1) byl určeno procentní zastoupení živých buněk (viabilita):

(1) $$MTT = 100\,x\left(\frac{vzorek - triton}{kontrola - triton}\right)$$

Kde vzorek je absorbance naměřená ve vzorku vystaveném působení xenobiotika, kontrola je absorbance naměřená na jamce obsahující pouze buňky a triton je absorbance změřená v jamce vystavené působení 10% tritonu TX-100.

Izolace celkové RNA pomocí trizolové metody:

- princip

Metoda využívá různé rozpustnosti RNA v systému thiokyanátu, fenolu a chloroformu. Při intenzivním třepání dojde kromě mísení fází také k vysrážení proteinů díky fenolu. Centrifugací se směs dokonale oddělí na dvě fáze, vodnou a chloroformovou a prstenec proteinů na jejich rozhraní. Vodná fáze obsahuje ribonukleové kyseliny, naopak chloroformová fáze obsahuje DNA. Během srážení isopropanolem s RNA koprecipitují i soli, které se odstraní promýváním s ledovým 75 % ethanolem[116, 117].

- vlastní stanovení

K peletu buněk se přidá 1 ml Trizol Reagens, následuje jemná homogenizace pipetováním až do rozpuštění. Následuje inkubace 5 minut při pokojové teplotě. Poté se ke směsi přidá chloroform (200 μl), vzorek se promíchá a 2 – 3 minuty inkubuje. Směs se ihned zcentrifuguje při 15 000 x g a teplotě 4 ^{O}C po dobu 15 minut. Do předem připravené čisté eppendorfky se převede horní vodná fáze a provede se precipitace přídavkem (500 μl) isopropanolu. Vzorek se opět promíchá obrácením eppendorfky (dokud nezmizí bílý prstenec). Po 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě se provede 10 minutová centrifugace při 15 000 x g a teplotě 4 ^{O}C. Dále je potřeba odebrat supernatant nad sedlinou. Jelikož se sedlina se odtrhává, je potřeba pracovat opatrně, aby nedošlo ke ztrátě vzorku nebo jeho části. Dále se pokračuje přídavkem (300 μl) vychlazeného 75% ethanolu. Opět se obsah eppendorfky promíchá obrácením. Následuje centrifugace při 7 500 x g, teplotě 4 ^{O}C, po dobu 5 minut. Roztok nad sedlinou se opatrně odstraní a sedlina se suší 10 minut na vzduchu. Přečištěná RNA se rozpustí podle potřeby v 10 – 50 μl ddH_2O. Přečištěná RNA se může skladovat při -80 ^{O}C pro pozdější použití.

Spektrofotometrické stanovení čistoty RNA:

Pro spektrofotometrické stanovení čistoty RNA byl využit Nanophotometer® P 300. Fotometr pracuje ve velmi malých objemech, což vede k velmi malým ztrátám vzorku (využívají se speciální kyvety). Samotný princip měření je stejný jako alternativní měření na klasickém spektrofotometru. Míra čistoty se stanovuje z poměru absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Čistota je hodnocena jako uspokojivá při hodnotách $A_{260/280} \geq 1,8$

Stanovení celkového proteinu pomocí metody podle Bradfordové:

- princip

Základem stanovení je kolorimetrická reakce činidla Bradfordové, jehož základem je barvivo Coomassie Brilliant blue G – 250. Toto barvivo se adsorbuje na molekuly proteinu a v jejich přítomnosti intenzivně modrá[118]. Metoda je destruktivní a vykazuje citlivost 1 mg/ml.

- vlastní postup

Před vlastním měřením se musí připravit kalibrační roztoky o různých koncentracích hovězího sérového albuminu. Jako slepý vzorek (blank) se použije fosfátový pufr. Vzorky proteinů je potřeba vhodně naředit, neboť při vyšších koncentracích dochází ke ztrátě linearity kalibrační křivky. Roztoky pro kalibrační křivku, fosfátový pufr a vzorky se přepipetují (7 µl) na mikrotitrační destičku (96 jamkovou desku). Do obsazených jamek se přidá 80 µl činidla Bradfordové. Po 5 minutové inkubaci při laboratorní teplotě se změří absorbance při vlnové délce 595 nm. S pomocí kalibrační křivky a vygenerované rovnice regrese se přepočítá naměřená absorbance na obsah proteinů [mg/ml].

Transfekce buněk HepG2 s využitím transfekčního reagens lipofectamin 2000

- princip

Cílem této metody je dostat do buňky plasmid (obsahující reporterový gen), který nám potvrdí nebo vyvrátí, zda testované látky aktivují receptor pro kyselinu retinovou. Reporterový gen je konstruovaný tak, že obsahuje na svém promotoru místo pro receptor kyseliny retinová a po navázání na promotor zahájí v transfekované buňce tvorbu luciferasy. Ta bude využita v další části pokusu k detekci aktivace receptoru.

Transfekce buněk se provede pomocí transfekčního činidla lipofectamin 2000 (obsahuje syntetická analoga fosfolipidů), což znamená, že se plasmid (reporterový gen) zabalí do lipidové částice (vytvoří se lipozom, který připomíná buněčnou membránu) s cílem neutralizovat negativní náboj DNA a vpravit tuto částici do buňky pomocí přirozeného děje – endocytózy. Následně částice uniká z endozomu a dostává se do jádra.

- vlastní provedení

Smíchá se 600 µl Opti-Mem s 15 µl lipofectaminu 2000, směs se jemně promíchá a inkubuje 5 minut při pokojové teplotě. V mezi čase se na dno nové zkumavky napipetuje 2,4 µg DNA (RARe-Luc a β-gal). Po uplynutí 5 minut se nakape směs lipofectaminu 2000 a

Opti-Mem opatrně na DNA a po promíchání se inkubuje dalších 15 minut. Následně ke směsi přidáme suspenzi buněk ($2x10^6$ buněk ve 12 ml kultivačního média), jemně promícháme a přepipetujeme na 24 jamkovou kultivační desku.

Chemiluminiscenční detekce aktivity luciferasy a galaktosidasy (dual-light system)

- princip

Metoda je založena na měření aktivity luciferasy a β-galaktosidasy, které jsou tvořeny v transfekovaných buňkách po aktivaci reporterových genů. Měří se pomocí enzymových reakcí se substráty produkujícími chemiluminiscenci. Pokus se provádí v jedné zkumavce. Nejprve se proměří reakce luciferasa – luciferin, kdy dochází k rychlému „vyhoření" substrátu. Následně se inkubuje 30 – 60 minut pro kumulaci produktu reakce β-galaktosidasy a Galacton-Plus. Poté je přídán Accelerator-II, který zháší zbytkový signál produktu luciferasy a iniciuje signál produktu β-galaktosidasy, díky změně pH a poskytnutí Sapphire-II jako zesilovače chemiluminiscence.

Měření aktivity luciferasy vypovídá o síle aktivace receptoru pro kyselinu retinovou a aktivita β-galaktosidasy nám podává informaci o úspěšnosti transfekce a životnosti testovaných buněk, protože β-gal je podléhá promotoru CMV. Je tedy exprimován za všech okolností stejně a dává nám jistý náhled na stav buněk před ukončením experimentu: čím méně β-gal, tím byla kultura více poškozena – tím větší má daná látka a koncentrace vyšší toxicitu.

- vlastní provedení

připravíme si lyzační pufr na potřebný počet jamek (2,6 ml lysis solution s 2,6 µl DTT pro jednu 24 jamkovou desku). Buňky opláchneme roztokem PBS a do každé jamky napipetujeme 110 µl připraveného lyzačního pufru. Následně buňky seškrábeme, přeneseme do čistých eppendorfek a centrifugujeme 2 minuty při 4500 rpm a pokojové teplotě. Pufry A a B nahřejeme na laboratorní teplotu a k pufru B přidáme substrát Galacton-Plus (2,6 ml pufru B s 2,6 µl Galacton-Plus substrátem pro jednu 24 jamkovou desku). Pro měření odebereme 10 µl buněčného lyzátu a přidáme k němu 25 µl pufru A. Do 10 minut přidáme 100 µl připraveného pufru B a po promíchání okamžitě proměříme chemiluminiscenci. Zkumavky inkubujeme 30 – 60 minut při pokojové teplotě a následně přidáme 100 µl Accelerator-II a po promíchání ihned měříme chemiluminiscenci.

miRNA arrays

- princip

Metoda vychází z vazby biotinem označené mikroRNA na sondy, které jsou pevně navázány (imobilizovány) na skleněném substrátu čipu. Následně se provede vazba biotin streptavidin-PE (konjugát streptavidinu s fluoreskující látkou). Vzniklý komplex je velmi pevný a obtížně se rozbíjí. Pokus je ukončen oskenováním desky pomocí excitace fluoroforu a následným změřením fluorescence. Výsledkem je intenzita fluorescence odpovídající relativnímu množství mikroRNA ve vzorku

- vlastní provedení

K vlastnímu pokusu se použijí vyizolované a přečištěné vzorky celkové RNA o známé koncentraci. Připravené vzorky se naředí tak, aby bylo v eppendorfce 1000 ng RNA v 8 µl. Přidají se 2 µl RNA kontrolních oligonukleotidů a na konci se k RNA přidá 5 µl polyA tailing master mixu. Po promíchání se vzorky vloží na 15 minut při 37^{O}C do termobloku a dochází k syntéze polyA konce. PolyA konec bude následně využit pro vazbu komplexu biotinu a 3DNA®, což je speciální struktura jedno a dvouvláknové DNA s navázaným biotinem, který slouží pro amplifikaci signálu.

Komponenta	množství [µl] 1 reakce
10 x reakční pufr	1,5
25 mM $MnCl_2$	1,5
zředěný ATP mix	1,0
PAP enzym	1,0

Tabulka 1: Složení polyA tailing master mixu

Po inkubaci se vzorky krátce centrifugují a dále se zpracovávají na ledu.
Ke vzorkům se přidají 4 µl 5x Flash Tag HSR Ligation mix a 2 µl T4 DNA Ligase.
Vzorky se šetrně promíchají, stočí a inkubují při pokojové teplotě 30 minut.
Ligace se zastaví přidáním 2,5 µl HSR Stop Solution. Následně se vzorek promícháa zcentrifuguje.

Hybridizační kontroly (Eucariotic hybridization controls) se rozmrazí a zahřejí na 65 ^{O}C po dobu 5 minut a ostatní chemikálie se vytemperují na pokojovou teplotu. Připraví se hybridizační koktejl, rozpipetuje se do eppendorfek (130 µl) s 21,5 µl vzorku. Směs se inkubuje při 99 ^{O}C po dobu 5 minut a následně 5 minut při 45 ^{O}C. Dále se nanese na čip v

objemu 130 µl. Po zalepení sept 0,5 palcovým tough-spotem, který zajišťuje snížení odparu a ochranu před protečením, se čipy vloží do hybridizační pece a inkubují se 16-18 hodin při 48 ^{O}C a 60 rpm.

Komponenta	množství [µl] 1 reakce
2x hybridizační mix	66
27,5% formamid	19,2
DMSO	12,8
20x hybridizační kontroly	6,6
kontrola oligo B2 3nM	2,2
voda	3,7
celkem	110,5

Tabulka 2: Složení hybridizačního koktejlu.

Po ukončení inkubace se odstraní septa a hybridizační koktejl. Následně se čipy naplní array holding pufrem a připraví se promývací stanice. Vlastní promývání se řídí podle protokolu uvedeného v tabulce 3.

promývací krok	činnost
post hybridizační promývání 1	10 cyklů s promývacím pufrem A při teplotě 30 ^{O}C
post hybridizační promývání 2	6 cyklů s promývacím pufrem B při teplotě 50 ^{O}C
barvení 1	barvení probe array 5 minut s stain kokteilem 1 při 35 ^{O}C
promívání	10 cyklů s promývacím pufrem A při teplotě 30 OC
barvení 2	barvení probe array 5 minut s stain kokteilem 2 při 35 ^{O}C
barvení 3	barvení probe array 5 minut s stain kokteilem 1 při 35 ^{O}C
finální promívání	15 cyklů s promývacím pufrem A při teplotě 35 ^{O}C
array holdink pufr	naplnění array holding pufre,

Tabulka 3: Procesy probíhající v promývací stanici.

V tuto chvíli je čip připraven na naskenování skenerem čipů.

Data byla následně převedena do formy pro další zpracování.

- delta F metoda

Jedná se o relativně jednoduchou metodu, ale vyžaduje, aby cílová i srovnávací mikroRNA měly stejnou efektivitu amplifikace. Důležitým prvkem metody je přitom srovnávací mikroRNA, která by měla vykazovat stabilní expresi ve všech vzorcích. V případě mikroRNA čipů jsme tuto metodu aplikovali na získané hodnoty fluorescence pro jednotlivé mikroRNA. V našem experimentu jsme jako srovnávací mikroRNA zvolili U105B, protože ve všech vzorcích vykazovala nejstabilnější expresi.

Výpočet normalizované hodnoty exprese byl proveden podle rovnic 2 a 3:

(2) $\Delta F = F_{int}$ **(cílová miRNA)** $- F_{int}$ **(U105B)**

(3) $\Delta\Delta F = \Delta F$ **(testovaný vzorek)** $- \Delta F$ **(kontrolní vzorek)**

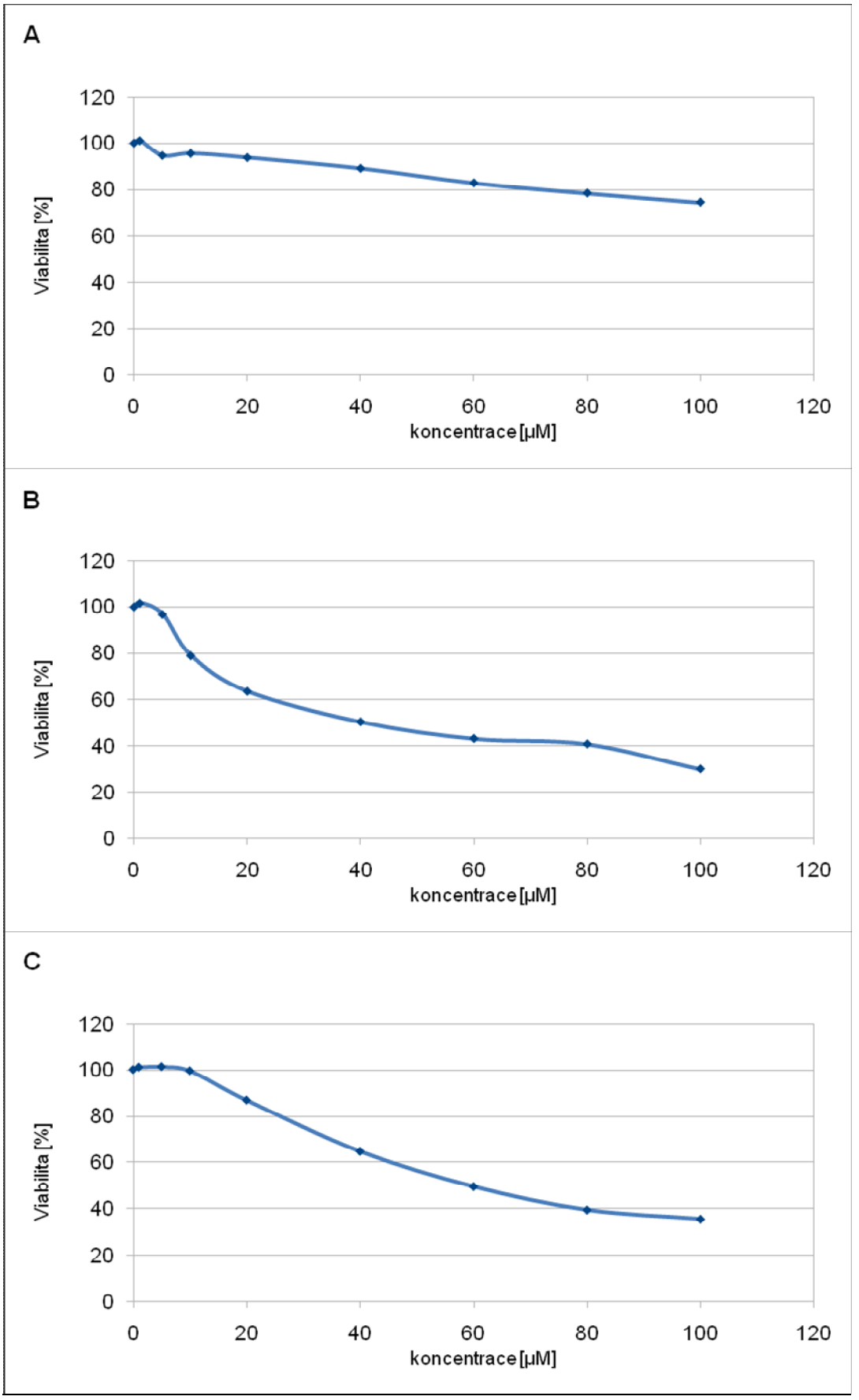
kde U105B je zvolená srovnávací miRNA a F_{int} jsou hodnoty naměřené fluorescence.

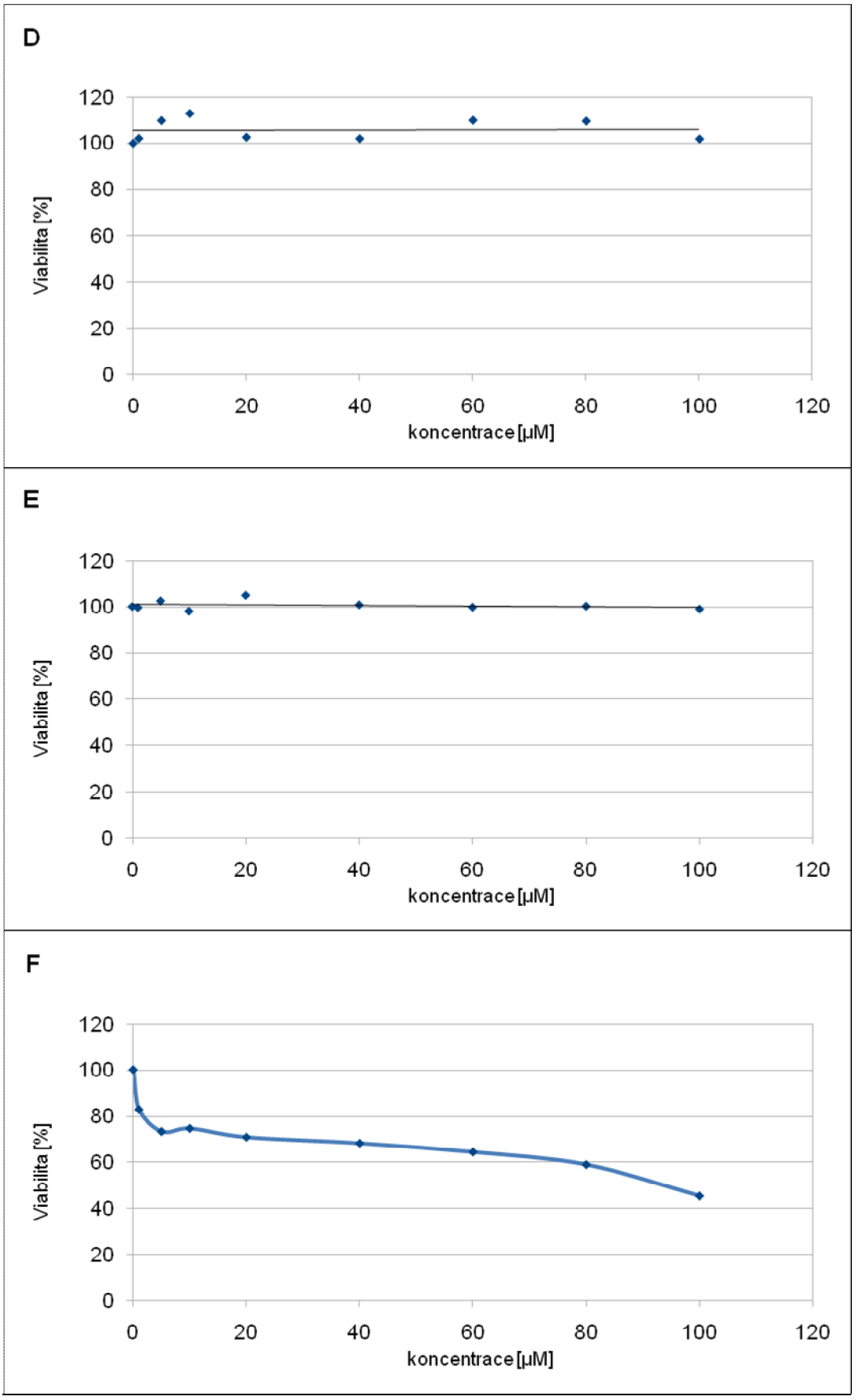
5. Výsledky

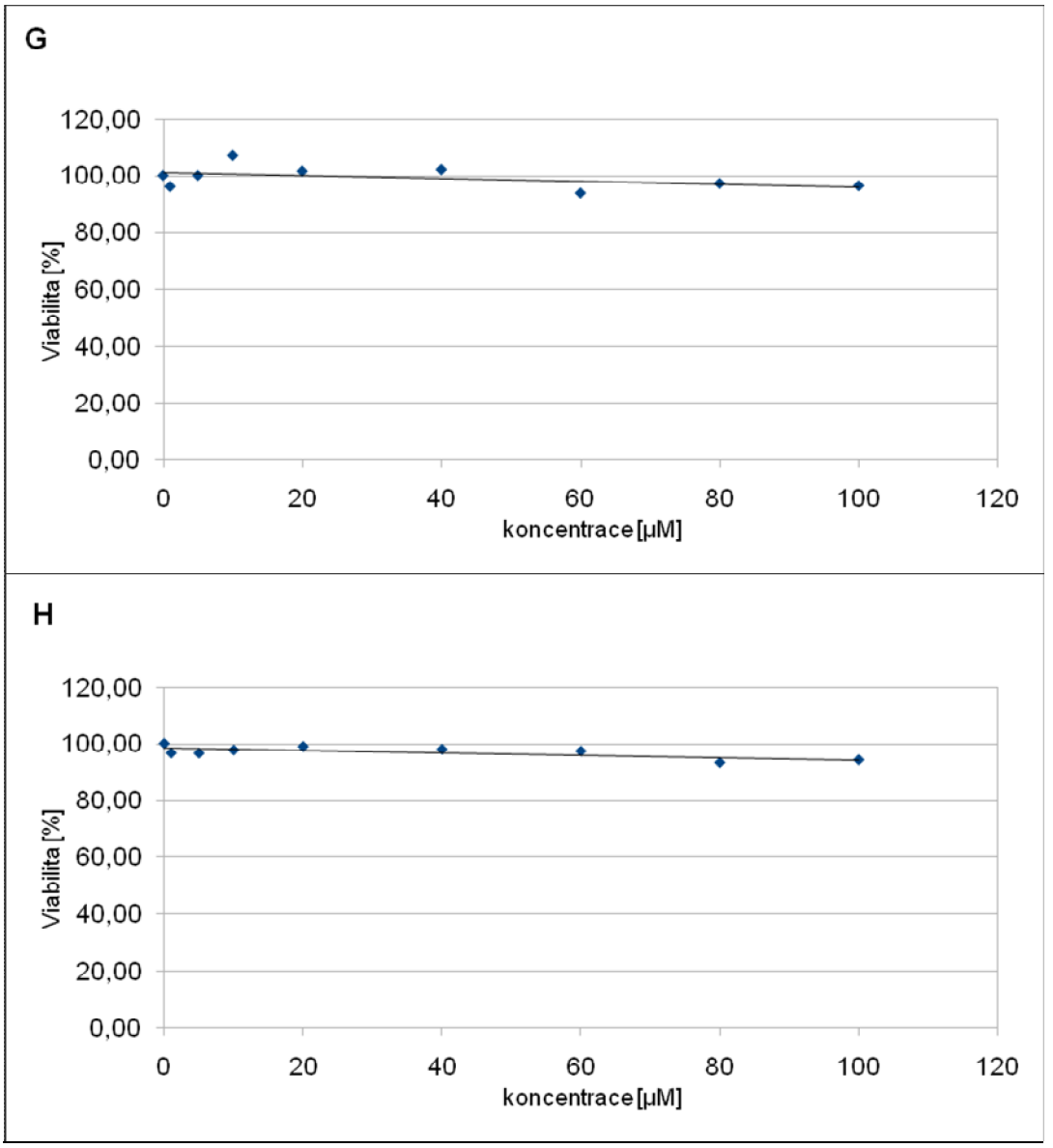
Na začátku experimentální části jsme prověřovali cytotoxicitu vybraných látek na buněčné linii HepG2, s cílem určit vhodnou koncentraci pro následné pokusy.

Pro zhodnocení cytotoxicity jsme se rozhodli použít MTT test, který nám poskytuje dostatečnou citlivost a relativní přesnost. Testovali jsme různé koncentrace s 24 hodinovou délkou intoxikace a následně jsme sledovali, jakou viabilitu buňky vykazovaly.

Většina z testovaných látek má antioxidační účinky, které také pravděpodobně způsobily nepatrný a však nezanedbatelný vzrůst viability nad hodnoty 100%. Antioxidační činnost xenobiotik může vést k významnému potlačení běžně vznikajících radikálů a snížení poškození buňky. Takto ošetřené buňky pak vynakládají na opravy spojení s radikály méně energie. Ušetřenou energii mohou vložit do růstu. S rostoucí koncentrací antioxidantu se však jeho vlastnosti mohou výrazně měnit. Ve vysokých koncentracích se často stává, že ochranné antioxidační vlastnosti se mění na pro-oxidační a produkce radikálů se zvyšuje. Pokud dojde k inverzi vlastnosti, pak kromě rostoucí toxicity xenobiotika, buňky nemalou měrou negativně ovlivní i zmíněná produkce radikálů. Výsledkem je prudce klesající viabilita. Pak můžeme pozorovat tzv. U efekt způsobený těmito vlastnostmi.


A
120
100
80
60
40
20
0
Viabilita [%]
0
20
40
60
80
100
120
koncentrace [µM]
B
120
100
80
60
40
20
0
Viabilita [%]
0
20
40
60
80
100
120
koncentrace [µM]
C
120
100
80
60
40
20
0
Viabilita [%]
0
20
40
60
80
100
120
koncentrace [µM]


D
Viabilita [%]
koncentrace [µM]
E
Viabilita [%]
koncentrace [µM]
F
Viabilita [%]
koncentrace [µM]



Obr. 16: Grafické vyjádření měření cytotoxicity pomocí MTT testu.
Buňky HepG2 byly inkubovány po dobu 24h s jednotlivými xenobiotiky a experiment byl prováděn na devadesáti šesti jamkových deskách. Jednotlivé panely vyjadřují vždy průměr tří nezávislých měření pro testovanou látku.
panel A – silybin, panel B – dehydrosilybin, panel C – kyselina gallová, panel D - kyselina vanillová, panel E – kyselina kávová, panel F – kyselina all trans retinová, panel G – kvercetin a panel H – taxifolin.

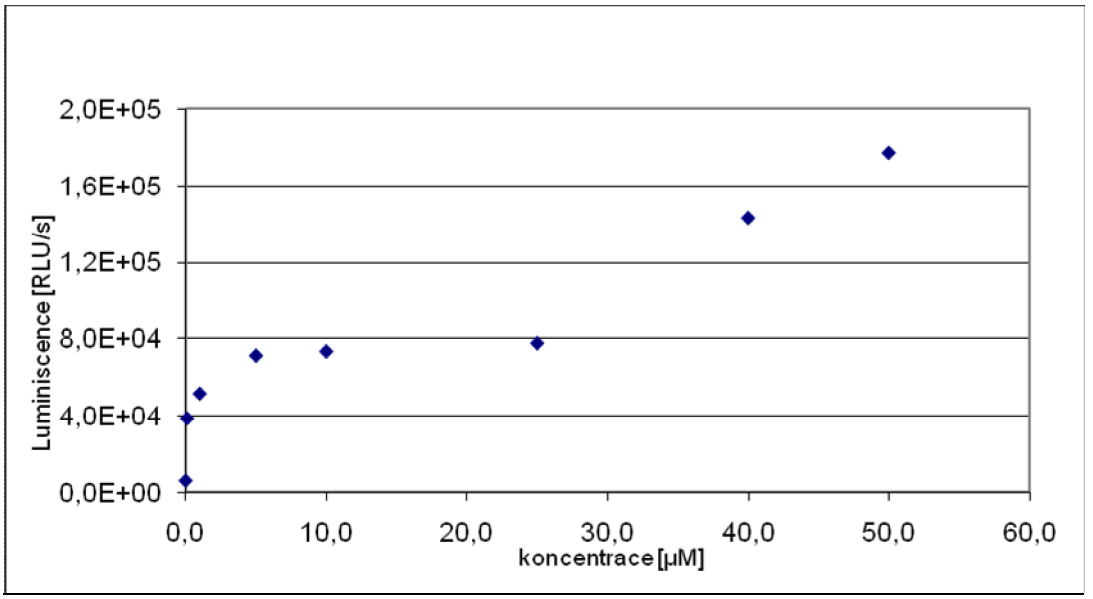
Silybin má sám o sobě hepatoprotektivní účinky a podle očekávání má relativně nízkou toxicitu pro HepG2.

Dehydrosilybin a následně i kyselina gallová vykazují mnohem vyšší toxicitu než silybin. Podobný efekt byl pozorovatelný i v experimentech s transfekovanou linií.

Kyselina retinová je vůči linii HepG2 relativně agresivní a se zvyšující se koncentrací lze sledovat rapidní pokles viability. Tento rozdíl v datech ve srovnání s předchozími látkami by se dal vysvětlit chybějícími antioxidačními vlastnostmi.

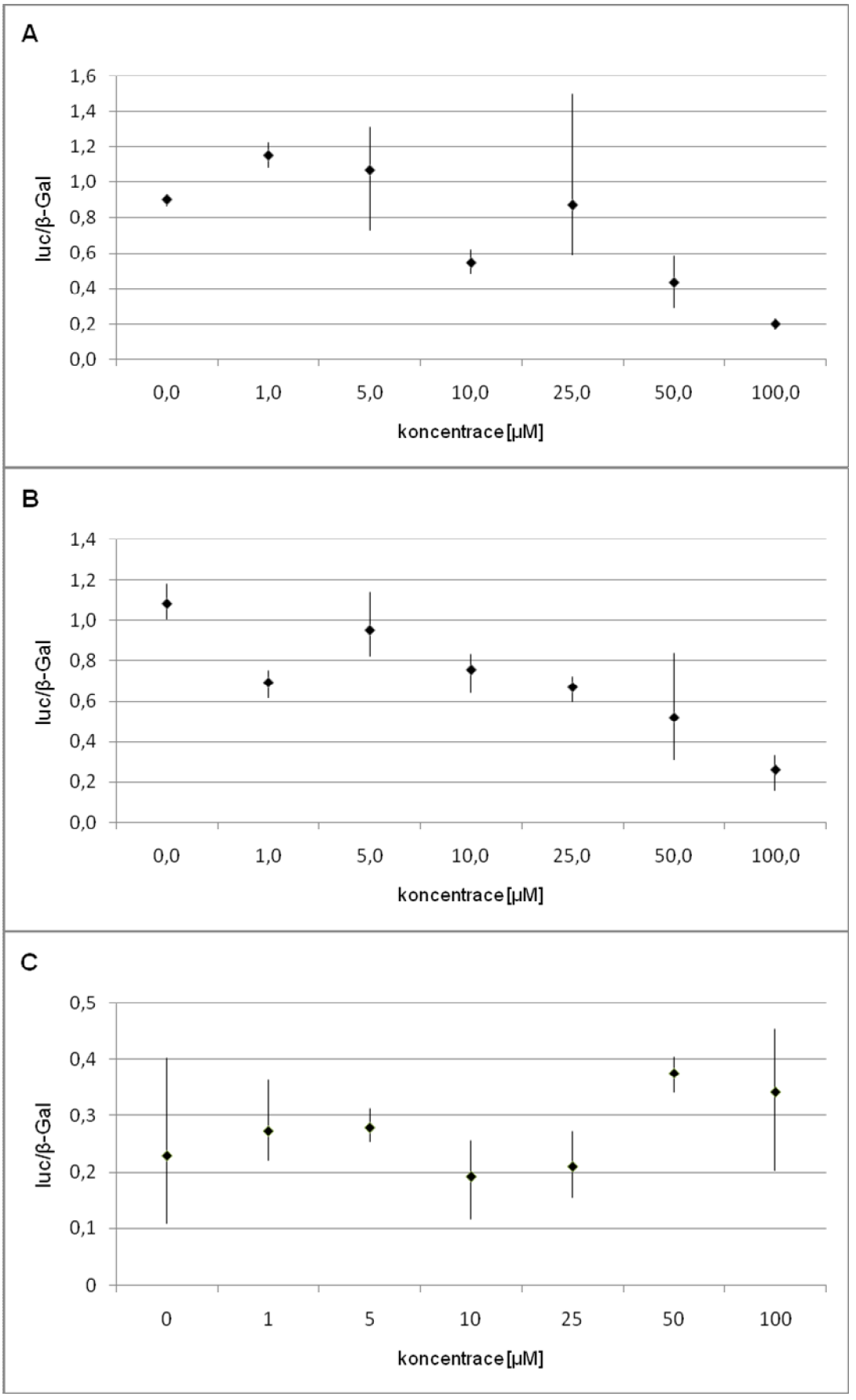
Pokud se podíváme na další testované látky, kterými byly kyselina vanillová, kyselina kávová, kvercetin a taxifolin, můžeme dojít k závěru, že jejich toxicita vůči zvolené buněčné linii je minimální.

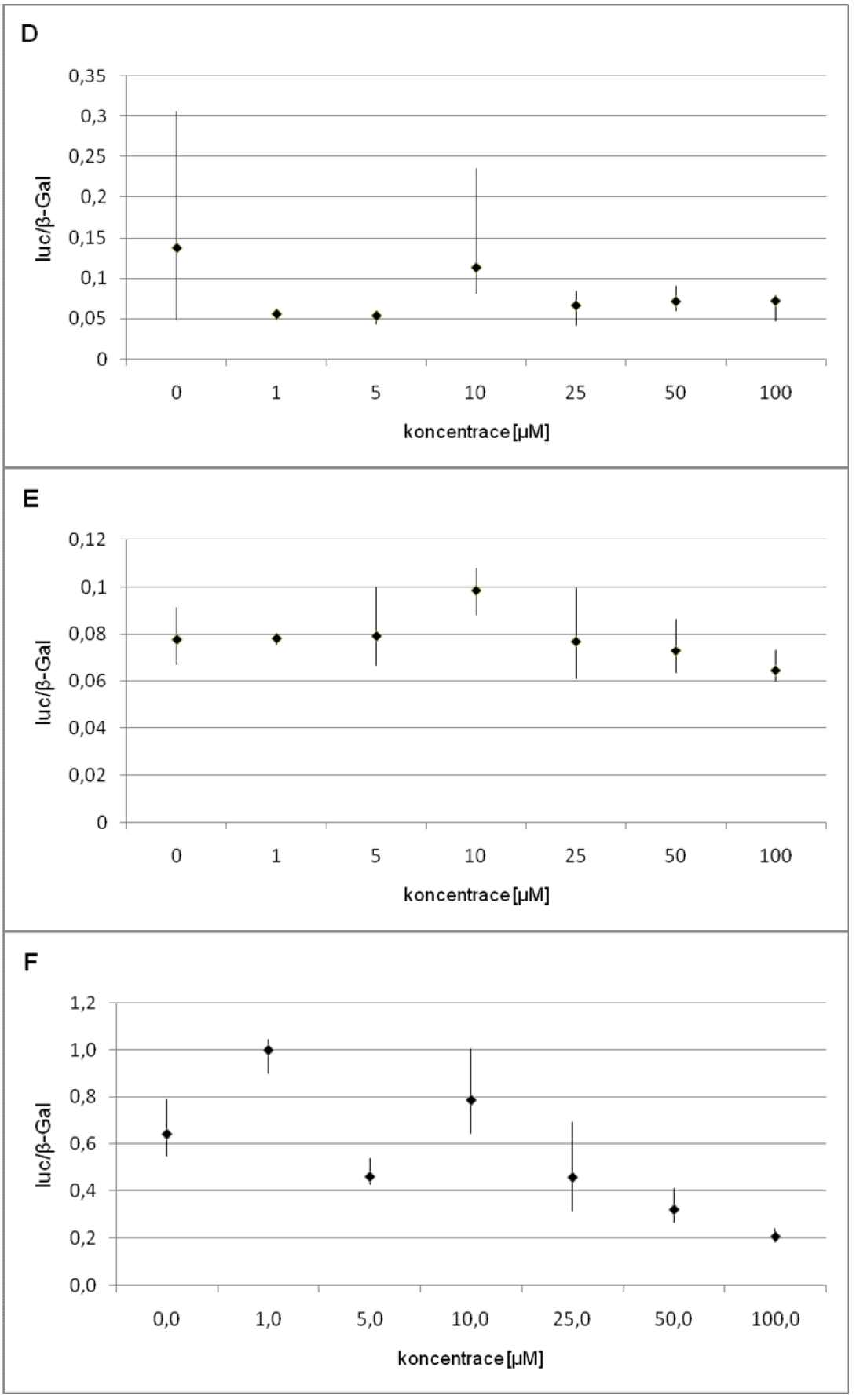
Protože jsme jako srovnávací látku zvolili ATRA, která ovlivňuje expresi genů známým mechanismem, pokračovali jsme sledováním aktivace receptoru pro kyselinu retinovou testovanými látkami. K tomuto účelu jsme využili reportérový plasmid, který obsahuje gen luciferasy pod transkripční kontrolou retinoidním receptorem. To znamená, že promotorová oblast genu luciferrasy obsahuje opakující se vazebnou sekvenci pro retinoidní receptor. Jako kontrolu transfekce jsme využili plasmid, který obsahuje gen β-galaktosidasy, který má v promotorové oblasti sekvenci pro CMV a dochází tedy ke stabilní expresi β-gal v transfekovaných buňkách. Pro detekci jsme zvolili metodu Dual-light system. Jedná se o komplexní metodu, pomocí které jsme schopní detekovat kromě aktivity luciferasy, také nepřímo množství buněk v jamce za pomoci β-galaktosidasy.

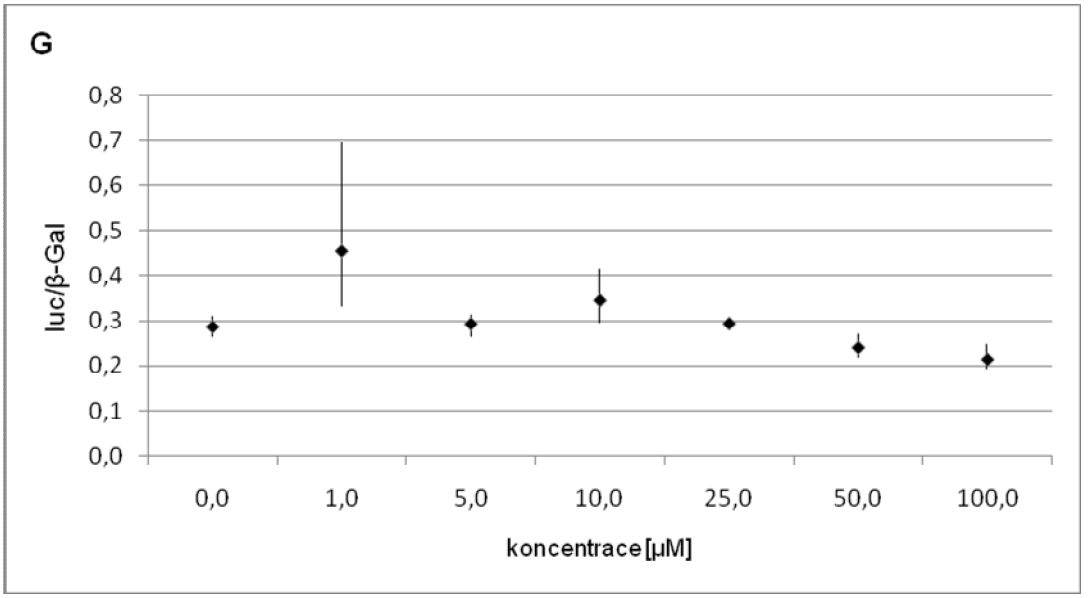


Obr. 17: Aktivace retinoidního receptoru kyselinou retinovou.
Buňky HepG2 byly inkubovány po dobu 24h s kyselinou retinovou o různých koncentracích. Experiment byl prováděn na dvaceti čtyř jamkových deskách. Panel vyjadřuje průměr tří nezávislých měření pro testovanou látku.

Kontrolní experimenty potvrdily, že protokol transfekce buněk HepG2 je funkční, protože docházelo ke zvyšování aktivity luciferrasy v závislosti na koncentraci ATRA (Obrázek 17).


A
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
luc/β-Gal
0,0
1,0
5,0
10,0
25,0
50,0
100,0
koncentrace [μM]
B
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
luc/β-Gal
0,0
1,0
5,0
10,0
25,0
50,0
100,0
koncentrace [μM]
C
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
luc/β-Gal
0
1
5
10
25
50
100
koncentrace [μM]


D
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
luc/β-Gal
0
1
5
10
25
50
100
koncentrace [μM]
E
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
luc/β-Gal
0
1
5
10
25
50
100
koncentrace [μM]
F
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
luc/β-Gal
0,0
1,0
5,0
10,0
25,0
50,0
100,0
koncentrace [μM]



Obr. 18: Aktivace retinoidního receptoru testovanými látkami.
Buňky HepG2 byly inkubovány po dobu 24h s jednotlivými xenobiotiky a experiment byl prováděn na dvaceti čtyř jamkových deskách. Jednotlivé panely vyjadřují vždy průměr tří nezávislých měření pro testovanou látku ve formě znaku ◆ . Různě dlouhé svislé čáry kolem těchto znaků znázorňují největší a nejmenší odchylky měření.
panel A – silybin, panel B – dehydrosilybin, panel C – kyselina gallová, panel D - kyselina vanillová, panel E – kyselina kávová, panel F – kvercetin a panel G – taxifolin.

Na obrázku 18 lze pozorovat, že ne všechny grafy mají podobnou počáteční hodnotu poměru luc/β-gal. Tento jev je pravděpodobně způsoben několika důvody.
Experimenty byly prováděny v delším časovém období a je pravděpodobné, že buňky jakožto živý organizmus se nemusí chovat pořád naprosto stejně. Na začátku experimentu byl pozorován pomalejší růst buněk, který se na změně poměru mohl částečně podílet.
Další pravděpodobný vliv na poměr měl i fakt, že jsme během experimentu spotřebovali nejméně dvě šarže plazmidu β-gal. Jednotlivé šarže se mohou lišit čistotou či množstvím poškozených (linearizovaných) plasmidů. Tím lze vysvětlit, že po použití nové šarže došlo k pozorovanému výraznějšímu vzrůstu hodnoty β-gal (čistší, nepoškozené plasmidy), což se projevilo ve výsledném poklesu poměru.

Žádná z testovaných látek nevykazovala aktivaci retinoidního receptoru závislou na koncentraci. Naopak pokles aktivity luciferasy patrný například u dehydrosilybinu můžeme interpretovat jako toxicitu dané látky.

Další serie experimentů měla za cíl prozkoumat vliv testovaných látek na aktivaci kaspasy 3. Tyto experimenty byly dalším podkladem pro zvolení vhodné koncentrace

testovaných látek pro testování na mikroRNA čipech. S ohledem na předchozí experimenty testující toxicitu látek s využitím MTT, jsme Buněčnou linii HepG2 vystavili koncentracím 1 μM, 5 μM a 10 μM. Aktivita kaspasy 3 nám vypovídá o aktivaci apoptotických procesů ve sledovaných buňkách a tedy i jistou měrou o jejich stavu.

Kaspasa 3 [F_{int}/mg proteinu]				
koncentrace [μM]	Vzorky			
	ATRA	kys. vanillová	kys. gallová	kys. kávová
0	1082,65	1145,54	994,41	1074,20
1	1054,29	889,80	1293,61	2663,44
5	808,90	698,44	1020,92	2661,31
10	938,21	1761,10	362,90	2166,49

Kaspasa 3 [F_{int}/mg proteinu]				
koncentrace [μM]	Vzorky			
	silybin	dehydrosilybin	kvercetin	taxifolin
0	1040,51	1051,81	1051,81	1051,81
1	1184,52	1624,36	840,12	2706,00
5	1088,57	1469,51	795,45	2168,60
10	406,86	1161,82	-986,13	761,83

Tabulky č. 4 a 5: Vliv testovaných látek na aktivitu kaspasy 3 v buněčné linii HepG2. Průměrné hodnoty poměrů intenzity fluorescence naměřené při stanovování aktivity kaspasy 3 a proteinů (Bradford). Doba inkubace byla u všech vzorků 24 hodin. Experiment byl prováděn na dvaceti čtyř jamkové desce. Použité hodnoty fluorescence jsou rozdílem hodnot naměřených v přítomnosti substrátu - hodnoty v přítomnosti substrátu s inhibitorem. F_{int} = intenzita fluorescence.

Při rozhodování jsme se řídili ještě jedním nezanedbatelným faktorem. Jednalo se o hodnoty přibližně dosažitelné v krevní plazmě. Běžně se u polyfenolů dosahují hodnoty od několika desítek nM až do 7,6 μM[3, 26]. Proto jsme výběr koncentrací zúžili na hodnoty 1 μM, 5 μM a 10 μM. Z nich vyšla při zhodnocení všech testovaných parametrů nejlépe 1 μM.

Po provedení vlastního pokusu na mikroRNA čipech jsme pokračovali zpracováním dat, následně jejich analýzou a srovnáním s jinými studiemi a pokusy.

V první řadě bychom měli začít obecným zhodnocením. Níže uvedená tabulka obsahuje všeobecné zhodnocení snížení nebo zvýšení exprese mikroRNA testovanými látkami.

Souhrnná data o počtu zvýšené nebo snížené exprese lidských mikroRNA						
změna exprese miRNA		větší než 2,0	1,5 - 2,0	1,0 - 1,5	0,5 - 1,0	menší než 0,5
xenobiotikum	ATRA	14	96	860	753	10
	kyselina vanillová	8	73	698	940	14
	kyselina gallová	59	148	577	915	34
	kyselina kávová	14	74	727	903	15
	silybin	63	128	729	784	29
	dehydrosilybin	17	85	775	842	14
	kvercetin	20	114	832	753	14
	taxifolin	15	112	953	642	11

Tabulka 6: Souhrnná data o počtu zvýšené nebo snížené exprese lidských mikroRNA v pokusu. Čísla uvedená v tabulce jsou počty mikroRNA, u kterých byla zaznamenána změna exprese v porovnání s kontrolním vzorkem a v uvedených rozsazích.

Při dalším hodnocení array čipů jsme se zaměřili hlavně na mikroRNA s číselným označením nejvýše tříciferným. Jelikož o mikroRNA s čtyřciferným označením není tolik informací a mnohdy jsou pouze popsány a udávají se u nich jen počítačově predikované cíle, nebudeme se jim dále podrobněji věnovat.

Kyselina retinová

mikroRNA se zvýšenou expresí

Z výsledků získaných pomocí Dual-light systemu pro kyselinu retinovou můžeme uvažovat, že změny v expresi různých mikroRNA jsou zprostředkovány s velkou pravděpodobností přes retinoidní receptor. U něj jsme potvrdili aktivaci závislou na koncentraci kyseliny retinové. Jako první jsme se zaměřili na mikroRNA s expresí dvojnásobnou a vyšší oproti kontrole. Zde figurovaly například miR-29c, miR-95, miR-138-2, miR-190b, miR-301b, miR-431 a miR-612. Tyto zástupce si můžeme dovolit označit jako silně ovlivněné kyselinou retinovou.

miR-29c

Při podrobnější analýze dat získaných z čipů se miR-29c ukázala jako silně ovlivněná (dvojnásobný nárůst). Zmiňovaná mikroRNA hraje důležitou roli v regulaci apoptosy v buňce. Například přes antiapoptotický protein Mcl-1, který je označován jako cíl miR-29 u buněk karcinomu jater nebo K562. p53 je další protein ovlivněný touto mikroRNA. Zde však dochází k pozitivní regulaci zaměřením se na p85a a cdc42, označované jako inhibitory p53. Může tedy vystupovat „jako mikroRNA s nádorově supresorickými vlastnostmi“[119]. Dále se

také zapojuje do epigenetického ovlivnění buněk. A právě u karcinomu jater bylo pozorováno ovlivnění methylace DNA díky cílení miR-29 na DNA methyltransferasu.

miR-95

O miR-95 a kyselině retinové ve vztahu ke karcinomu jater nejsou žádné informace dostupné, ale pokusili jsme se alespoň nalézt informace o vlastnostech této mikroRNA detekovaných na různých liniích. U buněčné linie HeLa byl s antisense inhibicí miR-95 pozorován pokles buněčného růstu[120]. Další data týkající se změny exprese miR-95 byla získána u buněk karcinomu kolorekta, kde dochází oproti normálním buňkám ke zvýšení exprese. A stejně jako u HeLa buněk, i u karcinomu kolorekta dochází s antisence inhibicí ke snížení buněčného růstu. Zvýšení exprese bylo ještě pozorovánu u karcinomu plic a slinivky břišní[121]. Validovaný cíl miR-95 je mRNA proteinu nexin-1[121, 122].

miR-138-2

Další velký rozdíl byl pozorován u miR-138-2 (2,33x). miR-138 ovlivňuje expresi cyklinu D3 u jaterního karcinomu. K ovlivnění dochází vazbou na 3´UTR oblast příslušné mRNA, která je kódována genem CCND3[123, 124]. Při zvýšení exprese miR138 dochází k indukci zastavení buněčného cyklu a naopak za inhibice dochází ke zvýšení viability HepG2. Zmiňované vlastnosti byly pozorovány i u myší (xenograft nude mice model), kde zvýšení miR-138 také inhibuje růst nádoru. Cyklin D3 podporuje progresi buněčného cyklu a u jaterního karcinomu může figurovat jako onkogen[123, 124].

miR-190b a miR-301b

Při hodnocení našich dat jsme narazili také na zvýšenou expresi miR-190b a miR-301b. Jako validovaný cíl pro miR-301b je označován gen DNMT1 kódující enzym DNA (cytosin-5)-methyltransferasu[125].

Její změna byla pozorována v publikaci Jianga et. al. u karcinomu jater (vyvinutého z cirhotických jater s hepatitidou) v porovnání se vzorky zdravých dárců, kde docházelo též k jejímu zvýšení. [126] Autoři také navrhují, že pozorované zvýšení exprese některých mikroRNA (včetně miR-301) může být u takových vzorků jako obecná odpověď na stres vyvolaný kombinací hepatitidy a cirhózy.

Podobné data byly pozorovány i u rakovinných cholangiocytů. Tyto nádory jsou asociovány s chronickým zánětem, jehož výsledkem je nadprodukce IL-6. Jeho zesílená exprese vede k zvýšené tvorbě DNMT-1. Následkem je genomická metylace (a související epigenetická modulace různých genů). U tohoto typu buněk byla pozorována snížená exprese miR-301 (chromozomální aberace nebo deregulace pomocí metylace). Zvýšená tvorba DNMT-1 je spojována se špatnou prognózou[127].

Pokud se podíváme na miR-301 obecně, dochází k výšení exprese i u rakovinných buněk prostaty (rakovinných kmenových/progenitorových). Dále lze z literatury vyčíst, že její účinek je závislý na typu buňky, ve kterých je exprimovaná. Například u buněk karcinomu prostaty DU145 ($CD44^+$ i $CD44^-$) jakákoli změna hodnoty exprese nepůsobí na růst nádoru, naopak u LAPC9 se razantním snížením exprese inhibují klonogenní vlastnosti[128].

U karcinomu prsu vede nárůst exprese miR-301 ke zvýšení jeho proliferace, migrace a invazivity[129].

miR-612

miR-612 hraje důležitou roli v inhibici proliferace, migrace, invazivity a metastazování u HCC. A v našem experimentu vykazovala více než dvojnásobné zvýšení exprese. Jejím validovaným cílem je protein AKT2 (serin/treonin protein kinasa)[130].

Se sníženou expresí

Následně jsme pokračovali hodnocením dat miRNA s dvojnásobně sníženou expresí oproti kontrole. Zde jsme zaznamenali miR-199a-5p, miR-623, miR-891b a miR-892a. Jedná se tedy opět o zástupce výrazně ovlivněné kyselinou retinovou.

miR-199a-5p a miR-214

S výrazně sníženou expresí vystupovala miR-199a-5p. Výrazné snížení exprese u HepG2 proti normálním jaterním buňkám pozorovali Duan et. al., Wang et. al. a Shen et. al[131, 124, 132]. Jeden z možných důležitých mechanizmů vyvolávající snížení exprese byl označen stres endoplazmatického retikula a s ním související signální dráha označovaná jako unfolded protein response (jako odpověď na hromadění nesložených proteinů). Jako další negativní regulátor klastru miR199a-5p/214 se zdá být NFκB. Její pokles také výrazně koreluje s

přežíváním pacientů, a jeví se jako potenciální marker pro predikci progrese u pacientů. Kromě snížení exprese miR-199a-5p také pozorovali snížení miR-214, které jsme v našem pokusu též zaznamenali stejně jako u Duan et. al. snížení nebylo tak výrazné jako u miR199a-5p. Podobně pak i naše data potvrzují, že miR-199a-5p a miR-214 jsou transkribovány jako klastr. Z informací získaných z čipů se ukazuje, že kyselina retinová dále prohlubuje snížení exprese miR-199a-5p a miR-214 u buněk HepG2[131].

Toto prohloubení miR-199a-5p nebylo pozorováno jen u kyseliny retinové, ale i dalších námi testovaných látek. Jmenovitě u kyseliny vanillové, kyseliny gallové, dehydrosilybinu a kvercetinu. Naopak miR-214 u těchto látek ovlivnění prakticky nevykazovala.

Snížení exprese miR-199a/miR-214 jako klastru u HCC pozorovali při svých experimentech i Jiang et al.[126] K podobným výsledkům došli vědci i u CD44+ nádorových buněk prostaty. Další cíle miR-199a jsou c-MET, versican, PAK4, Brm, mTOR, a AKT[128].

Pravděpodobný cíl miR-214 je transkript mRNA proteinu XBP-1 (hlavní transkripční regulátor UPR). Mimo jiné se ukázalo, že dodání externí mikroRNA snižuje proliferaci a zvyšuje počet apoptotických buněk karcinomu jater[131]. Kdežto pravděpodobný cíl miR-199a-5p je tyrosin kinasa DDR1, která pravděpodobně zapojena do signální dráhy související s buněčnou invazivitou a její zvýšení je u karcinomu jater spojováno s pokročilými stádii[132].

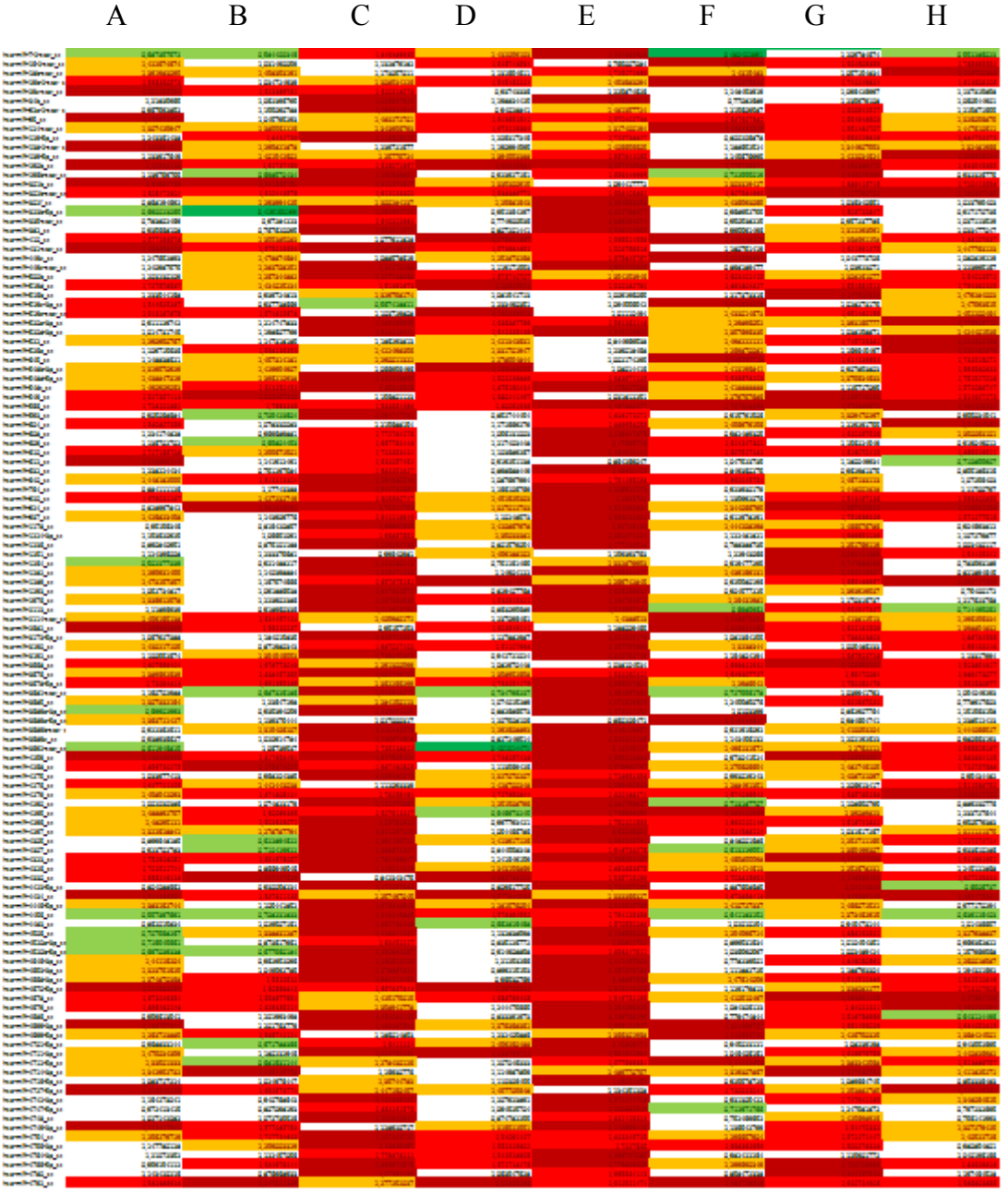
miR-623 a miR-891b

V literatuře však nejsou zmiňovány ve spojení s jaterním karcinomem. Nicméně jejich signifikantní změny mohou být pozorovány u jiných nádorových onemocnění.

Pokud se zaměříme na miR-623, můžeme si všimnout několika článku zabývajícího se do jisté míry touto problematikou. Zde se objevila zmínka ve spojení s orální leukoplakií. Jedná se o bílé slizniční změny v dutině ústní, které mají premaligní charakter. Při srovnání tkáňových vzorků orální leukoplakie a tkáňových vzorků orální leukoplakie po maligní transformaci byla detekována snížená exprese miR-623 u maligně transformovaných vzorků[133].

miR-891b byla také zmiňována v literatuře, nicméně ne s rakovinným onemocněním, ale s její schopností kontroly genové exprese v různých segmentech nadvarlete. Kdy miR-891b vykazovala v segmentech *corpus* (tělo) a *clauda* (ocas) podstatně vyšší expresi oproti segmentu *caput* (hlava)[134].

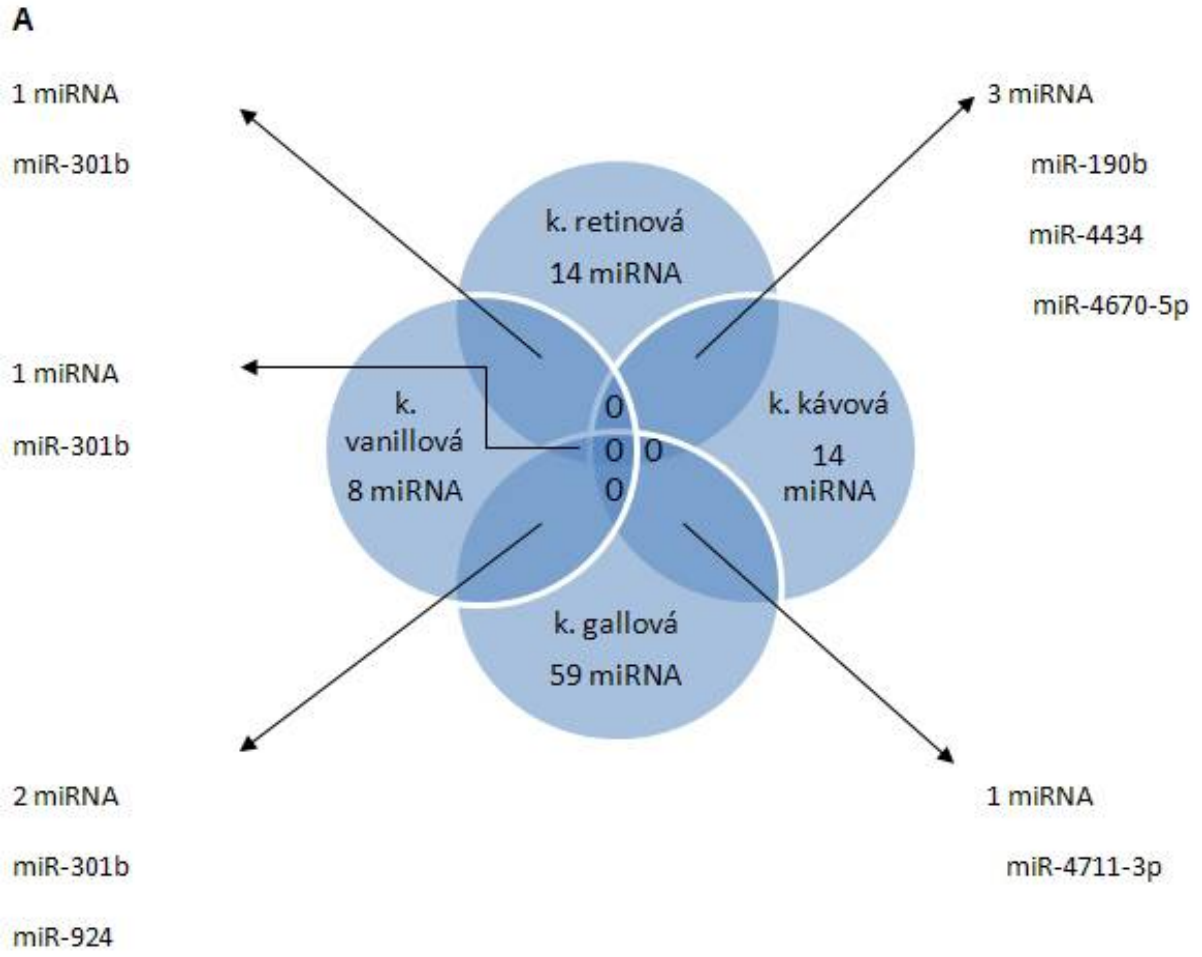
Pokud se podíváme na výsledky souhrnně, můžeme porovnávat vlastnosti jednotlivých látek globálně. Zda jsou si podobné v ovlivňování mikroRNA nebo naopak nemají nic společného. Pro toto porovnání jsme si vytvořili menší tabulku s barevným odlišením změny exprese vybraných mikroRNA. Ty byly vybrány na základě jejího minimálně dvojnásobného zvýšení exprese, alespoň u jedné z testovaných látek (A-H).



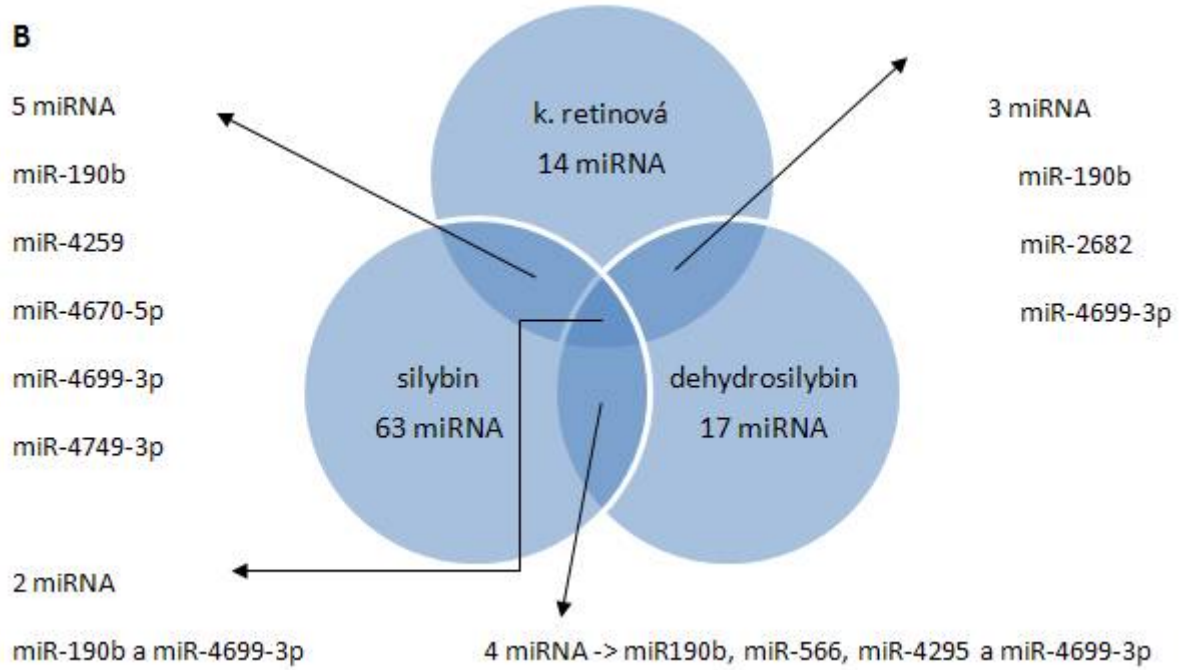
Tabulka č. 7: Srovnání změn exprese mikroRNA testovanými látkami.
V tabulce jsou uvedeny hodnoty ΔΔF poměrů vypočítané z naměřených dat při stanovování mikroRNA čipů Affymatrix Znázorněné mikroRNA jsou ty, které vykazovaly největší ovlivnění alespoň jednou z testovaných látek. Jednotlivé hodnoty vyjadřují vždy průměr tří nezávislých měření pro testovanou látku. Jednotlivé barvy vyjadřují x-násobnou změnu exprese dané mikroRNA ≥ 2,0, 1,5-2,0, 1,25-1,5, 0,5, ≤ 0,5 a bílá barva pro 0,75-1,25.
Sloupec A – kyselina retinová, B – kyselina vanillová, C – kyselina gallová, D – kyselina kávová, E – silybin, F – dehydrosilybin, G – kvercetin a H – taxifolin.

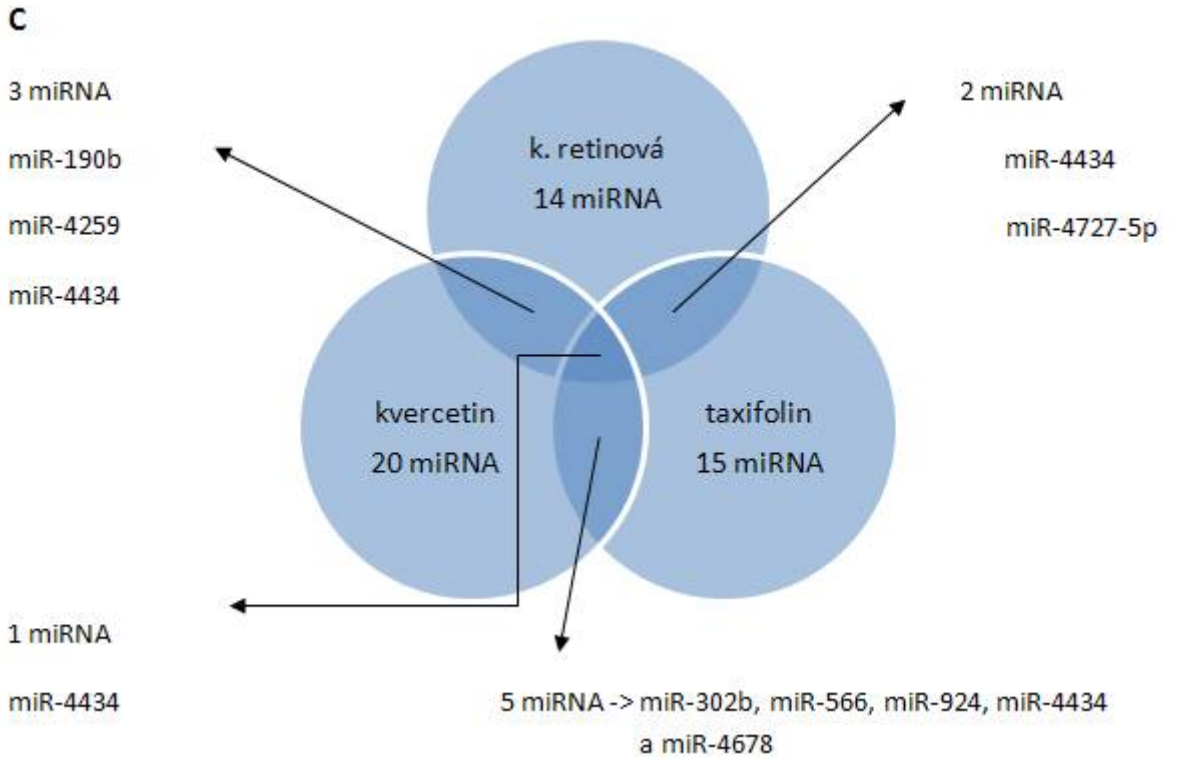
Z tabulky je patrné, že kyselina gallová a silybin jsou si v ovlivňování exprese velice podobné a je jistá pravděpodobnost, že tyto změny vyvolávají působením na stejné signální dráhy. Drobnou podobnost lze pozorovat i přes celé spektrum testovaných látek a to pouze u miR-190b, miR-302b, miR519d, miR-566, miR-3678-5p, miR-4678 a miR-4792

Následně jsme se zaměřili na podobnost exprese mikroRNA mezi kyselinou retinovou a jednotlivými skupinami látek (fenolické kyseliny, flavonoidy a lignany)



A poslední možnost, kterou diagram nedokáže zahrnout je podobnost exprese mezi kyselinou retinovou a gallovou. 4 mikroRNA ⟶ miR-301b, miR-431, miR-4259 a miR-4699-3p.





Obr. 19: 3 grafická vyjádření podobnosti exprese mikroRNA (zvýšené ≥ 2x) mezi jednotlivými skupinami látek.
Panel A vyjadřuje podobnosti v expresi mikroRNA mezi kyselinou retinovou, vanillovou, gallovou a kávovou.
Panel B vyjadřuje podobnosti v expresi mikroRNA mezi kyselinou retinovou, silybinem a dehydrosilybinem.
Panel C vyjadřuje podobnosti v expresi mikroRNA mezi kyselinou retinovou, kvercetinem a taxifolinem.

6. Diskuze a závěr

MikroRNA jsou krátké nekódující molekuly RNA se schopností regulovat expresi proteinů na post-transkripční úrovni. Jedná se o jeden z důvodů, proč mohou plnit roli protoonkogenů nebo naopak vystupovat jako protektivní (supresory). Z toho vyplývá, že jejich ovlivnění může přispívat k tvorbě nádorů nebo tento děj brzdit. Důležitý byl také objev, že exprese mikroRNA je ovlivnitelná xenobiotiky, což způsobilo velký zájem o testování různorodých látek na tuto aktivitu.

V našich experimentech jsme se zaměřili na testování přírodních látek, které jsou relativně hojně zastoupeny v našem jídelníčku, tj. v běžně konzumovaných pokrmech, pochutinách a nápojích. Běžné zastoupení v dietě by mohlo vést k zajištění dostatečně velké koncentrace v krvi pro ovlivnění exprese mikroRNA. Tato xenobiotika mají obvykle kladný vliv na lidský organizmus a velice nízkou toxicitu. Naše hypotéza se zaměřila právě na tyto kladné působky a jistou možnost podílu modulace exprese mikroRNA na jejich protektivních účincích.

V souvislosti s možným ovlivněním exprese mikroRNA je potřeba vzít v úvahu možnou, byť minimální, toxicitu testovaných xenobiotik. Dalším dějem, který zřejmě může proběhnout i přes možné posuny v expresi mikroRNA, je apoptosa. Apoptosa v podobě zvýšené aktivity kaspasy 3 může být vyvolána testovanými xenobiotiky. V našem případě jsme pozorovali u některých testovaných látek cytotoxicitu a stejně tak aktivaci kaspasy 3. Vše však při koncentracích, které převyšují koncentraci dosažitelnou v krvi a plasmě po konzumaci potravin či nápojů obsahujících testované látky. Běžně nepřesáhnou koncentrace biologicky aktivních přírodních látek v krvi 1 μM.

Dalším důležitým faktorem je možná interakce testovaných xenobiotik s jadernými receptory, které jsou odpovědné za genovou transkripci. Protože takovýchto receptorů je celá řada a nemusí nutně ovlivňovat expresi mikroRNA, rozhodli jsme se pro použití all-trans retinové kyseliny jako srovnávací látky. Zde je velkou výhodou známý a velmi dobře popsaný mechanismus aktivace retinoidního receptoru kyselinou retinovou. Hypotéza zněla, že v případě velké podobnosti ovlivnění exprese určitých mikroRNA kyselinou retinovou a některou z testovaných látek, by mohla znalost ovlivnění transkripční aktivity retinoidního receptoru touto látkou napomoci k vysvětlení jejích účinků. Naše experimenty však neprokázaly aktivaci transkripční aktivity retinoidního receptoru žádnou z testovaných látek.

Jako nejvhodnější koncentraci pro testování sledovaných látek na mikroRNA čipech

jsme zvolili 1 μM. Je to hodnota reálně dosažitelná v séru, vykazující velice nízkou toxicitu nebo dokonce zvýšenou proliferaci pravděpodobně způsobenou svými protektivními (antioxidačními) účinky a i relativní hodnoty apoptosou zasažených buněk nejsou výrazné.

Během analýzy dat miRNA array čipů jsme zaregistrovali více než 2x zvýšenou expresi miRNA miR-190b a miR-301b, jež byly podobně modulovány v jednotlivých skupinách xenobiotik ve srovnání s kyselinou retinovou (viz. Vennovy diagramy). Obě mikroRNA jsou spojovány s kancerogenezí, je proto otázkou, jestli zvýšení jejich exprese může napomoci k dovysvětlení mnohdy pleiotroních biologických účinků námi testovaných látek.

Co je však zajímavým poznatkem, je velká podobnost mezi mikroRNA ovliněnými kyselinou gallovou a silybinem. Galloylsilybinové deriváty totiž vykazují antiangiogenní účinky[135]. A není zcela nesmyslné uvažovat o možnosti metabolismu těchto derivátů hydrolýzou na samostatný gallát a silybin. Obě látky by pak mohly působit synergicky na některé z mikroRNA. Mechanismus jejich účinku na modulaci exprese však není jasný. Naše data vyvrátila možnost retinoidního receptoru, celá řada dalších receptorů však ovlivněna být může. Kromě jaderných receptorů však obě látky mohou ovlivňovat signální dráhy vedoucí ke změnám v genové expresi například ovlivněním adenylát cyklasy s navýšením cAMP.

Naše data poukazují na absenci společných cílových mikroRNA v rámci skupin strukturně podobných látek. Ale ani funkční podobnost, např. významné antioxidační schopnosti, neznamenají ovlivnění stejných nebo hodně podobných mikroRNA. Naopak, přes celkově podobný a mnohdy ne úplně specifikovatelný pozitivní účinek, zřejmě každá z testovaných látek dokáže působit na velmi odlišné cíle a signální dráhy.

Závěrem konstatujeme, že na základě zjištěných dat je pravděpodobné, že zvolená xenobiotika mohou mít dlouhodobý vliv na modulaci exprese některých mikroRNA z důvodu dostupnosti v dietě. Dále data z literatury naznačují vliv některých modulovaných mikroRNA na buněčné pochody působící v důležitých buněčných dějích jako je miR-301b, která ovlivňuje epigenetický stav buňky svou modulací DNA methyltransferasy 1.

7. Seznam použitých zkratek

DMSO – dimethylsulfoxid

PBS – fosfátový pufr

IC_{50} – koncentrace látky vyvolávající 50 % účinek

LD_{50} – koncentrace látky vyvolávající 50 % úmrtnost testovaných subjektů.

LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou

HDL – lipoproteiny s vysokou hustotou

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

ROS – reaktivní formy kyslíku

APO E – Apolipoprotein E

miR – mikroRNA

RBP – retinol vázající protein

CYP – cytochrom P450

NO – oxid dusnatý

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

COX – cyklooxygenasa

ATP – adenosintrifostát

RAR – receptor kyseliny retinové

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

GIT – gastrointestinální trakt

APL – akutní promyelocytární leukemie

NAD(P)H – Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaná forma)

NADH – Nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)

ATRA – kyselina all-trans retinová

DSS – dextran sulfát sodný

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

$ONOO^-$ – Peroxynitritový anion

DTT – dithiothreitol

8. Literatura

1. Izzotti, A., Cartiglia, C., Steele, V. E. and De Flora, S., MicroRNAs as targets for dietary and pharmacological inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* **2012,** *751* (2), 287-303.
2. Milenkovic, D., Deval, C., Gouranton, E., Landrier, J., Scalbert, A., Morand, C., Mazur, A., Modulation of miRNA Expression by Dietary Polyphenols in apoE Deficient Mice: A New Mechanism of the Action of Polyphenols. *Plos One.* **2012,** *7* (1).
3. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **2004,** *79*, 727–747.
4. Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M., Lines, T. C., A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol.* **2007,** *45* (11), 2179-2205.
5. Olthof, M. R., Hollman, P. C., Katan, M. B., Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr.* **2001,** *131* (1), 66-71.
6. Omar, M. H., Mullen, W., Stalmach, A., Auger, C., Rouanet, J. M., Teissedre, P. L., Caldwell, S. T., Hartley, R. C., Crozier, A., Absorption, Disposition, Metabolism, and Excretion of [3-14C]Caffeic Acid in Rats. *J Agric Food Chem.* **2012,** *60* (20), 5205-5214.
7. Ikeda, K., Tsujimoto, K., Uozaki, M., Nishide, M., Suzuki, Y., Koyama, A. H., Yamasaki, H., Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int J Mol Med.* **2011,** *28* (4), 595-598.
8. Yang, S. Y., Hong, C. O., Lee, G. P., Kim, C. T., Lee K. W., The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of Perilla frutescens, against t-BHP-induced oxidative liver damage. *Food Chem Toxicol.* **2013,** *55*, 92-99.
9. Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K., In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm.* **2011,** *403*, 136–138.
10. http://www.scbt.com/datasheet-200499-caffeic-acid.html (12. 2. 2013).
11. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=689043 (11. 2. 2013).

12. McCloy, R. F., Greenberg, G. R., Baron J. H., Duodenal pH in health and duodenal ulcer disease: effect of a meal, Coca-Cola, smoking, and cimetidine. *Gut.* **1984,** *25* (4), 386-392.
13. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* **1996,** *20* (7), 933-956.
14. Slanina, J., Táborská, E., Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy* **2004,** *98*, 239-245.
15. Moridani, M. Y., Scobie, H., O'Brien, P. J., Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions. *Toxicol Lett.* **2002,** *133* ((2-3)), 141-151.
16. Castelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., Bolwell, G. P., Pridham, J., Sampson, J., Rice-Evans, C., Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.* **1995,** *368* (1), 188-192.
17. Stocker, R., Dietary and pharmacological antioxidants in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **1999,** *10* (6), 589-597.
18. Kasai, H., Fukada, S., Yamaizumi, Z., Sugie, S., Mori, H., Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol.* **2000,** *38* (5), 467-471.
19. Shibata, H., Sakamoto, Y., Oka, M., Kono, Y., Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Biosci Biotech Bioch.* **1999,** *63* (7), 1295-1297.
20. Kono, Y., Shibata, H., Kodama, Y., Sawa, Y., The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochem J.* **1995,** *312*, 947-953.
21. Verma, S., Singh, A., Mishra, A., Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Phar.* **2013,** *35* (3), 473–485.
22. Yoon, C. H., Chung, S. J., Lee, S. W., Park, Y. B., Lee, S. K., Park, M. C., Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine.* **2012**.
23. http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COfAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/G7384/G7384-BULK_____SIGMA____.pdf (7. 3. 2013).
24. http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+2117 (7. 3. 2013).
25. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. a Rémésy, C., Bioavailability

and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* **2005,** *88*, 230-242.

26. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. a Masella, R., Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. **2007,** *43* (4), 348-361.
27. Shahrzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A. a Bitsch, I., Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr.* **2001,** *131* (4), 1207-1210.
28. Yilmaz, Y., Toledo, R. T., Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agr Food Chem.* **2004,** *52* (2), 255-260.
29. Li, L., Ng, T. B., Gao, W., Li, W., Fu, M., Niu, S. M., Zhao, L., Chen, R. R. a Liu, F., Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. *Life Sci.* **2005,** *77* (2), 230-240.
30. Serrano, J., Cipak, A., Boada, J., Gonzalo, H., Cacabelos, D., Cassanye, A., Pamplona, R., Zarkovic, N. a Portero-Otin, M., Double-edged sword behaviour of gallic acid and its interaction with peroxidases in human microvascular endothelial cell culture (HMEC-1). Antioxidant and pro-oxidant effects. *Acta Biochim Pol.* **2010,** *57* (2), 193-198.
31. Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., Simmons, D. L., COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *P Natl Acad Sci USA.* **2002,** *99* (21), 13926-13931.
32. Kalinski, P., Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol.* **2012,** *188* (1), 21-28.
33. Liu, Z., Li, D., Yu, L., Niu, F., Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chemotherapy.* **2012,** *58* (3), 185-194.
34. Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H. L., Krupitza, G., Bernhaus, A., Fritzer-Szekeres, M. a Szekeres, T., Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* **2007,** *245* (1-2), 156-162.
35. Glick, Z., Modes of action of gallic acid in suppressing food intake of rats. *J Nutr.* **1981,** *111* (11), 1910-1916.
36. Chiang, L. C., Ng, L. T., Chiang, W., Chang, M. Y. a Lin, C. C., Immunomodulatory

activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of Plantago species. *Planta Med.* **2003,** *69* (7), 600-604.

37. Zhou, K., Wang, H., Mei, W., Li, X., Luo, Y. a Dai, H., Antioxidant activity of papaya seed extracts. *Molecules.* **2011,** *16* (8), 6179-6192.
38. Zhao, D., Islam, M. N., Ahn, B. R., Jung, H. A., Kim, B. W. a Choi, J. S., In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Angelica decursiva. *Arch Pharm Res.* **2012,** *35* (1), 179-92.
39. http://www.hmdb.ca/metabolites/hmdb00484 (24. 4. 2013).
40. Germano, M. P., D'Angelo, V., Biasini, T., Sanogo, R., De Pasquale, R. a Catania, S., Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from Trichilia emetica Vahl. *J Ethnopharmacol.* **2006,** *105* (3), 368-373.
41. Koli, R., Erlund, I., Jula, A., Marniemi, J., Mattila, P. a Alfthan, G., Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries. *J Agric Food Chem.* **2010,** *58* (7), 3927-3932.
42. Kim, S. J., Kim, M. C., Um, J. Y. a Hong, S. H., The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules.* **2010,** *15* (10), 7208-7217.
43. Bladé, C., Baselga-Escudero, L., Salvadó, M. J., Arola-Arnal, A., miRNAs, polyphenols, and chronic disease. *Mol Nutr Food Res.* **2013,** *57* (1), 58-70.
44. Li, H., Zhao, X., Ma, Y., Zhai, G., Li, L., Lou, H., Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *J Control Release.* **2009,** *133* (3), 238-244.
45. Kelly, G. S., Quercetin. Monograph. *Altern Med Rev.* **2011,** *16* (2), 172-194.
46. http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav_R03.pdf (16. 3. 2013).
47. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?q=all&cid=5280343#ec (26. 2. 2013).
48. Egert, S., Wolffram, S., Bosy-Westphal, A., Boesch-Saadatmandi, C., Wagner, A. E., Frank, J., Rimbach, G., Mueller, M. J., Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *J Nutr.* **2008,** *138* (9), 1615-1621.
49. Conquer, J. A., Maiani, G., Azzini, E., Raguzzini, A., Holub B. J., Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr.* **1998,** *128* (3), 593-597.

50. Duarte, J., Pérez-Palencia, R., Vargas, F., Ocete, M. A., Pérez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., Tamargo, J., Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Brit J Pharmacol.* **2001,** *133* (1), 117-124.
51. Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickancaité, E. a Segura-Aguilar, J., Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical bio med* **1999,** *26* (1-2), 107-116.
52. Musonda, C. A., Chipman, J. K., Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H2O2)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis.* **1998,** *19* (9), 1583-1589.
53. Tanaka, T., Okemoto, H. a Nobuhiro, K. Quercetin-containing coloring. 1995.
54. Xu, J., Wu, C., Che, X., Wang, L., Yu, D., Zhang, T., Huang, L., Li, H., Tan, W., Wang, C. a Lin, D., Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog.* **2011,** *50* (2), 136-142.
55. Bai, S., Nasser, M. W., Wang, B., Hsu, S. H., Datta, J., Kutay, H., Yadav, A., Nuovo, G., Kumar, P. a Ghoshal, K., MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem.* **2009,** *284* (46), 32015-32027.
56. He, J., Jing, Y., Li, W., Qian, X., Xu, Q., Li, F. S., Liu, L. Z., Jiang, B. H. a Jiang, Y., Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. *PLoS One.* **2013,** *8* (2).
57. Lee, S. B., Cha, K. H., Selenge, D., Solongo, A. a Nho, C. W., The chemopreventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene regulation. *Biol Pharm Bull.* **2007,** *30* (6), 1074-1079.
58. Theriault, A., Wang, Q., Van Iderstine, S. C., Chen, B., Franke, A. A. a Adeli, K., Modulation of hepatic lipoprotein synthesis and secretion by taxifolin, a plant flavonoid. *J Lipid Res.* **2000,** *41* (12), 1969-1979.
59. Weidmann, A. E., Dihydroquercetin: More than just an impurity? *Eur J Pharmacol.* **2012,** *684* (1-3), 19-26.
60. Zu, S., Yang, L., Huang, J., Ma, C., Wang, W., Zhao, C. a Zu, Y., Micronization of taxifolin by supercritical antisolvent process and evaluation of radical scavenging activity. *Int J Mol Sci.* **2012,** *13* (7), 8869-8881.
61. http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=78666&brand=FLUKA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Ffluka%2F78666%3Flang%

3Den (8. 3. 2013).

62. http://www.selleckchem.com/products/Taxifolin%28Dihydroquercetin%29.html (8. 3. 2013).

63. Zhang, Z. R., Al Zaharna, M., Wong, M. M., Chiu, S. K. a Cheung, H. Y., Taxifolin enhances andrographolide-induced mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer cells via spindle assembly checkpoint activation. *PLoS One.* **2013,** *8* (1).

64. Bortlík, M., Chemoprevence nádorů gastrointestinálního traktu. *Remedia* **2007,** *17*, 356–361.

65. Šmidrkal, J., Filip, V., Melyoch, K., Hanzlíková, I., Buckiová, D. a Křísa, B., Resveratrol. *Chem. Listy* **2001,** *95*, 602-609.

66. Mukhopadhyay, P., Pacher, P. a Das, D. K., MicroRNA signatures of resveratrol in the ischemic heart. *Ann NY Acad Sci.* **2011,** *1215*, 109-116.

67. Hardy, T. M., Tollefsbol, T. O., Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics.* **2011,** *3* (4), 503-518.

68. Tili, E., Michaille, J. J., Resveratrol, MicroRNAs, Inflammation, and Cancer. *J Nucleic Acids* **2011**.

69. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r5010pis.Par.0001.File.tmp/r5010pis.pdf (4. 3. 2013).

70. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?q=all&cid=445154#ec (4. 3. 2013).

71. Crowell, J. A., Korytko, P. J., Morrissey, R. L., Booth, T. D. a Levine, B. S., Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci.* **2004,** *82* (2), 614-619.

72. Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E. Jr. and Walle U. K., High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* **2004,** *32* (12), 1377-1382.

73. Walle, T., Bioavailability of resveratrol. *Ann NY Acad Sci.* **2011,** *1215* (Resveratrol and Health), 9-15.

74. Amiot, M. J., Romier, B., AnhDao, T. M., Fanciullino, R., Ciccolini, J., Burcelin, R., Pechere, L., Emond, C., Savouret, J. F. a Seree, E., Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie.* **2013**.

75. Renaud, S., de Lorgeril, M., Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* **1992,** *339* (8808), 1523-1526.

76. Prasad, K., Resveratrol, wine, and atherosclerosis. *Int J Angiol.* **2012,** *21* (1), 7-18.

77. Pirola, L., Fröjdö, S., Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life.* **2008,** *60*

(5), 323-332.

78. Kren, V., Walterová, D., Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap.* **2005,** *149* (1), 29-41.
79. Wu, J. W., Lin, L. C. a Tsai, T. H., Drug-drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics. *J Ethnopharmacol.* **2009,** *121* (2), 185-193.
80. Fraschini, F., Demartini, G. a Esposti, D., Pharmacology of Silymarin. *Clin drug invest.* **2002,** *22* (1), 51-65.
81. Loguercio, C., Festi, D., Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. *World J Gastroentero.* **2011,** *17* (18), 2288-2301.
82. http://www.scbt.com/datasheet-202812-silybin.html (10.2.2013).
83. Kidd, P., Head, K., A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos). *Altern Med Rev.* **2005,** *10* (3), 193-203.
84. Kosina, P., Kren, V., Gebhardt, R., Grambal, F., Ulrichová, J. a Walterová, D., Antioxidant properties of silybin glycosides. *Phytother Res.* **2002,** *16*, 33-39.
85. Katiyar, S. K., Silymarin and skin cancer prevention: Antiinflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *Int J Oncol.* **2005,** *26* (1), 169-176.
86. Lee, C. K., Choi, J. S., Effects of silibinin, inhibitor of CYP3A4 and P-glycoprotein in vitro, on the pharmacokinetics of paclitaxel after oral and intravenous administration in rats. *Pharmacology* **2010,** *85* (6), 350-356.
87. Huber, A., Thongphasuk, P., Erben, G., Lehmann, W. D., Tuma, S., Stremmel, W. a Chamulitrat, W., Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin. *Biochim Biophys Acta.* **2008,** *1780* (5), 837-847.
88. Thongphasuk, P., Stremmel, W. a Chamulitrat, W., 2,3-dehydrosilybin is a better DNA topoisomerase I inhibitor than its parental silybin. *Chemotherapy.* **2009,** *55* (1), 42-48.
89. Zhan, T., Digel, M., Küch, E. M., Stremmel, W. a Füllekrug, J., Silybin and dehydrosilybin decrease glucose uptake by inhibiting GLUT proteins. *J Cell Biochem.* **2011,** *112* (3), 849-859.
90. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r2625pis.Par.0001.File.tmp/r2625pis.pdf (15. 2. 2013).
91. Bremner, J. D., Shearer, K. D., McCaffery, P. J., Retinoic acid and affective disorders: the evidence for an association. *J Clin Psychiat.* **2012,** *73* (1), 37-50.
92. O'Reilly, K., Bailey, S. J., Lane, M. A., Retinoid-mediated regulation of mood: possible cellular mechanisms. *Exp Biol Med.* **2008,** *233* (3), 251-258.

93. Schäffer, M. W., Roy, S. S., Mukherjee, S., Ong, D. E., Das, S. K., Uptake of all-trans retinoic acid-containing aerosol by inhalation to lungs in a guinea pig model system--a pilot study. *Exp Lung Res.* **2010,** *36* (10), 593-601.

94. Olson, J. A., Hayaishi, O., The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *P Natl Acad Sci USA.* **1965,** *54* (5), 1364-1370.

95. Isken, A., Golczak, M., Oberhauser, V., Hunzelmann, S., Driever, W., Imanishi, Y., Palczewski, K., von Lintig, J., RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome. *Cell Metab.* **2008,** *7* (3), 258-268.

96. Maden, M., The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *Proc Nutr Soc.* **2000,** *59* (1), 65-73.

97. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?q=all&cid=444795#ec (17. 2. 2013).

98. Schmidt, N., Gans, E. H., Tretinoin: A Review of Its Anti-inflammatory Properties in the Treatment of Acne. *J Clin Aesthet Dermatol.* **2011,** *4* (11), 22-29.

99. Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., Berger, R., NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood.* **1991,** *77* (5), 1080-1086.

100. Rossi, A., D'Urso, O. F., Gatto, G., Poltronieri, P., Ferracin, M., Remondelli, P., Negrini, M., Caporaso, M. G., Bonatti, S., Mallardo, M., Non-coding RNAs change their expression profile after Retinoid induced differentiation of the promyelocytic cell line NB4. *BMC Res Notes.* **2010,** *3* (24), 1-7.

101. Jian, P., Li, Z. W., Fang, T. Y., Jian, W., Zhuan, Z., Mei, L. X., Yan, W. S. a Jian, N., Retinoic acid induces HL-60 cell differentiation via the upregulation of miR-663. *J Hematol Oncol.* **2011,** *4* (20).

102. Terao, M., Fratelli, M., Kurosaki, M., Zanetti, A., Guarnaccia, V., Paroni, G., Tsykin, A., Lupi, M., Gianni, M., Goodall, G. J., Garattini, E., Induction of miR-21 by retinoic acid in estrogen receptor-positive breast carcinoma cells: biological correlates and molecular targets. *J Biol Chem.* **2011,** *286* (5), 4027-4042.

103. Kloosterman, W. P., Plasterk, R. H., The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell.* **2006,** *11* (4), 441-450.

104. Wang, Z., Yao, H., Lin, S., Zhu, X., Shen, Z., Lu, G., Poon, W. S., Xie, D., Lin, M. C. a Kung, H. F., Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer*

Lett. **2013,** *331* (1), 1-10.

105. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, Ch. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B. a Tewari, M. , Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci.* **2008,** *105* (30), 10513–10518.

106. Zoon, C. K., Starker, E. Q., Wilson, A. M., Emmert-Buck, M. R. a Libutti, S. K.; A.;, a. T. M., Current molecular diagnostics of breast cancer and the potential incorporation of microRNA. *Expert Rev Mol Diagn.* **2009,** *9* (5), 455-467.

107. Shivdasani, R. A., MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood.* **2006,** *108* (12), 3646-3653.

108. Xiong, Y., Fang, J. H., Yun, J. P., Yang, J., Zhang, Y., Jia, W. H. a Zhuang, S. M. , Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2010,** *51* (3), 836-845.

109. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. a Ambrost, V., The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* **1993,** *75.* (5), 843–854.

110. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K-H., Lee, S., Baek, S. H. a Kim, V. N., MicroRNA genes are transcribed by RNApolymerase II. *The EMBO Journal* **2004,** *23* (20), 4051–4060.

111. Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* **2004,** *116* (2), 281-297.

112. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. a Kim, V. N., The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* **2003,** *425* (6956), 415–419.

113. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. a Walter, P., *Molecular Biology of the cell (5th edition)*. Garland science: 2008.

114. Ochu, E. E., Rothwell, N. J. a Waters, C. M., Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J Neurochem.* **1998,** *70* (6), 2637–2640.

115. Sieuwerts, A. M., Klijn, J. G. M., Peters, H. A. a Foekens, J. A., The MTT tetrazolium salt assay scrutinized - How to use this assay reliably to measure metabolic-activity of cell-cultures in-vitro for the assessment of growth-characteristics, IC50-values and

cell-survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* **1995,** *33*, 813–823.

116. Chomczynski, P., Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **1987,** *162*, 156–159.
117. Chomczynski, P., A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* **1993,** *15* (3).
118. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976,** *72*, 248–254.
119. Wang, Y., Zhang, X., Li, H., Yu, J. a Ren, X., The role of miRNA-29 family in cancer. *Eur J Cell Biol.* **2013,** *92* (3), 123-128.
120. Cheng, A. M., Byrom, M. W., Shelton, J. a Ford, L. P., Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* **2005,** *33* (4), 1290-1297.
121. Huang, Z., Huang, S., Wang, Q., Liang, L., Ni, S., Wang, L., Sheng, W., He, X. a Du, X., MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* **2011,** *71* (7), 2582-2589.
122. *http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php?r=tarbase/index&mirnas=MIMAT0000094 (14. 4. 2013).*
123. .Wang, W., Zhao, L. J., Tan, Y. X., Ren, H. a Qi, Z. T., Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* **2012,** *18* (38), 5442-5553.
124. Wang, W., Zhao, L. J., Tan, Y. X., Ren, H. a Qi Z. T., MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* **2012,** *33* (5), 1113-1120.
125. http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php?q=search_exact&searchword=hsa-miR-301b (4. 4. 2013).
126. Jiang, J., Gusev, Y., Aderca, I., Mettler, T. A., Nagorney, D. M., Brackett, D. J., Roberts, L. R. a Schmittgen, T. D., Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res.* **2008,** *14* (2), 419-427.
127. Braconi, C., Huang, N. a Patel, T., MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology.* **2010,** *51* (3), 881-890.

128. Liu, C., Kelnar, K., Vlassov, A. V., Brown, D., Wang, J. a Tang D. G., Distinct microRNA expression profiles in prostate cancer stem/progenitor cells and tumor-suppressive functions of let-7. *Cancer Res.* **2012,** *72* (13), 3393-3404.

129. Shi, W., Gerster, K., Alajez, N. M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A. B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., McCready, D., Fyles, A a Liu, F. F., MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res.* **2011,** *71* (8), 2926-2937.

130. Tao, Z. H., Wan, J. L., Zeng, L. Y., Xie, L., Sun, H. C., Qin, L. X., Wang, L., Zhou, J., Ren, Z. G., Li, Y. X., Fan, J. a Wu W. Z., miR-612 suppresses the invasive-metastatic cascade in hepatocellular carcinoma. *J Exp Med.* **2013,** *210* (4), 789-803.

131. Duan, Q., Wang, X., Gong, W., Ni, L., Chen, C., He, X., Chen, F., Yang, L., Wang, P. a Wang, D. W., ER stress negatively modulates the expression of the miR-199a/214 cluster to regulates tumor survival and progression in human hepatocellular cancer. *PLoS One.* **2012,** *7* (2).

132. Shen, Q., Cicinnati, V. R., Zhang, X., Iacob, S., Weber, F., Sotiropoulos, G. C., Radtke, A., Lu, M., Paul, A., Gerken, G. a Beckebaum, S., Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion. *Mol Cancer.* **2010,** *9*, 1-12.

133. Xiao, W., Bao, Z. X., Zhang, C. Y., Zhang, X. Y., Shi, L. J., Zhou, Z. T. a Jiang, W. W., Upregulation of miR-31* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. *PLoS One.* **2012,** *7* (6).

134. Belleannée, C., Calvo, E., Thimon, V., Cyr, D. G., Légaré, C., Garneau, L. a Sullivan, R., Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. *PLoS One.* **2012,** *7* (4).

135. Gažák, R., Valentová, K., Fuksová, K., Marhol, P., Kuzma, M., Medina, M. Á., Oborná, I., Ulrichová, J. a Křen, V., Synthesis and antiangiogenic activity of new silybin galloyl esters. *J Med Chem.* **2011,** *54* (20), 7397-7407.