

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Produkty oxidace fenyipropanoidů a jejich biologická
aktivita**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Zuzana Slováčková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Zuzana Slováčková
Název práce:	Produkty oxidace fenylypropanoidů a jejich biologická aktivita
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	V této bakalářské práci byl studován vliv šesti směsí, připravených oxidací methylesteru kyseliny kumarové na biologickou aktivitu. Připravené směsi byly podrobeny čtyřem <i>in vitro</i> testům, které zjišťovaly, jestli vzniklé produkty směsí 1–6 jsou biologicky aktivní. Nejaktivnější produkty oxidace methylesteru kyseliny kumarové se nacházely ve směsi 3. Tato směs aktivovala nejsilněji dráhu transkripčního faktoru Nrf2, inhibovala růst bakterií <i>A. odontolyticus</i> , <i>S. aureus</i> , pozastavila líhnutí vajíček <i>C. elegans</i> a zároveň se u ní neprojevovaly cytotoxické účinky. Na závěr byla provedena analýza vzniklých směsí metodou UHPLC-MS.
Klíčová slova	fenylpropanoidy, methylester kyseliny p-kumarové, oxidační transformace, Nrf2, anthelmintická aktivita, cytotoxická aktivita, antibakteriální aktivita, UHPLC-MS
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Zuzana Slováčková
Title of thesis	Products of phenylpropanoid oxidation and their biological activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	This bachelory thesis examined a biological activity of six mixtures, which were produced by the oxidation of the coumaric acid methyl ester. Mixtures were tested in four <i>in vitro</i> tests to determine if the resulted products of the mixtures 1–6 have antioxidant, antibacterial, cytotoxic or anthelmintic effects. It was determined that the most biologically active mixture was the mixture 3. This mixture most strongly activated the pathway of transcription factor Nrf2, inhibited the growth of bacteria <i>A. odontolyticus</i> , <i>S. aureus</i> , suspended the hacking of the eggs <i>C. elegans</i> and at the same time there were no cytotoxic effects. In the end the resulting mixtures were analyzed by the method UHPLC-MS.
Keywords	phenylpropanoids, p-coumaric acid ethyl ester, oxidative transformation, Nrf2, anthelmintic activity, cytotoxic activity, antimicrobial activity, UHPLC-MS
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jiřího Grúze, Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Zuzana Slováčková

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce, Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost, ochotu a odborné vedení při zpracovávání této bakalářské práce. Velké díky patří také Mgr. Lucii Slobodiánové za pomoc při experimentech a za cenné rady při práci v laboratoři. Dále pak chci poděkovat RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. za spolupráci při syntéze reakčních směsí, RNDr. Lucii Janovské, Ph.D. za umožnění testování antimikrobiální aktivity a také Mgr. Aleně Kadlecové za provedení testu na anthelmintickou aktivitu. Na závěr bych chtěla poděkovat Interní grantové agentuře Univerzity Palackého v Olomouci za finanční podporu výzkumu (IGA grant: IGA_PrF_2020_021).

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	9
2 Cíle práce	10
3 Teoretická část	11
3.1 Charakteristika fenylpropanoidů	11
3.2 Biosyntéza prekurzorů fenylpropanoidů	11
3.2.1 Šikimátová dráha	11
3.2.2 Biosyntéza aromatických aminokyselin	12
3.2.3 Biosyntéza fenylpropanoidů	15
3.3 Zástupci fenylpropanoidů	16
3.3.1 Kumariny	16
3.3.2 Flavonoidy	16
3.3.3 Lignany	16
3.3.3.1 Podofylotoxin	17
3.3.3.2 Sesamin a sesamolín	18
3.3.3.3 Enterodiol a enterolakton	19
3.4 Oxidační transformace	20
3.4.1 Křenová peroxidasa	20
3.4.2 Molekulární kyslík	22
3.5 Kultivace buněčných linií <i>in vitro</i>	22
3.6 Antioxidační aktivita	24
3.7 Antimikrobiální aktivita	25
3.8 Cytotoxická aktivita	26
3.9 Anthelmintická aktivita	26
4 Experimentální část	29
4.1 Použité chemikálie, roztoky a média	29
4.2 Biologický materiál	34
4.3 Přístrojové vybavení	35
4.4 Necílená syntéza směsí	37
4.4.1 Postup přípravy směsi produktů oxidace 1	37
4.4.2 Postup přípravy směsi produktů oxidace 2	37
4.4.3 Postup přípravy směsi produktů oxidace 3	38
4.4.4 Postup přípravy směsi produktů oxidace 4	38
4.4.5 Postup přípravy směsi produktů oxidace 5	38
4.4.6 Postup přípravy směsi produktů oxidace 6	38
4.5 Testování aktivace transkripčního faktoru Nrf2 a cytotoxické aktivity	39
4.5.1 Kultivace buněčných linií	39

4.5.2 Aktivace Nrf2 dráhy.....	40
4.6 Testování cytotoxické aktivity.....	42
4.7 Testování anthelmintické aktivity.....	42
4.8 Testování antimikrobiální aktivity.....	44
4.9 Chemická analýza směsí metodou UHPLC-MS.....	45
5 Výsledky.....	48
5.1 Stanovení aktivace transkripčního faktoru Nrf2.....	48
5.2 Stanovení cytotoxických účinků.....	49
5.3 Stanovení anthelmintické aktivity.....	49
5.4 Stanovení antimikrobiální aktivity.....	50
5.5 Identifikace vzniklých produktů směsí.....	52
6 Diskuze.....	55
7 Závěr.....	58
Použitá literatura.....	59

Seznam použitých zkratk

AD	arogenát dehydrogenasa
ADT	arogenát dehydratasa
ARE	antioxidační rezponzivní element
AS	anthranilát synthasa
ATCC	American Type Culture Collection
BHI bujón	bujón z mozkosrdcové infúze
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CM	chorismát mutasa
DAHP	3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát
DHQ	3-dehydrochinát
DHS	3-dehydrošikimát
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPSP	5-enolpyruvylšikimát 3-fosfát
ES-	negativní ionizační mód
FK	kyselina ferulová
H•	radikál vodíku
HRP	křenová peroxidasa
IGPS	indol-3-glycerol fosfát synthasa
LC ₅₀	letální koncentrace
LD ₅₀	letální dávka
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MEKK	methylester kyseliny kumarové
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
Nrf2	nuclear factor erythroid 2 related factor 2
PAI	fosforibosylanthranilát isomerasa
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
PAT	fosforibosylanthranilát transferasa
PAT	prefenát aminotransferasa
PEP	fosfoenolpyruvát
p-KK	kyselina p-kumaorvá
R•	radikál organické látky
ROO•	peroxidový radikál
ROOH	hydrogenperoxid
RT	retenční čas
S3P	šikimát-3-fosfát
TIC	Total Ion Current
TS	tryptofan synthasa
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1 Úvod

Fenylpropanoidy tvoří velkou skupinu sekundárních metabolitů rostlin odvozených od aminokyseliny fenylalaninu. Základním meziproduktem biosyntézy je kyselina skořicová a její deriváty: kyselina kumarová, ferulová a sinapová. Mezi nejpočetnější a zároveň nejvýznamnější zástupce fenylpropanoidů se řadí: flavonoidy, kumariny, stilbeny, lignany a rotenoidy. Tyto rostlinné metabolity mají velmi široký rozsah biologických funkcí a účinků jak v rostlině samotné, tak i v působení na organismy jiných druhů.

V současné době stojí přírodní i syntetizované fenylpropanoidy v popředí zájmu, a to díky jejich antibakteriálním, antioxidačním, antidiabetickým a protinádorovým účinkům, čehož se následně využívá v potravinářském, kosmetickém i farmaceutickém průmyslu.

Ve své bakalářské práci jsem se proto zaměřila na necílenou syntézu a vyhledávání látek odvozených od kyseliny kumarové s následným určováním jejich biologické aktivity.

2 Cíle práce

1. Připravit sadu reakčních směsí oxidací methylesteru kyseliny kumarové
2. U připravených směsí určit biologickou aktivitu
3. Provést chemickou analýzu reakčních směsí pomocí metody UHPLC-MS

3 Teoretická část

3.1 Charakteristika fenylypropanoidů

Fenylypropanoidy jsou sekundární metabolity rostlin s mnoha významnými biologickými funkcemi a účinky, které působí na samotné rostliny, tak i na organismy jiných druhů. Široká chemická rozmanitost fenylypropanoidů je výsledkem mnoha metabolických drah, vedoucími k značně omezenému počtu klíčovým produktům. Enzymovými přeměnami těchto produktů následně vznikají deriváty jako jsou lignany, flavonoidy, kumariny, rotenoidy a stilbeny (Harmatha J., 2005). Tyto metabolity jsou v rostlině produkovány zejména v reakci na biotický nebo abiotický stres, který může být způsoben infekcí, zraněním, UV zářením, působením ozonu nebo znečištěním prostředí. V současné době se zvyšuje zájem o přírodní i synteticky vyrobené fenylypropanoidy, a to díky jejich antibakteriálním, protizánětlivým a antioxidačním účinkům (Korkina, L. G., 2007).

Fenylypropanoidy patří do skupiny fenolických látek, pro které je charakteristická přítomnost aromatického kruhu, který nese vždy nejméně jednu hydroxylovou skupinu. Na tento fenolový kruh se dále připojuje tříuhlíkatý řetězec, což je další charakteristický znak fenylypropanoidů. Jejich formální složení tedy je C_6-C_3 . Mezi základní fenylypropanoidy se řadí kyselina skořicová a její deriváty jako například kyselina kumarová, kávová, ferulová a sinapová. Tyto látky vznikají deaminací aminokyseliny fenylalaninu za přítomnosti enzymu fenylalaninamoniaklyasy (PAL).

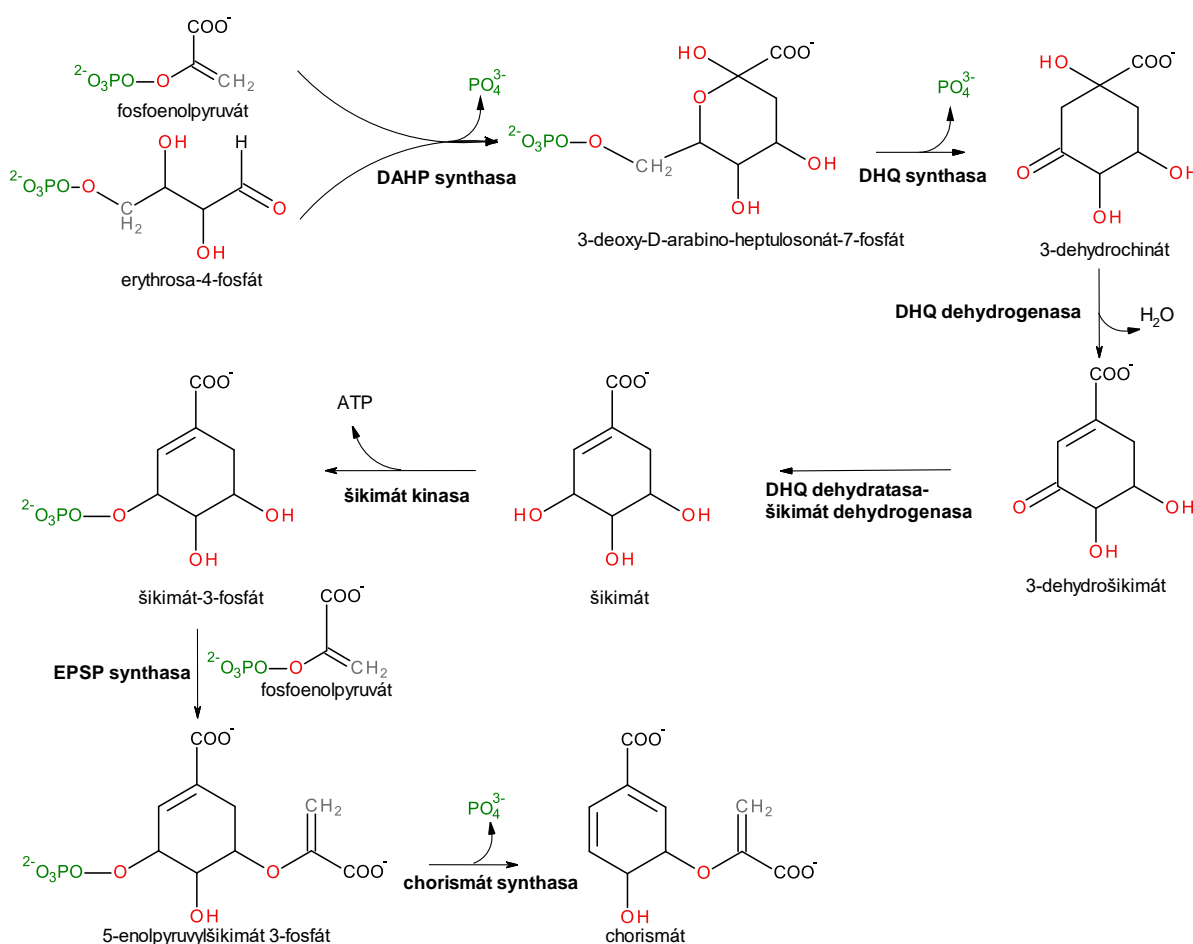
3.2 Biosyntéza prekurzorů fenylypropanoidů

3.2.1 Šikimátová dráha

Šikimátová dráha je sled sedmi reakcí (Obrázek 1), které probíhají pouze u rostlin a mikroorganismů, nikdy však u živočichů. Toho lze následně využít při výrobě herbicidů, antibiotik a živých vakcín. Tato biochemická dráha, která je lokalizovaná v chloroplastech, je hlavním spojovatelem mezi primárním a sekundárním metabolismem vyšších rostlin (N. F. Santos-Sánchez et. al., 2019).

Prvním krokem šikimátové dráhy je kondenzace fosfoenolpyruvátu (PEP) s erythrosa-4-fosfátem za vzniku 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát (DAHP) a uvolnění jedné fosfátové skupiny, tato reakce je katalyzována DAHP synthasou. Druhým krokem je odstranění dalšího fosfátu z DAHP za vzniku 3-dehydrochinátu (DHQ). Reakce je katalyzována DHQ synthasou. V třetím kroku dochází za katalýzy DHQ dehydratasy k dehydrataci DHQ a vzniku 3-dehydrošikimátu (DHS). Čtvrtým

krokem šikimátové dráhy je redukce DHS za vzniku šikimátu. Tato reakce je v rostlinách katalyzovaná bifunkčním enzymem DHQ dehydratasa-šikimát dehydrogenasou. V pátém kroku je šikimát pomocí šikimát kinasy přeměněn na šikimát-3-fosfát (S3P). V šestém kroku do reakce vstoupí další PEP, které kondenzuje s S3P za vzniku 5-enolpyruvylšikimát 3-fosfátu (EPSP) a fosfátové skupiny. Tato zvratná reakce je katalyzována EPSP synthasou. V posledním kroku spolu reaguje EPSP a enzym chorismát synthasa za vzniku chorismátu. Při této reakci se uvolní poslední fosfátová skupina (Herrmann K. M, Lisa M. W., 1999).



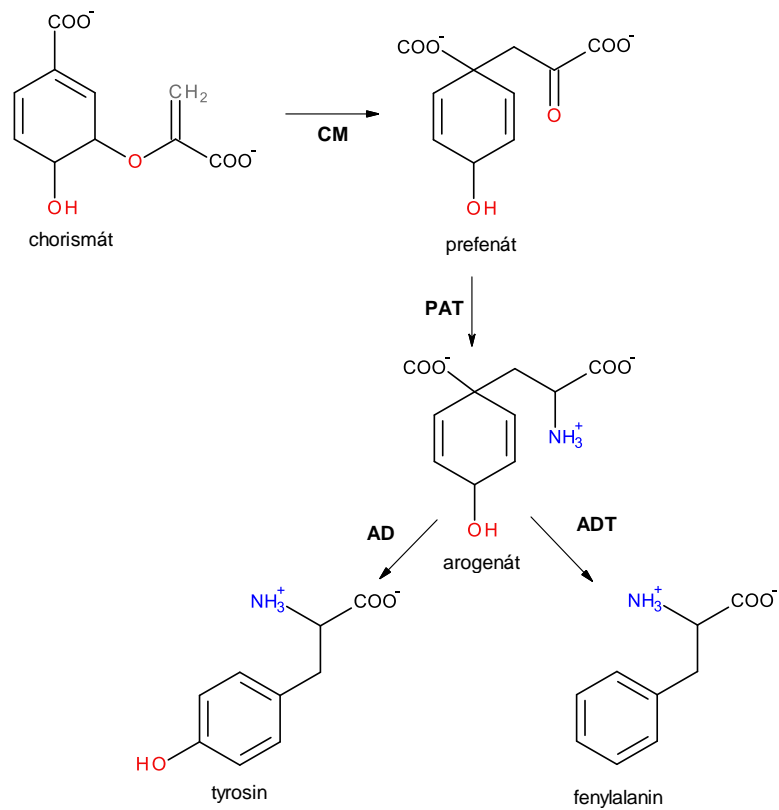
Obrázek 1 Základní schéma šikimátové dráhy.

3.2.2 Biosyntéza aromatických aminokyselin

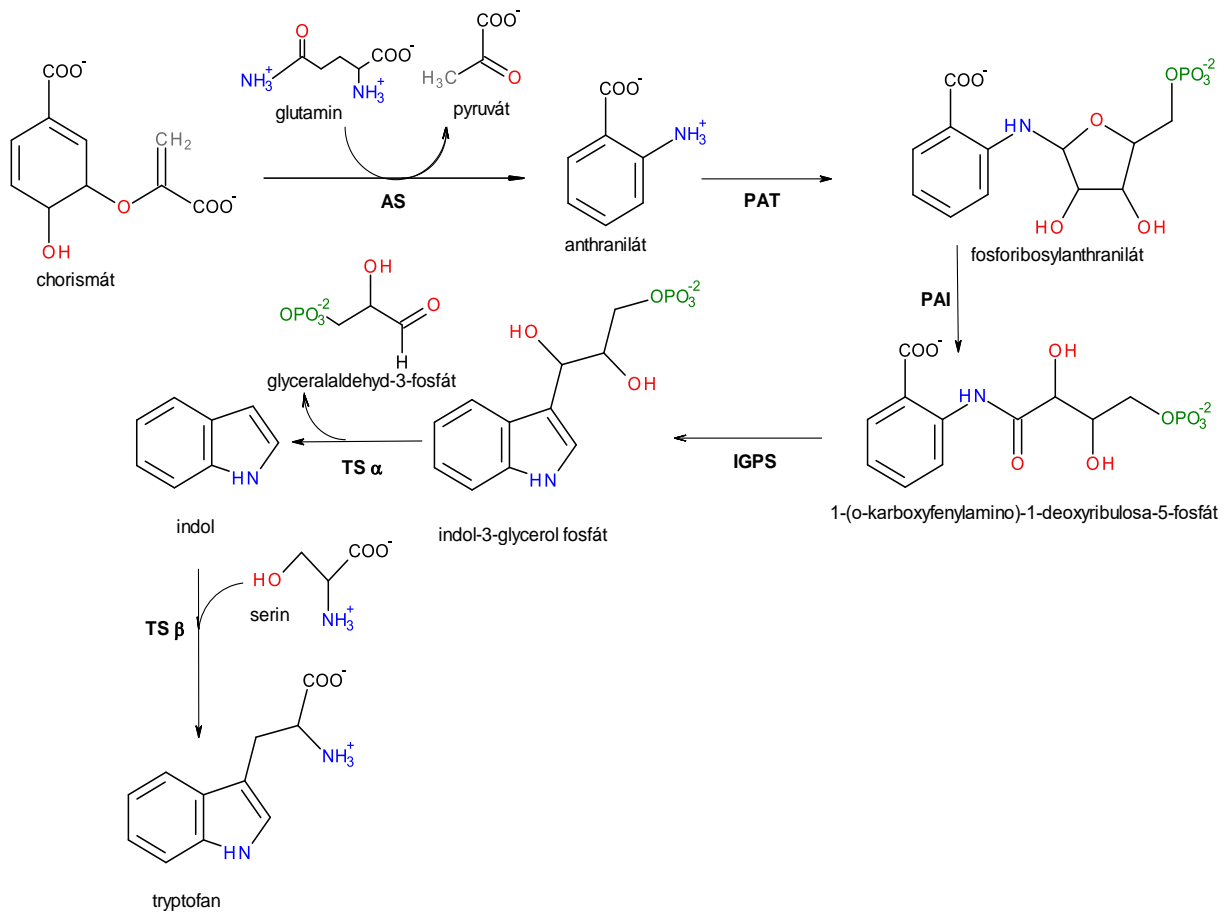
Aromatické aminokyseliny tyrosin, tryptofan a fenylalanin jsou nepostradatelnou součástí všech proteinů v živých buňkách. K biosyntéze těchto tří aminokyselin dochází pouze u rostlin, hub a bakterií, živočichové je tedy musí přijímat v potravě. V rostlinách se syntetizují z konečného produktu šikimátové dráhy, chorismátu, což je meziprodukt řady přírodních produktů, které hrají důležitou roli v růstu, vývoji, reprodukci a obraně rostlin. (Maeda H., Dudareva N., 2012).

První krok biosyntézy fenylalaninu a tyrosinu (Obrázek 2) je katalyzovaný chorismát mutasou (CM), která přeměňuje chorismát na prefenát. Další dva enzymatické kroky přeměny prefenátu na fenylalanin nejsou dosud zcela objasněny. Předpokládá se, že aktivací enzymů prefenát aminotransferasy (PAT) a arogenát dehydratasy (ADT) vzniká arogenát, který se následně přemění na fenylalanin. V případě, že poslední krok katalyzuje enzym tyrosin arogenát dehydrogenasa (AD) vzniká aminokyselina tyrosin (Obrázek 2).

První krok biosyntézy tryptofanu (Obrázek 3) je katalyzovaný anthranilát synthasou (AS) a zahrnuje přenos aminoskupiny glutaminu na chorismát za vzniku anthranilátu a pyruvátu. Druhým enzymem v biosyntetické dráze je fosforibosylanthranilát transferasa (PAT), který přenáší fosforibosylovou skupinu z fosforibosylpyrofosfátu na anthranilát, a tak vzniká fosforibosylanthranilát. Následně dochází k ireverzibilnímu přesmyku fosforibosylpyrofosfátu na 1-(o-karboxyfenylamino)-1-deoxyribulosu-5-fosfát za katalýzy fosforibosylanthranilát isomerasa (PAI). Aktivací enzymu indol-3-glycerol fosfát synthasy (IGPS) vzniká v dalším kroku indol-3-glycerol fosfát, který se naváže do reakčního centra α podjednotky tryptofanu synthasy (TS), která následně štěpí indol-3-glycerol fosfátu na indol a glyceraldehyd-3-fosfát. V posledním kroku β podjednotka katalyzuje kondenzaci indolu se serinem za vzniku tryptofanu (Tzin V., Galili G., 2010; Maeda H., Dudareva N., 2012).



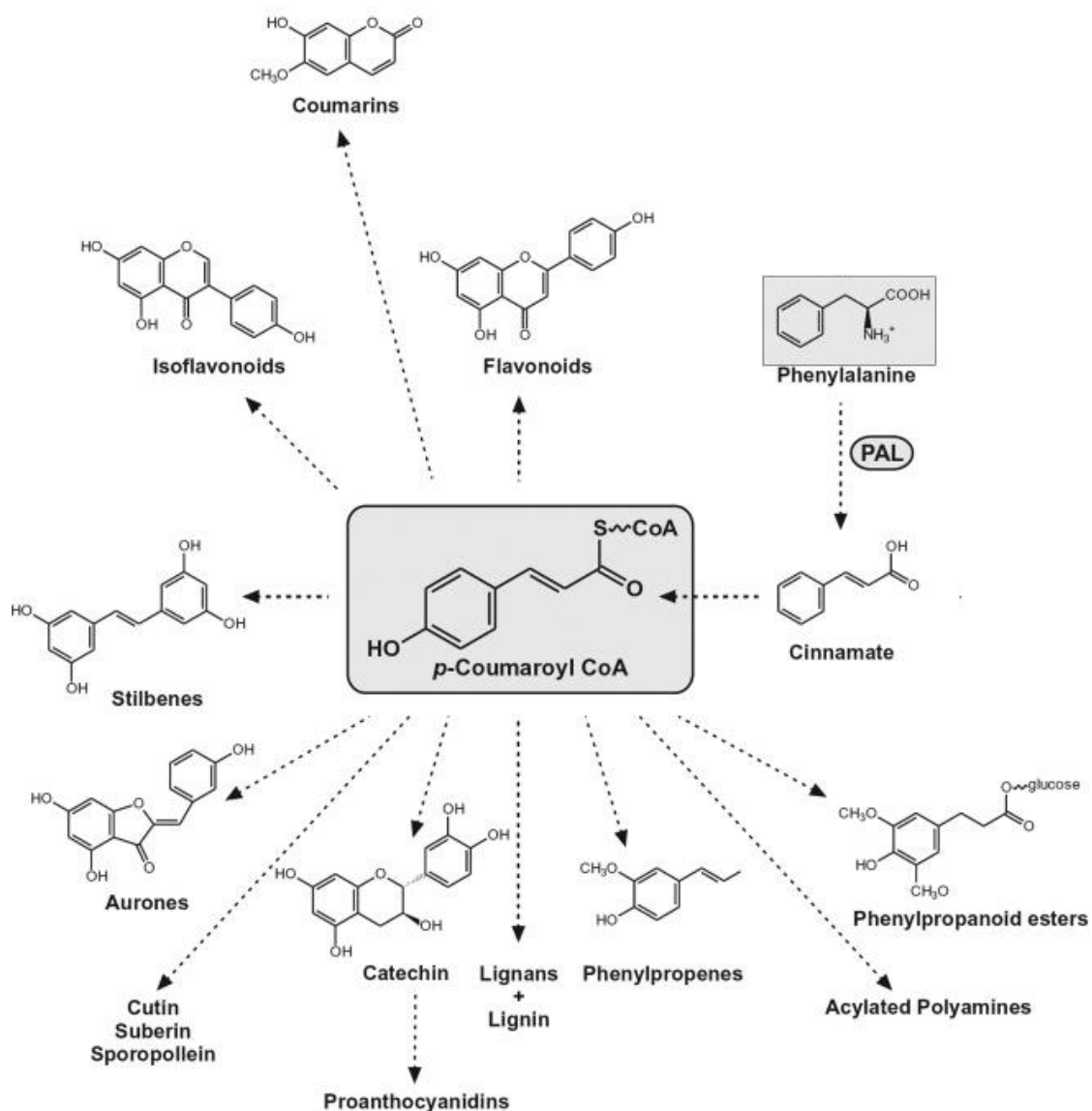
Obrázek 2 Schéma biosyntézy Phe a Tyr.



Obrázek 3 Schéma biosyntézy Trp.

3.2.3 Biosyntéza fenylpropanoidů

Enzym PAL, jak již bylo zmíněno katalyzuje deaminaci Phe za vzniku kyseliny skořicové, která se dále hydroxyluje na kyselinu kumarovou pomocí enzymu cinnamát-4-hydroxylasy. V následujícím kroku, který je katalyzovaný 4-kumarát CoA ligasou vzniká 4-kumaryl CoA (Singh K. et al., 2009). A právě 4-kumaryl CoA představuje důležitý meziprodukt v biosyntéze lignanů, flavanoidů, kumarinů a dalších fenylpropanoidů (Obrázek 4) (Vogt T., 2010).



Obrázek 4 Hlavní prekurzor vzniku fenylpropanoidů 4-kumaryl CoA; upraveno a převzato z Vogt T., 2010.

3.3 Zástupci fenylypropanoidů

3.3.1 Kumariny

Kumariny (C_6-C_3) a jeho deriváty jsou přítomné především v semenech, plodech a květech rostlin. Vznikají hydroxylací ortho polohy kyseliny skořicové s následnou laktonizací. Svou strukturou se tedy řadí mezi benzopyrany. Kumariny se vyznačují mnohými farmakologickými účinky, nízkou toxicitou a širokým spektrem působení. V praxi se nejvíce využívá jejich antikoagulačních vlastností. Mezi nejznámější antikoagulanty kumarinového typu se řadí Warfarin (Matos M. J. et al., 2015).

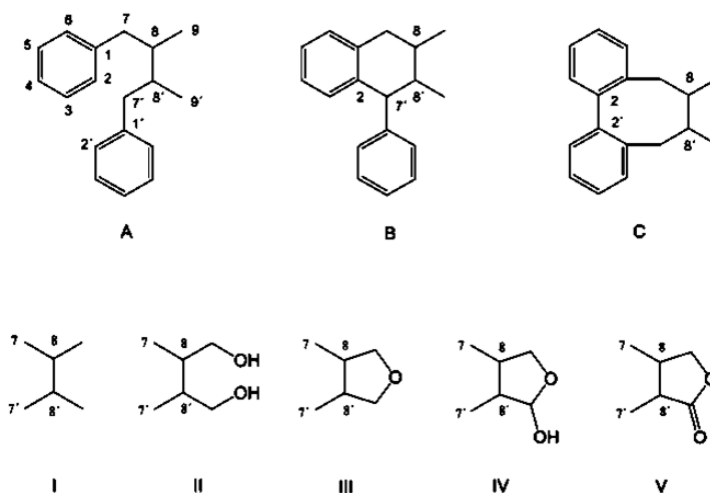
3.3.2 Flavonoidy

Flavonoidy ($C_6-C_3-C_6$) jsou deriváty flavanu, které vznikají ze dvou složek. První složkou je kyselina z šikimátové dráhy a druhou složku tvoří tři molekuly malonylu-CoA (Harmatha J., 2002). U rostlin zodpovídají za zbarvení a vůni květů. Napomáhají klíčení semen a celkovému růstu rostlin. Tvoří nepostradatelnou složku v nutričních, farmaceutických a kosmetických aplikacích. Mají příznivé účinky na léčbu různých nemocí jako je rakovina, ateroskleróza či Alzheimerova choroba (Panche A. N., et al., 2016).

3.3.3 Lignany

Rostlinné lignany se nacházejí především v celozrnných obilovinách, fazolích, lněných a sezamových semínkách (Adlercreutz H., 2007). Podle chemické struktury je lze rozřadit do pěti hlavních skupin: lignany, neolignany, norlignany, hybridní lignany a oligomerní lignany.

Lignany (C_6-C_3)₂ představují velmi četnou skupinu fenylypropanoidů, které vznikají oxidační dimerizací dvou fenylypropanových jednotek. K dimerizaci těchto dvou jednotek dochází v postranních řetězcích konkrétně v polohách C8 a C8' (Obrázek 5 A–C). Dalšími oxidačními reakcemi základních typů A–C dochází k zvyšování strukturální variability lignanů (Obrázek 5 I–V). Tato variabilita je dána přítomností dvojných vazeb a substituentů hydroxy- nebo oxy- (Harmatha J., 2005).



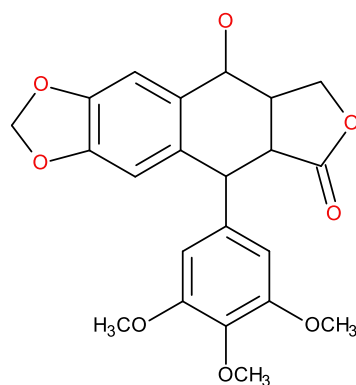
Obrázek 5 Strukturn variabilita lignanů (A-dibenzylbutanov typ, B-aryltetralinov typ, C-dibenzocycloooktanov typ; I-butanov forma, II-butandiolov forma, III-9,9'-epoxy forma, IV-hemiacetalov forma, V-butanolidov forma); upraveno a převzato z Harmatha J., 2005.

V mnoha studiích byl prokázán vliv lignanů na biologickou aktivitu. Předpokládá se, že pritomnost methylenedioxyfenylov skupiny lignanů má protikarcinogenn uinky. Prokázány byly také antimitotick uinky, kter inhibují polymeraci tubulinu a tm pozastaví metafázi buněčného cyklu. V jiné studii bylo zjištěno, že kyselina dihydroguajaretov a norisoguajacin působí antimikrobiální na bakterie rodu *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Bacillus* (MacRae W. D., Towers G. H. N., 1984).

3.3.3.1 Podofylotoxin

Rostlinn druh *Podophyllum* byl široce vyuivn jako leiv rostlina ji před 2000 lety v asijských a amerických kulturách, kde se vyuival jako protinadorov léčivo. Podofylotoxin (Obrázek 6) je lignan, kter se izoluje z oddenků a koen výše zmíněného druhu rostliny. Tento sekundární metabolit je předchůdcem semisyntetických léků etoposidu, teniposidu a etopofosu, kter se klinicky pouivj v terapeutick léčbě rakoviny. (Silva C.G. et al., 2017).

Podofylotoxin a jeho deriváty vykazují antimitotickou aktivitu a schopnost inhibovat syntézu DNA, RNA a proteinů v HeLa buňkách. Inhibice spoiv v tom, že se spolu nedokzou spárovat prslun komplementrn báze nukleových kyselin. Mezi další vlastnosti podofylotoxinu patří jeho antivirov uinky, kterých se vyuiv pr léčbě condyloma acuminata, což je pohlavn prenosn onemocnění zpsoben virem lidského papilomaviru (MacRae W. D., Towers G. H. N., 1984; Chang G. J., Welton M. L., 2004).

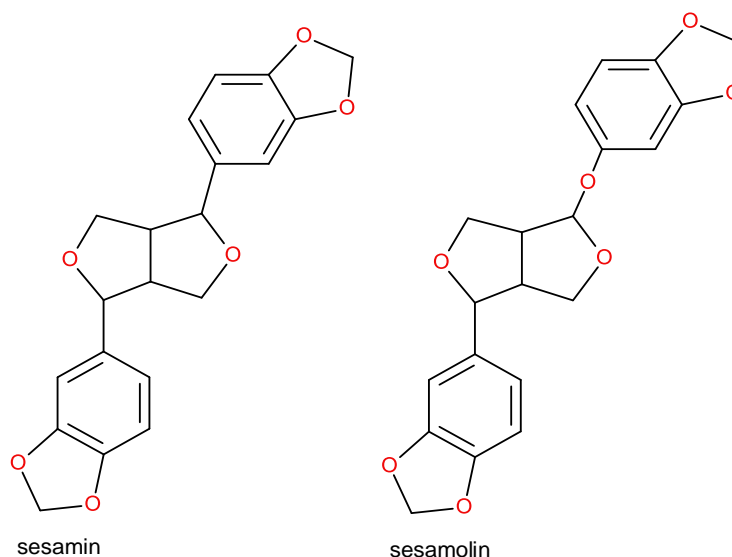


Obrázek 6 Chemická struktura podofylotoxinu.

3.3.3.2 Sesamin a sesamolín

Rostliny rodu *Sesamun* se vyznačují přítomností lignanů jako jsou sesamin a sesamolín (Obrázek 7). Tyto lignany se nacházejí v semenech sezamu, ze kterých se vyrábí sezamový olej, který je vysoce stabilní vůči žluknutí. Bylo zjištěno, že za tuto stabilitu je zodpovědná přítomnost methyldioxyfenylové skupiny (Bedigian D. et al., 1985).

Sesamin i sesamolín snižují krevní tlak, hladinu sérových i jaterních lipidů, potlačují aktivitu enzymů podílejících se na syntéze mastných kyselin a současně stimulují jejich oxidaci. Bylo prokázáno, že sesamolín je ve srovnání se sesaminem účinnější při zvyšování aktivity enzymů, které jsou zapojeny do oxidace mastných kyselin (Lim J. S. et al., 2007; Kamal-Eldin A. et al., 2011). Tyto dva lignany mají slabou antioxidační aktivitu *in vitro*, avšak silný antioxidační účinek *in vivo*. Předpokládá se, že za zesílení tohoto účinku je zodpovědná přítomnost hydroxylové skupiny, která vzniká při látkovém metabolismu. Produkty, které vzniknou poté lépe eliminují volné radikály (Wan Y. et al., 2015). Zlepšují efekt insekticidů jako jsou pyretriny a retenony. Bylo potvrzeno, že za tento účinek je zodpovědná methyldioxyfenylová skupina (Kamal-Eldin A. et al., 2011).

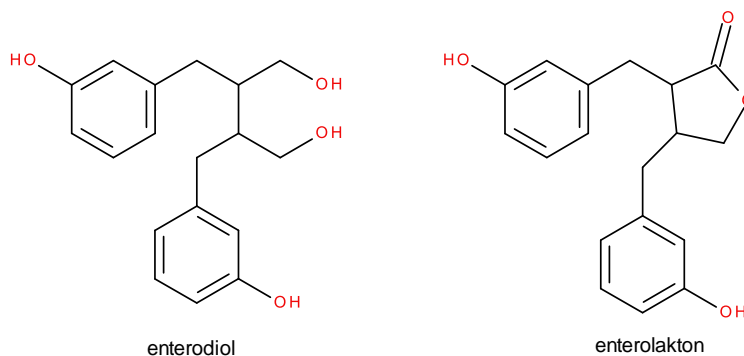


Obrázek 7 Chemické struktury sesaminu a sesamolinu přítomných v sezamovém oleji.

3.3.3.3 Enterodiol a enterolakton

Secoisolariciresinol a metairesinol jsou rostlinné lignany, které se nacházejí především v aleuronové vrstvě lněného semínka (*Linum usitatissimum*). Tyto prekurzory jsou bakteriemi střevní mikroflóry metabolizovány na enterolakton a enterodiol (Obrázek 8), a poté se vstřebávají gastrointestinálním traktem do jater. V játrech dochází ke konjugaci těchto lignanů s kyselinou glukoronovou a následnému vstupu do krevního oběhu.

Tyto enterolignany pravděpodobně snižují plazmatické hladiny estradiolu a testosteronu, a tudíž lze jimi ovlivnit vývoj hormonálně závislých chorob. Prokázalo se, že inhibují proliferaci buněk lidského karcinomu prsu a tlustého střeva (Raffaelli B. et al., 2002).



Obrázek 8 Strukturální vzorce enterolignanů.

3.4 Oxidační transformace

3.4.1 Křenová peroxidasa

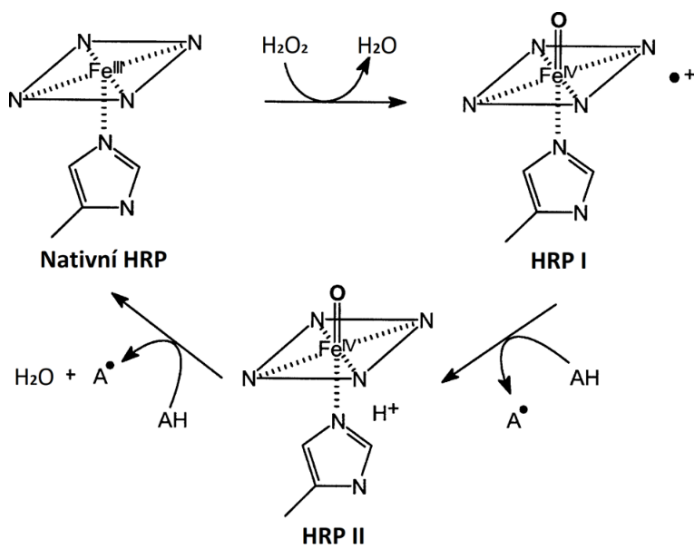
Enzym křenové peroxidasy (HRP) poprvé objevený v kořenu křene selského (*Armoracia rusticana*) má široké uplatnění v mnoha biochemických odvětvích. Tento enzym patří do skupiny oxidoreduktáz, které jsou charakteristické přenosem jednoho nebo více elektronů mezi jednotlivými substráty. Je známo několik izoenzymů HRP, z nichž nejvíce zastoupeným izoenzymem je HRP C. Ve své struktuře HRP C obsahuje dva atomy vápníku a jeden atom železa, který je začleněn do středu protoporphyrinu IX a spolu tvoří hemovou skupinu. Atomy vápníku i železa jsou důležité pro strukturní a funkční úplnost enzymu.

HRP spolu s peroxidem vodíku se využívá k oxidaci širokého spektra organických i anorganických sloučenin. Mezi organické substráty se řadí aromatické fenoly, fenolové kyseliny, indoly, aminy a sulfonáty (Veitch, 2004). Oxidace je tříkrokový, cyklický proces, ve kterém je nejprve enzym oxidován peroxidem vodíku, a poté redukován zpět do původní formy ve dvou krocích zahrnujících tvorbu dvou enzymových meziproduktů, HRP I a HRP II (Obrázek 9).

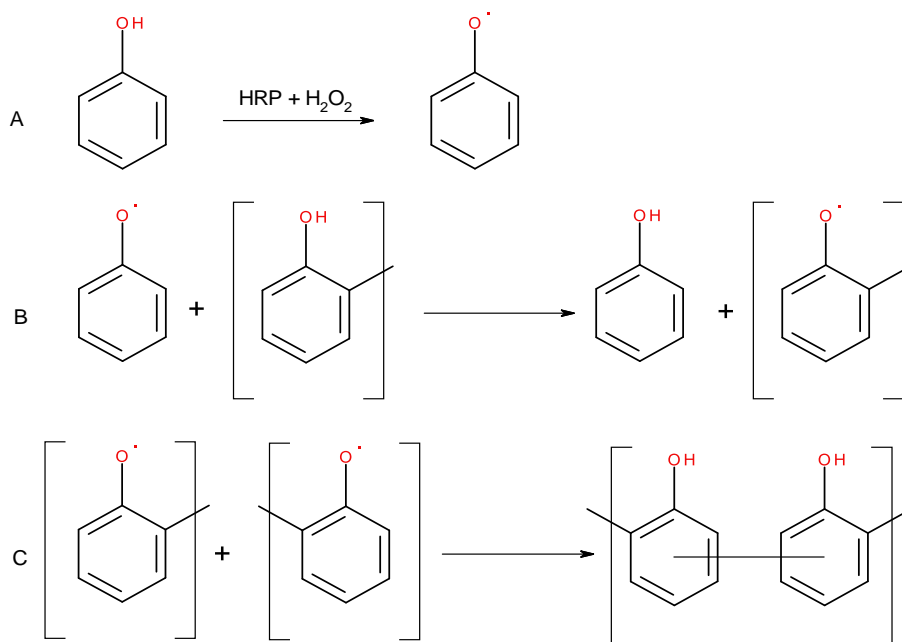
První krok spočívá v začlenění jednoho atomu kyslíku pocházejícího z peroxidu vodíku do nativní HRP. Tímto způsobem vzniká meziprodukt HRP I, který obsahuje ve své struktuře atom Fe^{IV} a nově vzniklý porfyrinový kationtový radikál. HRP I je o 2 oxidační stupně výše než klidový stav enzymu. Mechanismem jednoelektronové redukce je HRP I schopna oxidovat příslušné substráty, což vede k tvorbě druhého enzymového meziproduktu HRP II, který obsahuje taktéž hemovou skupinu s atomem Fe^{IV} , ale na rozdíl od HRP I má nižší oxidační stupeň než klidový stav HRP. HRP II poté redukuje další jednoelektronovou redukcí molekulu substrátu za vzniku radikálu, zatímco sloučenina HRP II je převedena zpět do nativního stavu (Azevedo A. M. et al., 2003; Veitch, 2004).

Procesem oxidace tedy vznikají dva volné radikály, které se spojují za vzniku dimerů. Pokud ve vodě rozpustné dimery spolu znovu reagují s HRP, vzniká ještě větší počtem volných radikálů. Tyto radikály se kombinují za vzniku polymerů, které lze z roztoku vysrážet. (Vasudevan P.T., Li L.O., 1996). Aby volné radikály byly schopné polymerizovat je nutné vybrat vhodný druh substrátu, vhodné reakční médium, hodnotu pH a také je nutné, aby reakční poměr peroxidu k substrátu byl 0,5:1. V případě jednoelektronové oxidace fenolů vznikají fenoxylové radikály, které vzájemnou rekombinací a přenosem radikálů vytvářejí polymery fenolů (Obrázek 10).

Pokud je při této reakci využit běžný katalyzátor obvykle vznikají nerozpustné produkty. Naproti tomu peroxidásová katalýza umožňuje tvorbu rozpustných produktů. Při této katalýze je reaktivní p-fenol blokován, takže k vzniku radikálu dochází hlavně v poloze ortho (Reihmann, M., Ritter, H. 2006; Vasudevan P.T., Li L.O., 1996).



Obrázek 9 Katalytický cyklus HRP, znázorňující enzymové meziprodukty HRP I, HRP II, substráty (AH) a radikálové produkty A^\bullet ; upraveno a převzato z Azevedo A. M., 2003.

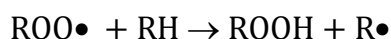


Obrázek 10 Polymerace fenolů katalyzovaná HRP. V části A dochází k vzniku fenoxylových radikálů v důsledku reakce fenolu s HRP a peroxidem vodíku. V části B spolu dvě molekuly radikálu dimerizují a dochází k přenosu radikálů mezi monomerním fenoxylovým radikálem a polymerem fenolu za vzniku radikálního polymeru fenolu. V části C spolu reagují dva radikálové polymery fenolu za vzniku polymeru fenolu; upraveno a převzato z de Regil, Ruben de R., Georgina S., 2013.

3.4.2 Molekulární kyslík

Organické látky jako jsou potraviny, jedlé oleje, léčiva a různé kosmetické přípravky podléhají spontánní oxidaci vyvolané působením molekulárního kyslíku, která vede ke změně jejich fyzikálně-chemických vlastností. Tento proces se obecně nazývá autooxidace. Prakticky všechny organické sloučeniny jako jsou lipidy, proteiny, sacharidy a nukleové kyseliny podléhají autooxidaci. Nejvíce náchylné k této reakci jsou nenasycené sloučeniny, které obsahují ve své struktuře slabé C-H vazby s alkylovými substituenty. Látky podléhající autooxidaci se nejprve převádějí na hydrogenperoxydy a následně na alkoholy, ketony, aldehydy, kyseliny a estery (Lucarini M., Pedulli G. F., 2010).

Mechanismus autooxidace probíhá ve třech krocích (Obrázek 11). V prvním iniciačním kroku, se působením tepelné nebo světelné energie na organický substrát vytváří volný radikál organické látky ($R\bullet$) a radikál vodíku ($H\bullet$). Iniclace je katalyzovaná ionty kovů jako jsou Cu^{2+} , Ni^{2+} a Fe^{3+} . Ve druhém kroku (propagace) se molekulární kyslík váže s volným radikálem, což vede k vytvoření peroxidového radikálu ($ROO\bullet$). Tento radikál poté přijímá atom vodíku z molekuly substrátu za vzniku nového radikálu ($R\bullet$) a hydrogenperoxidu ($ROOH$). Celý proces je ukončen terminační reakcí, ve které se dva peroxidové radikály spojují a vzniká neradikální produkt. Tímto krokem se zastaví celá řetězová reakce (Lucarini M., Pedulli G. F., 2010; Loftsson T., 2014).



Obrázek 11 Mechanismus autooxidace organických sloučenin; upraveno a převzato z Lucarini M., Pedulli G. F., 2010.

3.5 Kultivace buněčných linií *in vitro*

Mezi základní techniky využívané v základním a aplikovaném výzkumu patří práce s buněčnými kulturami. Mezi velké výhody buněčných kultur oproti využívání pokusných modelů zvířat patří snadná kultivace a krátká doba pro získání přesně definovaného buněčného materiálu. Kultivované buňky se pěstují *in vitro*, tedy za nefyziologických podmínek, tudíž nemusí dobře odrážet poměry za podmínek *in vivo*.

Primární buněčná kultura vzniká přímou izolací buněk z laboratorního potkana, myši, králíka nebo člověka. Poté, co se buňky namnoží a následně se přenesou do nových kultivačních nádob, vzniká sekundární kultura. Tento proces se nazývá pasážování buněk a je nutné jej pravidelně opakovat. U buněk pocházející z normálních tkání dochází po několika pasážích k zestárnutí kultury, kdy se buňky přestanou dělit a postupně umírají. Proto se nejčastěji kultivují buňky nádorové, které se lépe množí a nepodléhají stárnutí.

Růst buněčných kultur lze rozdělit do několika fází. První fází je lag-fáze, která je charakteristická nízkým počtem buněk a pomalým rozmnožováním. Je to způsobeno tím, že koncentrace růstových faktorů je příliš nízká a buňky jsou daleko od sebe a nemůžou mezi sebou komunikovat. Tato fáze je typická pro buňky, které se přenesly do nového kultivačního média. V log-fázi se buňky v kultuře množí přibližně exponenciálně až do doby, kdy dojde ke kontaktní inhibici a jsou vyčerpány všechny živiny neboli fáze stacionární (dosažení plató). A právě před dosažením této fáze je nutné kulturu naředit a přenést do nových kultivačních nádob v takovém množství, aby opět kultura rostla exponenciálně. Aby se buňky odlepily od povrchu kultivační nádoby je nutné odstranit dvojmocné ionty vápníku a hořčíku pomocí chelátorů (např. EDTA) a krátkou dobu na buňky působit proteázou (např. trypsin).

Aby probíhala kultivace buněk úspěšně je nutné zajistit vhodné podmínky. Mezi nejdůležitější podmínky patří povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média a také teplota a složení atmosféry v inkubátoru. Jelikož se ke kultivaci využívají především adherentní buňky, je nutné, aby byl povrch kultivační nádoby hydrofilní z toho důvodu se používají nádoby vyrobené z polystyrenu. Kultivační teplota se pohybuje blízko teplotě zdrojového organismu, tedy 37 °C. Atmosféra v inkubátoru se obvykle obohacuje o 5 % oxidu uhličitého, který odpovídá reálnému množství v extracelulární tekutině. V inkubátoru se také musí udržovat vysoká 90 % vlhkost, z toho důvodu, aby se nezačala odpařovat voda z média. Složení kultivačních médií má podobné složení jako extracelulární tekutina a umožňuje výdej oxidu uhličitého a příjem kyslíku. Kultivační média obsahují anorganické soli, pufrů, glukosu, bílkoviny, vitamíny, růstové faktory a stopové prvky. Často se do média přidává krevní sérum, a to především fetální sérum, ve kterém je vyšší obsah růstových faktorů, které urychlují růst buněk. Pro správnou proliferaci je také důležité udržovat stálou hodnotu pH a udržovat osmotický tlak média. To zajišťují směsi vhodných anorganických solí a oxid uhličitý. Základním zdrojem energie pro buňky je glukosa a také glutamin. Aby nedošlo

ke kontaminaci bakteriemi musí se do médií přidávat antibiotika, a to především penicilin a streptomycin.

S buněčnými kulturami se musí manipulovat pouze ve sterilních podmínkách z tohoto účelu se využívá laminárních boxů (Vejražka M., 2008).

3.6 Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou látky, které tlumí nežádoucí účinky reaktivních forem kyslíku a dusíku, čímž chrání buňku před poškozením. Reaktivní formy se vytváří během fyziologických dějů probíhajících v buňkách, kde slouží jako zdroj energie, metabolitů a jako ochrana před různými mikroorganismy. Nežádoucím účinkem těchto reaktivních forem je možnost vzniku oxidačního stresu. Oxidační stres vzniká v důsledku nedostatku antioxidačních látek nebo nadměrnou oxidací biologických procesů v těle, které následně narušují biologickou funkci proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Pokud oxidační stres v organismu přetrvává delší dobu, může vyústit v řadu různých onemocnění.

Mezi antioxidační látky se řadí vitaminy (C, E, A a skupiny B), aminokyseliny (methionin, histidin, arginin, cystein, glycin), proteiny a enzymy (albumin, thioredoxin, bilirubin, tranferin, superoxidodismutasa, katalasa, peroxidasa), rostlinné polyfenoly (deriváty kyseliny hydroxyskořicové, flavonoidy, stilbeny, lignany, karotenoidy), minerály (zinek, železo, měď, selen, chrom) a metabolity (kyselina močová nebo lipoová) (Cornelli U., 2009).

Hlavním mechanismem obrany proti oxidačnímu a elektrofilnímu stresu je aktivace transkripčního faktoru nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2), který řídí expresi cytoprotektivních genů, které kódují antioxidační proteiny, detoxikační proteiny I a II fáze, transportní proteiny, proteasomy a růstové faktory. Všechny tyto geny obsahují v oblasti promotoru antioxidační responzivní elementy (ARE) sloužící jako vazebné místo pro Nrf2. Za fyziologických podmínek se Nrf2 nachází v buňce v neaktivním stavu. Za deaktivaci zodpovídá protein Keap1, který negativně reguluje aktivitu Nrf2. Následkem oxidačního nebo elektrofilního stresu v buňce dochází k odštěpení proteinu Keap1 od transkripčního faktoru Nrf2 a tedy i k jeho aktivaci. Následuje translokace aktivního Nrf2 do buněčného jádra, kde indukuje transkripci cytoprotektivních genů.

Ve stresových situacích je aktivace Nrf2 důležitá pro udržení celkové homeostázy buněk a pro zabránění vzniku nemocí. Nedostatečná aktivita signální dráhy Keap1–Nrf2–ARE zhoršuje oxidační a zánětlivá poškození buňky, které souvisí s mnoha onemocněními, včetně Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, chronické obstrukční plicní choroby, astmatu, aterosklerózy, cukrovky, roztroušené sklerózy a revmatoidní artritidy. Škodlivá je i nadměrná aktivita této signální dráhy, jelikož může podporovat růst nádorů, a proto právě u maligních buněk by měla být aktivita Nrf2 inhibována, tak aby se narušila vnitřní homeostáza a poté došlo k inaktivaci obraných mechanismů buňky a zvýšila se účinnost chemoterapeutických léčiv (Lu M. Ch. et al., 2016; Nguyeny T., Nioi P., Pickett C.B., 2009).

3.7 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální látky se využívají k ochraně a samotné terapii infekčních onemocnění. Ty látky, které jsou při přípravě chemicky se označují jako chemoterapeutika. Jako antibiotika se označují látky mikrobiálního původu. Podávaná dávka antimikrobiálního léčiva musí být dostatečně velká na to, aby usmrtila nebo alespoň inhibovala růst mikroorganismu, ale zároveň nenarušila normální činnost organismu.

Chemoterapeutickým indexem vyjadřuje poměr mezi dávkou toxickou pro hostitelský organismus a dávkou účinnou při mikroorganismu. Podle jejich účinku lze antimikrobiální látky rozdělit do dvou skupin baktericidní a bakteriostatické. Baktericidní účinky jsou takové, které usmrtí mikroba rychle a ireverzibilně do 48 hodin. Využívá se jich u vážných stavů a při snížené imunitě nemocného. Bakteriostatické látky zastavují reverzibilně růst a množení mikrobů. Klinický efekt bývá patrný do 3 až 4 dnů. Pokud se přeruší léčba těmito látkami, mohou se mikroby opět začít množit.

Mechanismus účinku antimikrobiálních látek spočívá v tom, že dochází k inhibici syntézy buněčné stěny, nukleových kyselin, proteinů anebo také k poškození funkce buněčné membrány. Účinnost antimikrobiálních látek se vyjadřuje minimální inhibiční koncentrací (MIC), minimální baktericidní koncentrací (MBC) a minimální bakteriostatickou koncentrací (MBS). Hodnota MIC je nejnižší naměřená antimikrobiální látky, která inhibuje růst a množení cíleného mikroorganismu. Hodnota MBC je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která je schopna bakteriální kulturu usmrtit (Votava M., Broukal Z., Vaněk J. 2007).

3.8 Cytotoxická aktivita

Cytotoxicita je vlastnost některých chemických látek vyvolat změny v morfologii buňky a tím narušit buněčnou signalizaci, proliferaci a celkový metabolismus buňky. Některé cytotoxické látky však pro buňky nejsou nebezpečné, jelikož je dokáží metabolizovat na netoxické produkty.

Pokud vlivem toxických látek dojde k narušení funkce buňky, která se velmi již velmi liší od fyziologického stavu, nastává buněčná smrt. Pokud se naruší buněčná membrána, začne do buňky proudit voda spolu s extracelulárními ionty, celá buňka zvětší svůj objem a nakonec praskne. Cytoplazmatický obsah včetně lysozomálních enzymů se dostane do extracelulární tekutiny, kde způsobí zánětlivou reakci. Tento patofyziologický způsob buněčné smrti se nazývá nekróza nebo také nekontrolovatelná buněčná smrt. Naopak apoptóza je fyziologický proces zániku buňky vyvolaný především nedostatkem růstových faktorů nebo změnou hormonálního prostředí buňky. Následně dochází k smrštění buněk, aktivaci kaspáz a fragmentaci chromozomů. Výsledkem apoptózy je vznik apoptických tělísek, která jsou rychle rozpoznána s následně fagocytována (Miret S., et al., 2006).

Pro testování cytotoxicity *in vitro* se v současnosti nejvíce využívají tkáňové kultury, proto, aby se nemuselo testování provádět na pokusných zvířatech s nimiž souvisí mnoho etických pravidel, které je nutné při práci v laboratoři dodržovat (Vejražka M., 2008).

Narušení metabolické aktivity snižuje nebo dokonce inhibuje mitochondriální a cytoplazmatickou aktivitu enzymů. Toho lze využít k detekci životaschopnosti buněk specifickými biomarkery nebo indikátorovými reakcemi. Kvantifikací adenosintrifosfátu lze měřit celkovou viabilitu buněk. Jiné testy jsou založené na redukční síle koenzymů oxidoreduktáz, která je využívána k přeměně substrátů na barevné produkty, které lze detekovat změnou emisní vlnové délky.

Účinky akutní toxicity se vyjadřují jako letální dávka označující se LD₅₀ nebo letální koncentrace, LC₅₀. Představují takovou dávku toxické látky, která je schopna usmrtit právě polovinu exponované populace (Ukelis U., et al., 2008).

3.9 Anthelmintická aktivita

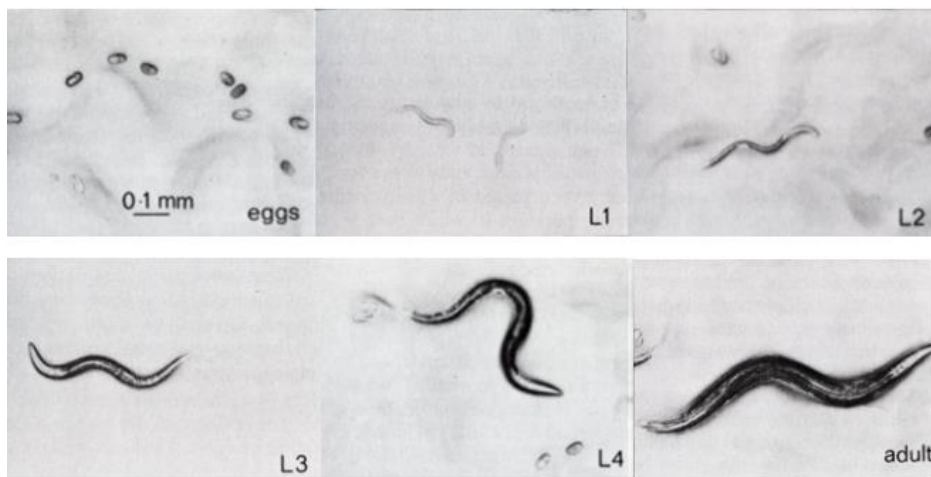
Parazitické hlístice jsou mnohobuněčné organismy schopné narušovat tkáň hostitelů mnoha živočišných druhů včetně člověka. Jsou to také častí parazité rostlin, jenž mají

za následek snížení celosvětové produkce mnoha zemědělských plodin, a tedy představují globální hrozbu pro zajištění dostatečného množství potravin. K řešení tohoto problému se využívá anthelmintik, což jsou léčivé látky, které působí proti infekcím způsobenými hlísticemi. Avšak velkým problémem těchto anthelmintických látek je to, že postupem času dochází k rezistenci hlístic k používaným látkám (Holden-Dye L., Walker J. R., 2014).

Modelovým organismem pro studium anthelmintických účinků se stalo háďátko obecné neboli *Ceanorhabditis elegans*. *C. elegans* je bakteriemi živící se půdní hlístice, které nežije parazitickým způsobem života. Vzhledem k tomu, že tato hlístice je fylogeneticky příbuzná parazitickým hlísticím, lze předpokládat, že pokud bude testovaná látka účinná proti *C. elegans* bude zároveň účinná i proti parazitujícím druhům. Mezi další výhody využití modelového organismu *C. elegans* patří jeho krátký životní cyklus, který trvá pouze 3 dny při kultivační teplotě 20 - 25 °C. Cyklus zahrnuje čtyři larvální stádia L1 – L4 (Obrázek 12). Kultivace probíhá na agarových miskách, které byly předem naočkovány bakterií *Escherichia coli*, která slouží *C. elegans* jako zdroj potravy. Po celou dobu vývoje tedy od vajíčka až po dospělce jsou tyto červi průhledné, což usnadňuje mikroskopické pozorování struktur těla a umožňuje jejich barvení. Při dlouhodobém uschování *C. elegans* se populace háďátek většinou L1 a L2 zmrazuje v tekutém dusíku na neomezeně dlouhou dobu (Bürglin T. R. et al., 1998).

Za mechanickou odolnost těchto červů může především polysacharid chitin, který je součástí vaječných obalů. A právě proto je chitin považován za cílovou molekulu, která může ovlivnit vylíhnutí larev *C. elegans*. V současné době se tedy zvyšuje zájem o chitinázové enzymy, které představují potenciální řešení k ochraně hostitelů před nematody (Gortari C. M., Hours A.R., 2008).

Při testování látek s potenciálně anthelmintickými vlastnostmi se využívá chitinázového testu. Tento test umožňuje určit množství vylíhnutých potomků, které byly předem ovlivněny testovanými látkami. Princip tohoto testu spočívá v aktivaci enzymu chitinasy, který rozkládá vaječné obaly hlístic. Část tohoto enzymu se také uvolňuje do kultivačního média, kde jej lze detekovat pomocí fluorogenních substrátů chitinasy. Principem tohoto testu je, že pokud testovaná látka ovlivňuje negativně produkci vajíček tedy je toxická, bude pozorována nižší aktivita chitinasy (Ellerbrock R. B. et al., 2004).



Obrázek 12 Vývojová stádia *Caenorhabditis elegans*. V levém horním rohu vajíčka, larvální stádia L1-L4 a v pravém dolním rohu dospělý hermafrodit; upraveno a převzato z Sutphin G. L., Kaeberlein M., 2009.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie, roztoky a média

Necílená syntéza směsí

Aceton, VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, Česko

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt, Německo

Hexakynoželezitan draselný, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kyselina octová, VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, Česko

Methanol, VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, Česko

Methylester kyseliny p-kumarové, katedra organické chemie, UP Olomouc

Octan sodný, PENTA, Praha, Česko

Peroxid vodíku, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Peroxidase from horseradish type II, Sigma Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Uhličitan draselný, Lach-ner, Neratovice, Česko

Kultivace buněčných linií, testování aktivace transkripčního faktoru Nrf2 a cytotoxické aktivity

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA):

- 8 g NaCl, PENTA, Praha, Česko
- 1 g glukosa, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 2 g KCl, PENTA, Praha, Česko
- NaHCO₃, PENTA, Praha, Česko
- 0,2 g EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

10x fosfátový pufr (PBS):

- 23,1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA 2 g KH₂PO₄, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 80 g NaCl, PENTA, Praha, Česko
- 2 g KCl, PENTA, Praha, Česko
- rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

Kultivační médium EMEM:

- 440 ml EMEM médium (M0643), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody a poté bylo přidáno 2,2 g/l NaHCO₃, PENTA, Praha, Česko
- přefiltrováno přes sterilní filtrační papír a přidáno:
- 50 ml fetální sérum (S00D41000B), Biowest, Riverside, USA
- 5 ml antibiotikum penicillin-streptomycin (P4333-100ML), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 5 ml glutamin (G7513-100ML), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kultivační médium DMEM:

- 440 ml DMEM médium (D5523), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 50 ml fetální sérum (S00D41000B), Biowest, Riverside, USA
- 5 ml antibiotikum penicillin-streptomycin (P4333-100ML), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 5 ml glutamin (G7513-100ML), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Trypsin:

- 25 ml trypsin solution from porcine pankreas (T4549-100ML), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 25 ml EDTA

Kultivační médium EMEM/DMEM s 1 % glutaminu:

- 0,4 ml glutamin (G7513-100ML), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 40 ml základní médium EMEM/DMEM

Lyzační pufr:

- 12,1 mg 10 mM Tris, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 3,08 mg 2 mM DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 7,3 mg 2 mM DCTA (trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid monohydrate), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- pH lyzačního pufru upraveno na hodnotu 7,8 pomocí 0,1 M NaOH

Flash Mix:

- 35,8 mg 20 mM tricin N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine)], Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 - 5,2 mg 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - 13,48 mg 2,67 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - 27,6 mg 5 mM ATP disodium salt, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - 10 μl ze zásobní roztok (9,4 mM v DMSO) 0,094 mM luciferin, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- pH Flash Mixu bylo upraveno na hodnotu 7,8 pomocí 0,1 M NaOH

Resazurin:

- 0,4 ml resazurin (6,25 mg/100 ml), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- 1,6 ml 1x PBS

Testování anthelmintické aktivity

K testování byl použit substrát pro chitinasu 4-metylbelliferyl β -D-N, N', N''-triacetylchitotriosid a pozitivní kontrola invermectin, které byly zakoupeny od firmy Merck, Darmstadt, Německo. Kvasnicový extrakt, trypton, pepton a agar pocházely z VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, Česko. Od firmy Lach-ner, Neratovice, Česko byly zakoupeny zbylé chemikálie.

Růstové médium pro nematoda:

- 1,2 g NaCl
 - 1 g pepton
 - 7,8 g agar
 - ddH₂O do 400 ml
 - 400 μl cholesterol (5mg/ml v ethanol)
- autoklávováno a po zchladnutí přidáno:
- 200 μl 1M CaCl₂ (sterilní)
 - 400 μl 1M MgSO₄ (sterilní)
 - 10 ml fosfátový pufr pH 6 (sterilní)

LB médium pro růst všech bakterií:

- 10 g trypton
 - 5 g kvasnicový extrakt
 - 10 g NaCl
 - ddH₂O do 1 l
- autoklávováno

Roztok pro vývojovou synchronizaci *C. elegans*:

- 8 ml voda
 - 1,5 ml roztok NaClO
 - 0,5 ml 10M NaOH
- připraveno čerstvé

Pufr na chitinázový test:

- 40 g NaOH
 - 75 g glycin
 - ddH₂O do 1 000 ml
- pH bylo srovnáno na hodnotu 10,6

S-bazální médium:

- 5,9 g NaCl
 - 50 ml fosfátový pufr (nesterilní)
 - 1 ml cholesterol (5mg/ml v ethanol)
 - ddH₂O do 1 000 ml
- autoklávováno

Fosfátový pufr:

- 136 g KH_2PO_4
- ddH₂O do 900 ml
- pH na 6,0 pomocí 5M KOH
- ddH₂O do 1 000 ml
- autoklávováno

Stopové prvky:

- 1,86 g Na_2EDTA
- 0,69 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,20 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 0,29 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,016 g CuSO_4
- ddH₂O do 1 000 ml
- autoklávováno

S-kompletní médium:

Do 1 000 ml S-bazálního média přidat:

- 10 ml fosfátový pufr (sterilní)
- 10 ml stopové prvky (sterilní)
- 3 ml 1M CaCl_2 (sterilní)
- 3 ml 1M MgSO_4 (sterilní)

M9 médium:

- 15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- 3 g KH_2PO_4
- 5 g NaCl
- 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ddH₂O do 1 l

Testování antimikrobiální aktivity

Bujón z mozkosrdcové infúze (M210-100G), HiMedia, Brno, Česko

Krevní agar (H1544), Trios, Praha, Česko

Anaerobní krevní agar (PB0111), Oxoid, Brno, Česko

Sabouraudův agar (PO0161), Oxoid, Brno, Česko

UHPLC-MS analýza směsí

Kyselina mravenčí, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Acetonitril (≥ 99,9%) pro LC-MS, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo

Methanol (≥ 99,9%), LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo

4.2 Biologický materiál

K testování biologické aktivity byly použity nenádorové buněčné linie BJ pocházející z American Type Culture Collection, USA a adherentní buněčné linie EpRE-LUX. K vývoji EpRE-LUX byly využity buněčné linie lidského hepatoblastomu HepG2 a Hepa-1c1cc7 linie odvozená z myšího hepatocelárního karcinomu.

Ke studiu anthelmintických účinků byla použita wild-type linie *Caenorhabditis elegans* N2 a bakterie *E. coli* OP50 pocházející z *Caenorhabditis* genetic center, Minnesota, USA.

Antimikrobiální aktivita byla testována na celkem 9 bakteriálních kmenech (Tabulka 1). Bakteriální kmeny s číslem kmene začínající na CCM pocházely z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně a referenční kmen označený ATCC pocházel z American Type Culture Collection se sídlem ve Virginii.

Tabulka 1 Referenční bakteriální kmeny.

Druh	Číslo kmene
Grampozitivní koky	
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 3953
<i>Streptococcus mutans</i>	CCM 7409
Grampozitivní tyčinky	
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010
Grampozitivní anaerobní koky/tyčinky	
<i>Actinomyces odonytolyticus</i>	CCM 4740
<i>Clostridium perfringens</i>	CCM 4435
Gramnegativní tyčinky	
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
Kvasinky	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028

4.3 Přístrojové vybavení

Necílená syntéza směsí

Analytická váha RADWAG AS 220.R2, RADWAG, Šumperk, Česko

Laboratorní magnetická míchačka Heidolph MR 3001 K, Heidolph, Německo

Ozone module, ThalesNano, Budapešť, Maďarsko

Vakuová rotační odparky Interface I-300, Büchi, Švýcarsko

Analytická váha OHAUS Pioneer PA214C, Ohaus, Parsippany, USA

Dusíková odparka TurboVap, Biotage, Uppsala, Švédsko

Třepačka BioSan Vortex V-1 plus, BioSan, Riga, Lotyšsko

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic cleaner, VWR International s.r.o., Stříbrná Skalice

Termoblok WiseTherm HB-R, Witeg, Wertheim, Německo

Automatické pipety labopette®, Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, Německo

Kultivace buněčných linií, testování aktivace transkripčního faktoru Nrf2 a cytotoxické aktivity

Laminární box typ BIO, Alpina, Konin, Polsko

CO₂ inkubátor Sanyo Galenkamp, Sanyo, Osaka, Japonsko

Mikroskop Olympus CK2, Olympus, Tokio, Japonsko

Multikanálová automatická pipeta Eppendorf Xplorer, Eppendorf, Říčany u Prahy, Česko

Pipetor Accu-Jet, BRAND, Wertheim, Německo

Třepací inkubátor Thermoshaker, Grant-bio, Pensylvánie, USA

pH metr, Lab Phenomenal, VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, Česko

Hlubokomrazící box New Brunswick Innova, New Brunswick Scientific, Ontario, Kanada

Multidetekční reader infinite M200 PRO, TECAN, Männedorf, Švýcarsko

Testování anthelmintické aktivity

Analytická váha ER-182A, A&D Company, Tokyo, Japonsko

Třepací inkubátor MB-102, BIOER, Hangzhou, Čína

Multidetekční reader infinite M200 PRO, TECAN, Männedorf, Švýcarsko

8 kanálová pipeta Transferpette S-12, BRAND, Wertheim, Německo

Mikrocentrifuga C1301-B, Labnet International, Edison, USA

Pipetor SWIFTPET PRO, HTL, Varšava, Polsko

Světelný mikroskop Leica DMIL LED, Progolab s.r.o, Praha, Česko

Stereo mikroskop ICD LED, Bresser, Rhede, Německo

Inkubátor na bakterie *E.coli* při (37 °C), Medline, Chalgrove, Velká Británie

Chlazený inkubátor Q-Cell, POL-LAB, Wilkowice, Polsko

Laminární box aura HZ 72 T, BIOAIR, Siziano, Itálie

Centrifuga BR4i, Jouan, Pays de la Loire, Francie

Třepačka IKA KS 260 basic, IKA, Staufen, Německo

Automatické pipety, Eppendorf, Říčany u Prahy, Česko

Testování antimikrobiální aktivity

Látalův anaerobní systém, Trios, Praha, Česko

Hlubokomrazící box, Sanyo, Osaka, Japonsko

Kahan, Trystom s.r.o., Olomouc, Česko

Laboratorní inkubátor Ecocell, BMT Medical Technology s.r.o., Brno, Česko

MIC inokulátor kalibrovaný na 1 μ l, Trios, Praha, Česko

Mikrotitrační destička U, Grama Group a.s.

12 kanálová pipeta, Eppendorf, Říčany u Prahy, Česko

UHPLC-MS analýza směsí

Hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si, Waters, Etten-Leur, Nizozemsko

MassLynx, ver. 4.0, Micromass, Manchester, Velká Británie

4.4 Necílená syntéza směsí

Výsledná koncentrace směsí 1–4 odpovídala **50 mM MEKK** (8,5 mg/ml). Takto připravené směsi byly uskladněny v tmavé, skleněné nádobě v chladničce. Koncentrace směsí 5–6 odpovídala **70 mM MEKK** (12,7 mg/ml). Tyto směsi byly uskladněny v mrazničce při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.1 Postup přípravy směsi produktů oxidace 1

Za laboratorní teploty $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo rozpuštěno 100 mg methylesteru kyseliny p-kumarové (MEKK) spolu s hexakvanoželezitanem draselným (18,44 mg, 10 % molární koncentrace MEKK) v 6 ml methanolu. Takto vzniklá směs byla na magnetické míchačce míchána a současně do této směsi byl po dobu 30 min přiváděn molekulární kyslík (100 ml/min). Po ukončení oxidace byl výsledný roztok přefiltrován do tmavé uzavíratelné skleničky a odpařen na rotační vakuové odparce. Poté bylo k 85 mg vzniklého odparku, přidáno 10 ml dimethylsulfoxidu (DMSO).

4.4.2 Postup přípravy směsi produktů oxidace 2

Testovaná směs 2 byla připravena stejným způsobem jako směs 1 s tou výjimkou, že do směsi byl navíc přidán bezvodý uhličitan draselný (774 mg, 10 ekvivalentů).

Následující postup rozpuštění, přefiltrování, odpaření rozpouštědla a rozpuštění v DMSO byl stejný jako při přípravě směsi 1.

4.4.3 Postup přípravy směsi produktů oxidace 3

Krystalická látka MEKK (100 mg) byla rozpuštěna spolu s hexakynoželezitanem draselným (18,44 mg, 10 % molární koncentrace MEKK) a octanem sodným (460 mg, 10 ekvivalentů) v 6 ml methanolu. Následující postup rozpuštění, přefiltrování, odpaření rozpouštědla a rozpuštění v DMSO byl stejný jako při přípravě směsi 1.

4.4.4 Postup přípravy směsi produktů oxidace 4

Stejně jako v předchozích případech bylo 100 mg MEKK rozpuštěno v 6 ml methanolu s hexakynoželezitanem draselným (18,44 mg, 10 % molární koncentrace MEKK). Poté byla do směsi přidána kyselina octová (0,32 ml, 10 ekvivalentů). Následující postup rozpuštění, přefiltrování, odpaření rozpouštědla a rozpuštění v DMSO byl stejný jako při přípravě směsi 1.

4.4.5 Postup přípravy směsi produktů oxidace 5

Do mikrozkušavky byl připraven 1 ml, 10^{-2} M roztoku 35% acetonu, ve kterém bylo rozpuštěno 1,9 mg MEKK. Mikrozkušavka byla následně umístěna na vortex a míchána po dobu 1 minuty, poté byla přenesena na 5 minut do ultrazvukové lázně. Roztok byl rozdělen do pěti mikrozkušavek a doplněn do 1 ml 35% acetonem na koncentraci $2 \cdot 10^{-3}$ M. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 3 μ l 30% peroxidu vodíku a 50 μ l roztoku HRP (1 mg/ml), který spustil peroxidásovou reakci. Po dobu 60 minut byly mikrozkušavky ponechány na temném místě v laboratoři. Proto, aby se zastavila reakce byly vzorky přeneseny na 5 minut do termobloku vyhřátého na 95 °C. Poté byly směsi přeneseny na dusíkovou odparku, kde byly přes noc odpařeny a následně rozpuštěny v 150 μ l DMSO.

4.4.6 Postup přípravy směsi produktů oxidace 6

V mikrozkušavce bylo smícháno 1 ml 35% acetonu, 3 μ l 30% peroxid vodíku a 50 μ l roztoku HRP (1 mg/ml). Následně se mikrozkušavka nechala hodinu na temném místě při laboratorní teplotě. Po uplynutí 60 minut byla zkušavka přenesena na 5 minut do termobloku vyhřátého na 95 °C. Nakonec byl vzorek odpařen, rozpuštěn v 150 μ l DMSO.

4.5 Testování aktivace transkripčního faktoru Nrf2 a cytotoxické aktivity

4.5.1 Kultivace buněčných linií

Pro kultivaci buněčné linie EpRE-LUX bylo použito kultivační médium EMEM, které bylo obohaceno o 10 % fetálního séra, 1 % antibiotika penicilin–streptomycin a 1 % aminokyseliny glutaminu. Pro kultivaci BJ buněčné linie bylo použito kultivační médium DMEM, které bylo taktéž obohaceno o 10 % fetálního séra, 1 % antibiotika penicilin-streptomycin a 1 % glutaminu. Buněčné linie byly uchovávány v plastových kultivačních lahvích a veškerá manipulace s buňkami probíhala vždy za sterilních podmínek v prostředí laminárního boxu. EpRE-LUX linie buněk poměrně rychle rostla, proto byla pasážována jednou za 2 dny, zhruba na 25 %. Pasáž u BJ linie probíhala jednou za 3 dny na 40 %, jelikož tyto buňky rostly ve srovnání s EpRE pomaleji. Inkubování buněk probíhalo při 37 °C a atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého.

Pasážování buněk

Všechny potřebné roztoky: trypsin, kultivační médium a 1x PBS byly přeneseny z chladničky do vodní lázně, aby se ohřály na teplotu 37 °C. Roztoky se poté přenesly do sterilního laminárního boxu. Nárůst buněk či případná kontaminace byla před každým pasážováním zkontrolována pod mikroskopem.

Pomocí sterilní skelněné Pasteurovy pipety bylo ze stěny láhve odsáto staré kultivační médium. K buňkám bylo poté přidáno 5 ml 1x PBS, tak aby se buňky neodlepily od stěn láhve. Buňky byly promyty opatrným nakláněním láhve a následně bylo pomocí Pasteurovy pipety odsáto PBS se starým médiem do odpadu. Přímo na buňky byly přidány 2 ml trypsinu, které se následně nechaly inkubovat spolu s buňkami 3 minuty při 37 °C v termostatu. Po inkubaci bylo zkontrolováno uvolnění buněk z povrchu kultivační láhve pod mikroskopem. K buňkám bylo přidáno 8 ml nového kultivačního média a tím došlo k neutralizaci působení trypsinu. Skleněnou pipetou byla buněčná suspenze několikrát promíchána.

V kultivační láhvi bylo ponecháno podle vizuálního zhodnocení nárůstu asi jen 20–40 % buněk. Buňky, které zbyly asi 70–80 % byly využity k testování biologické aktivity připravených směsí. K buňkám, které zůstaly v kultivační láhvi bylo doplněno

kultivační médium na celkový objem 15 ml. Tímto způsobem zpasážovaná kultivační láhev s buňkami byly uložena v inkubátoru na 2–3 dny a poté znovu zpasážována.

4.5.2 Aktivace Nrf2 dráhy

Aktivace Nrf2 dráhy byla studována na EpRE-LUX buněčné linii. První dva dny probíhalo testování v laminárním boxu, třetí den se již pracovalo za nesterilních podmínek laboratoře.

První den:

Počítání buněk v Bürkerově komůrce:

Pomocí pipety bylo přeneseno 10 µl promíchané buněčné suspenze po stěně krycího skla na Bürkerovu komůrku. Pod světelným mikroskopem bylo spočítáno 5 polí Bürkerovy komůrky a poté se vypočetl průměrný počet buněk v jednom čtverci. Podle počtu spočítaných buněk byla naředěna buněčná suspenze, tak aby v každé jamce bylo 150 µl buněčné suspenze s 2 000 buňkami. Objem buněčné suspenze a kultivačního média byl spočítán podle obrázku 13. Ředění bylo provedeno ve sterilní Petriho misce a následně dobře promícháno.

$$\text{Objem buněčné suspenze} = \frac{\text{počet jamek} \cdot \text{počet buněk na jamku (tj. 20 000)}}{\text{průměrný počet buněk} \cdot \text{počet buněk v 1 ml (tj. 10 000)}}$$

$$\text{Objem kultivačního média} = (\text{počet jamek} \cdot 0,15) - \text{objem buněčné suspenze}$$

Obrázek 13 Vzorce pro výpočet potřebného množství buněčné suspenze a kultivačního média.

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo vysazeno 8-kanálovou pipetou EpRE-LUX buňky, tak aby se v každé jamce bylo přítomno 2 000 buněk a objem buněčné suspenze byl 150 µl. Buňky se nasadily do jamek 12 E-H. Po vysazení buněk se titrační destičky nechaly inkubovat do dalšího dne při 37 °C.

Druhý den:

Do sterilních rezervoárů byly připraveny směsi médií EMEM s 1 % glutaminem a rozpuštěnými testovanými vzorky 1–6. Před aplikací testovaných směsí k buňkám, byly všechny směsi 200x naředěny, aby koncentrace DMSO nepřevyšovala 0,5 %. Výsledná koncentrace směsí 1–4 odpovídala 250 μM případně u směsí 5–6 odpovídala 350 μM .

Od každé testované směsi byla desítkovým ředěním připravena koncentrační řada čtyř koncentrací (Tabulka 2). Před každým ředěním bylo důležité dobře promíchat připravené roztoky směsí s kultivačním médiem.

Staré kultivační médium bylo plynule odsáto skelněnou Pasteurovou pipetou ze stěn všech jamek, tak aby nedošlo k odsátí vysazených buněk. Do jamek bylo přidáno pomocí 4-kanálové pipety 150 μl naředěných testovacích a kontrolních roztoků. Buňky ošetřené směsí produktů oxidace byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.

- pozitivní kontrola: 100 μM , 10 μM , 1 μM a 0,1 μM kyselina lipoová
- negativní kontroly: DMSO v koncentraci odpovídající nejvyšší koncentraci testovaných směsí a médium s buňkami
- blank: médium bez buněk

Tabulka 2 Rozmístění a koncentrace testovaných směsí na mikrotitrační destičce při testování aktivace Nrf2 a cytotoxicity. Všechny směsi byly testovány v triplicátu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 μM kyselina lipoová			250 μM směs 1			250 μM směs 2			250 μM směs 3		
B	10 μM kyselina lipoová			25 μM směs 1			25 μM směs 2			25 μM směs 3		
C	1 μM kyselina lipoová			2.5 μM směs 1			2.5 μM směs 2			2.5 μM směs 3		
D	0.1 μM kyselina lipoová			0.25 μM směs 1			0.25 μM směs 2			0.25 μM směs 3		
E	250 μM směs 4			350 μM směs 5			350 μM směs 6			DMSO	médium	médium bez buněk
F	25 μM směs 4			35 μM směs 5			35 μM směs 6					
G	2.5 μM směs 4			3.5 μM směs 5			3.5 μM směs 6					
H	0.25 μM směs 4			0.35 μM směs 5			0.35 μM směs 6					

Třetí den:

Bylo odsáto kultivační médium s testovanými směsi i kontrolami. Do každé jamky se přidalo 100 μ l 1x PBS pufru a nechalo se 2 minuty v třepacím inkubátoru temperovaného na 37 °C, po promytí se pufr odsál do odpadu. Do každé jamky bylo napipetováno 8-kanálovou pipetou 50 μ l čerstvého lyzačního pufru. Mikrotitrační destička byla po dobu 15 minut uložena v lednici a pak na 3 hodiny ponechána při – 80°C v hlubokomrazícím boxu. Poté byla mikrotitrační destička s buňkami rozmrazena v třepacím inkubátoru vyhřátém na 37 °C. Všechny zlyzované buňky byly přeneseny do bílé 96-jamkové mikrotitrační destičky a přidalo se do každé jamky 100 μ l čerstvého Flash Mixu. Posledním krokem bylo změření luminiscence luciferinu na multidetekčním readeru v čase 0 minut, 2 minut, 5 minut, 10 minut a 15 minut.

4.6 Testování cytotoxické aktivity

První a druhý den probíhal experiment stejným způsobem jako u testování aktivity Nrf2 pouze s tím rozdílem, že druhý den se k buňkám přidaly testované směsi, které byly předem naředěny v čistém kultivačním médiu DMEM (Tabulka 2). Třetí den bylo odstraněno staré kultivační médium s testovanými směsmi a k buňkám se přidalo 20 μ l roztoku resazurinu. Buňky se poté nechaly inkubovat při 37 °C po dobu 3 hodin. Po skončení inkubace se změřila fluorescence resofurinu na multidetekčním readeru při excitační vlnové délce 535 nm a emisní 598 nm. Měření probíhalo v časech 0–60 minut vždy po 10 minutách.

4.7 Testování anthelmintické aktivity

Příprava bakteriální suspenze *Escherichia coli* (OP50)

Do Erlenmayerovy baňky bylo připraveno tekuté LB médium, do kterého se naočkovala jedna kolonie *E. coli* OP50 z kultivační misky. Inokulované médium bylo umístěno na třepačku a kultivovalo se 24 hodin při 37 °C. Vzniklá bakteriální suspenze se přenesla do předem zvážených zkumavek a stočila se v centrifuze při 3000 x g, po dobu 15 minut. Supernatant byl následně slit do tekutého odpadu a pelet se byl dvakrát omyt sterilní vodou. Zkumavky byly opět zváženy a pelet byl rozsuspendován v S-kompletním médiu tak, aby koncentrace bakteriální suspenze byla 60 mg/ml. Takto připravená suspenze byla uschována v lednici.

Sklízení a kultivace *C. elegans*

Na udržovací misku s růstovým médiem pro nematoda se napipetovalo S-kompletní médium. Následně byly skelněnou pipetou sklizena a přenesena všechna háďátka do čisté zkumavky. K takto vzniklé suspenzi hlístic byla přidána připravená bakteriální suspenzi *E. coli* OP50.

Vývojová synchronizace *C. elegans*

Populace *C. elegans* s velkým množstvím těhotných dospělců byla z agaru smyta M9 médiem a přenesena do mikrozkuavek. Mikrozkuavky byly zcentrifugovány po dobu 10 s a následně byl vzniklý supernatant odebrán. Stejným způsobem byla suspenze ještě dvakrát promyta od bakterií *E. coli* (OP50). Po omytí byl k háďátkům přidán roztok na vývojovou synchronizaci *C. elegans*, který rozpustil všechny vývojová stádia kromě stádia vajíček obsahující chitin. Připravené mikrozkuavky potom byly umístěny na třepací inkubátor nastavený na pokojovou teplotu při 1500 x g. Po vizuálním zhodnocení toho, že háďátka byla rozpuštěna obvykle po 5–10 minutách, došlo ke krátkému zcentrifugování a odsátí roztoku na vývojovou synchronizaci. Pelet vajíček byl třikrát promyt M9 médiem, 2x S-kompletním médiem a stočen na mikrocentrifuze. Očištěný pelet byl přenesen do centrifugační zkumavky a přidalo se k němu S-kompletní médium. Posledním krokem bylo umístit vajíčka přes noc na třepačku v inkubátoru při 20 °C a následující den sklídit L1 larvy, které byly použity v experimentu.

Aplikace reakčních směsí na populaci *C. elegans*

Vylíhnuté larvy L1 byly spočítány a stanovila se jejich koncentrace v 1 ml. Do sterilního rezervoáru byla připravena suspenze larev spolu s bakteriemi *E. coli* OP50, tak aby výsledná koncentrace bakterií v médiu činila 3 mg/ml.

Směsi byly testovány ve čtyřech koncentracích odpovídající 500–25 μ M MEKK u směsí 1–4, případně 700–35 μ M MEKK u směsí 5–6. Jako pozitivní kontrola byla zvolena látka ivermectin, jejíž koncentrace při nejvyšší testované koncentraci směsí byla 100 μ M a jako negativní kontrola pak roztok DMSO (Tabulka 3). Desky byly přelepeny folií, aby se zabránilo vypařování média a následně se nechaly inkubovat na třepačce (150 x g) při 20 °C po dobu 3 dní.

Tabulka 3 Rozmístění a koncentrace testovaných směsí 1–6 při testování anthelmintické aktivity. Všechny směsi byly testovány v triplicátu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	500 μ M směs 1			50 μ M směs 1			250 μ M směs 1			25 μ M směs 1		
B	500 μ M směs 2			50 μ M směs 2			250 μ M směs 2			25 μ M směs 2		
C	500 μ M směs 3			50 μ M směs 3			250 μ M směs 3			25 μ M směs 3		
D	500 μ M směs 4			50 μ M směs 4			250 μ M směs 4			25 μ M směs 4		
E	700 μ M směs 5			70 μ M směs 5			350 μ M směs 5			35 μ M směs 5		
F	700 μ M směs 6			70 μ M směs 6			350 μ M směs 6			35 μ M směs 6		
G	100 μ M ivermectin			10 μ M ivermectin			50 μ M ivermectin			25 μ M ivermectin		
H	1% DMSO			0.1% DMSO			0.5% DMSO			0.05% DMSO		

Chitinázový test

Po 3 dnech inkubace na třepačce byly *C. elegans* pozorovány v mikroskopu a byl zhodnocen jejich stav (mrtvé, zastavení vývoje, zpomalení vývoje, méně potomstva a vše v pořádku). Deska byla stočena (1 500 x g) 2 minuty, aby se zbavila kondenzace na fólii. Do jamek byl přidán substrát pro chitinasu (0,8 mM 4-metylbumbelliferyl β -D-N, N', N''-triacetylchitotriosid), deska se poté opět stočila (1 500 x g, 2 minuty) a ponechána 1 hodinu v inkubátoru při 37 °C. Na závěr byl do jamek přidán pufr pro chitinázový test a poté byla změřen signál fluorescence při excitační vlnové délce 360 nm a emisní 460 nm.

4.8 Testování antimikrobiální aktivity

Kultivace a uchování bakterií

Mikroorganismy byly uchovány v hlubokomrazícím boxu při – 80 °C v kryozkumavkách. Z kryozkumavek byly bakteriální kultura vyočkována pomocí sterilní bakteriologické kličky na krevní agar a následně inkubována při 37 °C po dobu 24 hodin, u bakterií *Actinomyces odontolyticus* a *Clostridium perfringens* inkubace probíhala v Látalově anaerobním systému při 37 °C po dobu 48 hodin a kvasinky byly inkubovány také po dobu 48 hodin při teplotě 30 °C.

Stanovení antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou

Byl připraven BHI bujón, který se následně rozpipetoval v objemu 50 μ l do mikrotitrační destičky v řadách B–H. Do zkumavek s BHI bujónem byly přidány testované směsi, tak aby byly naředěny 50x z toho důvodu, že samotné DMSO působí antibakteriálně (vždy je nutné se dostat s koncentrací DMSO pod 0,5 %).

Do jamek A1, A2, A11 a A12 bylo přidáno 100 μ l čistého BHI bujónu. Do jamek A3, A4 bylo napipetováno 100 μ l naředěné testované směsi 1, jamky A5, A6 obsahovaly 100 μ l směsi 2, jamky A7, A8 obsahovaly 100 μ l směsi 3 a v jamkách A9, A10 bylo přítomno 100 μ l směsi 4. Posledních 50 μ l testované směsi z řady H bylo vždy vypuštěno do odpadu.

V takto připravené destičce bylo provedeno dvojkové ředění pro přípravu koncentrační řady testovaných látek. Výsledné koncentrace testovaných směsí odpovídaly 950–7,42 μ M MEKK (170 – 1,33 μ g/ml).

Dále bylo připraveno bakteriální inokulum, kde se 2-3 bakteriální kolonie nabraly sterilní bakteriologickou kličkou, rozsuspendovaly ve fyziologickém roztoku. Koncentrace inokula byla upravena za pomoci sterilní vody, tak aby byla dosažena koncentrace $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. Připravená bakteriální suspenze byla nalita do Petriho misky, ze které byla MIC inokulátorem neboli ježkem naočkována do jamek mikrotitrační destičky. Před každým očkovaním byl inokulátor vysterilizován tak, že byl umístěn do 96 % ethanolu a následně vyžhán plamenem.

Naočkované destičky byly uloženy do inkubátoru při 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byla vizuálně odečtena hodnota MIC, což byla první jamka bez viditelného zákalu. Pro určení toho, jestli testované směsi působily na bakterie bakteriostaticky nebo baktericidně byly jednotlivé jamky vyočkovány MIC inokulátorem na krevní agar. Naočkované plotny byly poté vloženy do termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin a následující den byla vizuálně odečtena hodnota MBS a MBC.

4.9 Chemická analýza směsí metodou UHPLC-MS

Příprava vzorků pro analýzu UHPLC-MS

K odparkům testovaných směsí byl přidán 80% methanol v takovém objemu, aby výsledné koncentrace připravených vzorků odpovídaly 1 mg/ml. Vložením zkumavek na ultrazvuk a vortex byly odparky promíchány a rozpuštěny. Pro analýzu bylo ještě

nutné vzorky 100x naředit 20 % methanolem na výsledný objem 1 ml. Směsi byly přefiltrovány přes 0,45 µm mikrofiltr z recyklované celulózy pomocí centrifugy při 3000 x g po dobu 2 minut. Všechny připravené směsi byly přelity do vialek pro UPLC-MS analýzu. Výsledné koncentrace analyzovaných směsí tedy odpovídaly 56 µM MEKK.

Analýza oxidačních produktů MEKK

Směsi byly separovány na reverzní fázi na koloně C18 1,7 µm s rozměry 150 x 2,1 mm. Teplota kolony byla nastavena na 30 °C a teplota vzorků 4 °C. Nástřikový objem vzorků byl 5 µl. Pro separaci byly využity mobilní fáze ≥ 99,9% acetonitril a 5 mM kyselina mravenčí v deionizované vodě. V průběhu separace je měnil gradient složení jednotlivých mobilních fází (Tabulka 4).

Detekce separovaných analytů byla provedena na hmotnostním spektrometru s iontovým zdrojem (ESI) a analyzátoři kvadrupólem a TOF v tandemovém uspořádání (QqTOF). Samotná analýza probíhala v negativním módu. Jako zmlžující plyn a plyn na vstupní štěrbině byl zvolen dusík. Jako lockspray byl použit leucin-enkefain (5 ng/µl). Ostatní parametry hmotnostního spektrometru (Tabulka 5). Sběr dat byl prováděn v DDA (Data Dependent Acquisition) režimu. Data byly zaznamenána ve formátu centroid. Celková doba analýzy jedné směsi trvala 22 minut.

Tabulka 4 Gradient složení mobilních fází.

Čas (min)	Průtok (ml/min)	Obsah ³ 99.9% acetonitril (%)	Obsah 5 nM kyselina mravenčí (%)
0	0.25	5	95
0.1	0.25	5	95
1	0.25	10	90
12	0.25	35	65
17	0.25	70	30
17.5	0.25	100	0
19	0.25	100	0
19.5	0.25	5	95
22	0.25	5	95

Tabulka 5 Nastavení hmotnostního spektrometru při detekci.

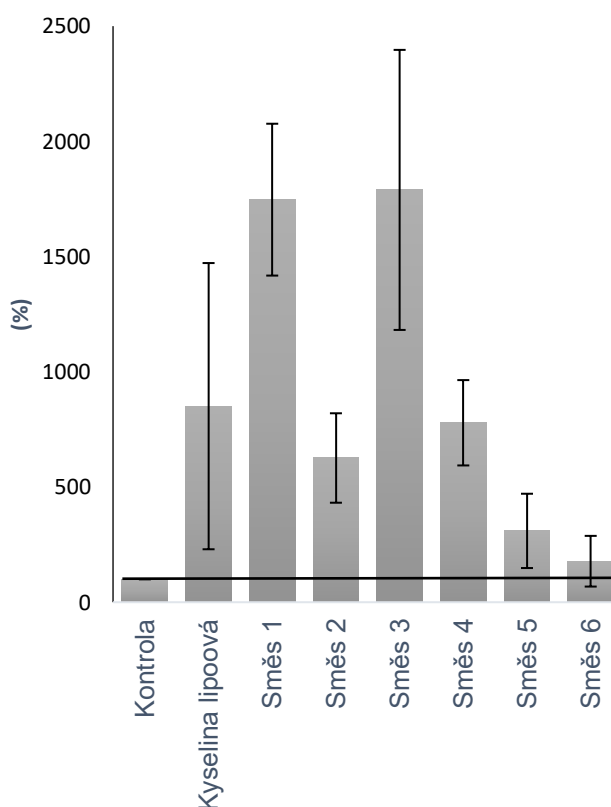
Parametr	Nastavení
rozsah měřených hmotností	50–1500 Da
kapilární napětí	2 kV
teplota iontového zdroje	120 °C
cone voltage	15 V
desolvatační teplota	500 °C
průtok cone gas	30 l/hod
průtok desolvatačního plynu	600 l/hod

5 Výsledky

5.1 Stanovení aktivity transkripčního faktoru Nrf2

Experiment byl proveden na buněčné linii EpRE-LUX. K testování byly použity směsi 1–6 připravené oxidací MEKK.

Bylo zjištěno, že směsi 1 a 3 aktivovaly dráhu Nrf2 více než 17x silněji v porovnání s negativní kontrolou. Tyto směsi dokonce vykazovaly 2x vyšší aktivitu než samotná pozitivní kontrola. Směsi 2 a 4 aktivovaly Nrf2 dráhu 6–7x více než negativní kontrola, ale méně než kyselina lipoová. Nejméně aktivní byla směs 6, jejíž naměřené hodnoty aktivity Nrf2 dráhy byly blízké hodnotám negativní kontroly (Obrázek 14).

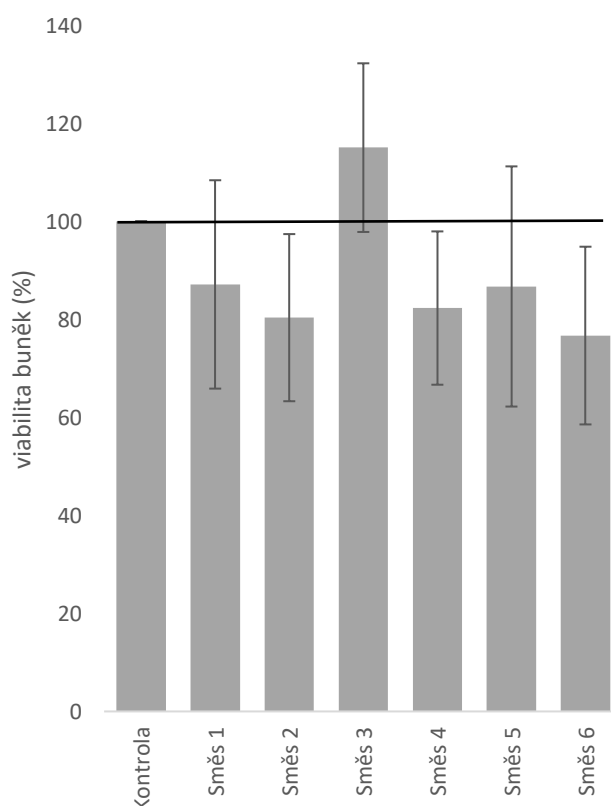


Obrázek 14 Testování aktivity Nrf2 směsí 1–6, po 24 hodinové inkubaci s buněčnou linií EpRE-LUX. Koncentrace testovaných směsí 1–4 odpovídá 250 μ M MEKK, případně 350 μ M MEKK u směsí 5–6. Koncentrace pozitivní kontroly, kyseliny lipoové odpovídá 100 μ M. Negativní kontrola, roztok DMSO. Naměřené hodnoty fluorescence luciferinu jsou vztažené k negativní kontrole, DMSO (100 %). Sloupce znázorňují průměrné hodnoty a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 3$).

5.2 Stanovení cytotoxických účinků

Vliv reakčních směsí na viabilitu buněk byl studován na buněčné linii BJ. K testování byly použity směsi 1–6 připravené oxidací MEKK.

Většina testovaných směsí působila na buňky mírně cytotoxicky a snižovala životaschopnost o 12–23 % v porovnání s kontrolou. Opačný efekt byl pozorován u směsi 3, kde se mírně zvyšovala fluorescence resorufinu. (Obrázek 15).



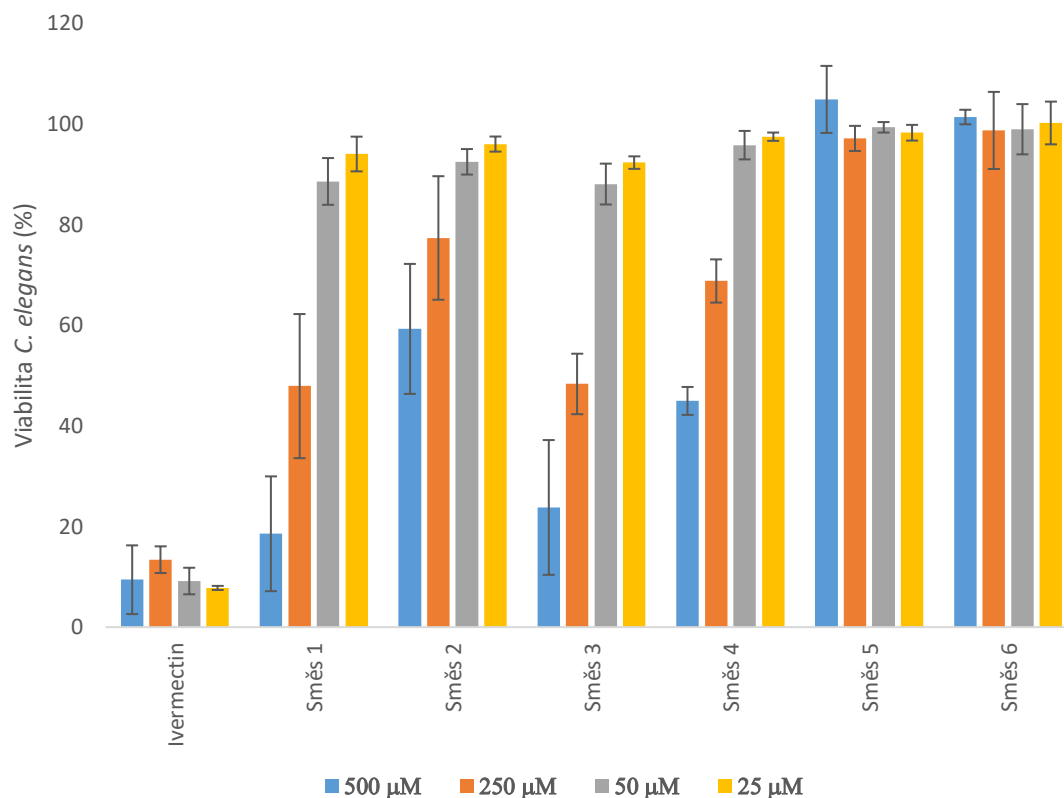
Obrázek 15 Cytotoxicita testovaných směsí, po 24 hodinové inkubaci s buněčnou linií BJ. Koncentrace testovaných směsí 1–4 odpovídá 250 μM MEKK a koncentrace směsí 5–6 odpovídá 350 μM MEKK. Roztok DMSO, byl zvolen jako negativní kontrola. Naměřené hodnoty fluorescence resorufinu jsou vztaženy k negativní kontrole, DMSO (100 %). Sloupce znázorňují průměrné hodnoty a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 3$).

5.3 Stanovení anthelmintické aktivity

Anthelmintický efekt testovaných směsí 1–6 byl studován na vývojově synchronizované populaci červů *C. elegans*.

Při nejvyšší testované koncentraci odpovídající 500 μM MEKK, nejvýrazněji klesla chitinázová aktivity u směsi 1 a to o 82 %. Líhnutí vajíček bylo inhibováno i u směsi 3, kde se snížila chitinázová aktivita o 76 %. K mírnému snížení došlo i u směsi

1 a 4, kde se hodnoty chitinázové aktivity pohybovaly v rozmezí 45–59 %. Při koncentraci testovaných směsí 250 μM MEKK se snížila aktivita chitinasy o 48–56 %. Při nižších testovaných koncentracích nedošlo u žádné testované směsi k viditelnému poklesu chitinázové aktivity v porovnání s kontrolou (Obrázek 16).



Obrázek 16 Chitinázová aktivita *C. elegans*, po 72 hodinové inkubaci na třepačce při 20 °C. Studované směsi byly testovány ve čtyřech koncentracích směsí 1–4 odpovídající 500–25 μM MEKK, případně 700–35 μM MEKK u směsí 5–6. Koncentrace pozitivní kontroly, ivermectinu při nejvyšší testované koncentraci MEKK odpovídá 100 μM . Naměřené hodnoty signálu jsou vztažené k negativní kontrole, DMSO (100 %). Jednotlivé sloupce značí průměrné hodnoty ze třech opakování a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 3$).

5.4 Stanovení antimikrobiální aktivity

Mikrodiluční metodou byl studován vliv připravených směsí 1–4 na růst bakterií. Po stanovení hodnoty MIC se všechny jamky přeočkovaly na krevní agar, aby se zjistilo, jestli testované směsi působí bakteriostaticky nebo bakteriocidně.

Pouze směs 3 inhibovala růst bakterií *Staphylococcus aureus* (MIC 950 μM MEKK) a *Actinomyces odontolyticus* (MIC 950 μM MEKK). Po přeočkování na krevní agar bylo zjištěno, že směs 3 působila bakteriostaticky na oba bakteriální kmeny

(Tabulka 6). Vliv ostatních směsí na růst nebo usmrcení bakterií nebyl zaznamenán (Tabulka 6, 7 a 8).

Tabulka 6 Výsledky mikrodiluční metody v testovaných koncentracích 950–7,42 μM (170–1,33 $\mu\text{g/ml}$) MEKK u bakteriálních kmenů *Enterococcus faealis*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus mutans*.

	<i>Enterococcus faealis</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Streptococcus mutans</i>		
	MIC (μM)	MBS (μM)	MBC (μM)	MIC (μM)	MBS (μM)	MBC (μM)	MIC (μM)	MBS (μM)	MBC (μM)
Směs 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Směs 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Směs 3	-	-	-	950	950	-	-	-	-
Směs 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální baktericidní koncentrace

Tabulka 7 Výsledky mikrodiluční metody v testovaných koncentracích 950–7,42 μM MEKK (170–1,33 $\mu\text{g/ml}$) u bakteriálních kmenů *Bacillus cereus*, *Actinomyces odontolyticus*, a *Clostridium perfringens*. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*.

	<i>Bacillus cereus</i>			<i>Actinomyces odontolyticus</i>			<i>Clostridium perfringens</i>		
	MIC (μM)	MBS (μM)	MBC (μM)	MIC (μM)	MBS (μM)	MBC (μM)	MIC (μM)	MBS (μM)	MBC (μM)
Směs 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Směs 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Směs 3	-	-	-	950	950	-	-	-	-
Směs 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální baktericidní koncentrace

Tabulka 8 Výsledky mikrodiluční metody v testovaných koncentracích 950–7,42 μM MEKK (170–1,33 $\mu\text{g/ml}$) u bakteriálních kmenů *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*.

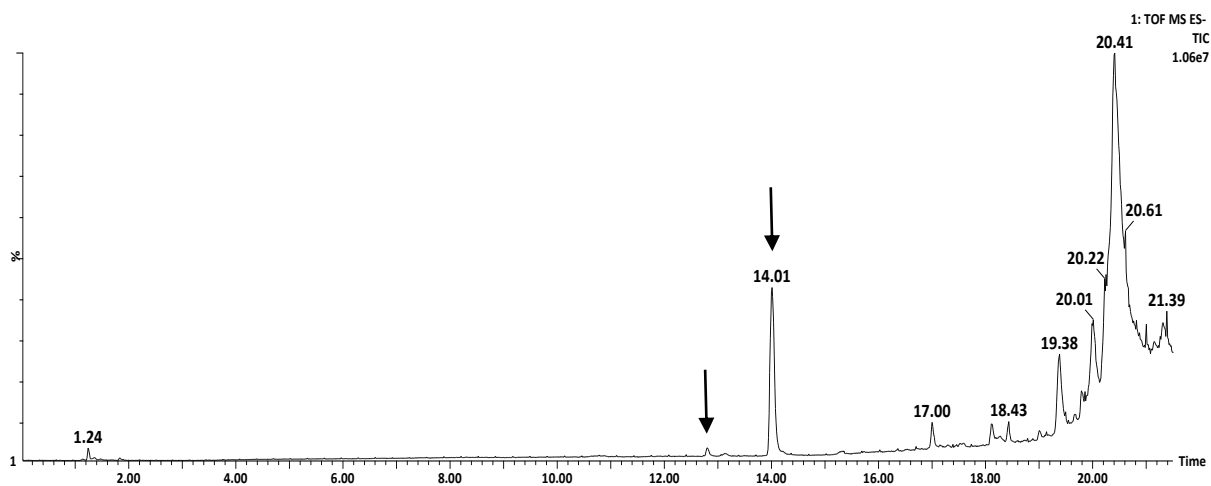
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Candida albicans</i>		
	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC
	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
Směs 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Směs 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Směs 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Směs 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální baktericidní koncentrace

5.5 Identifikace vzniklých produktů směsí

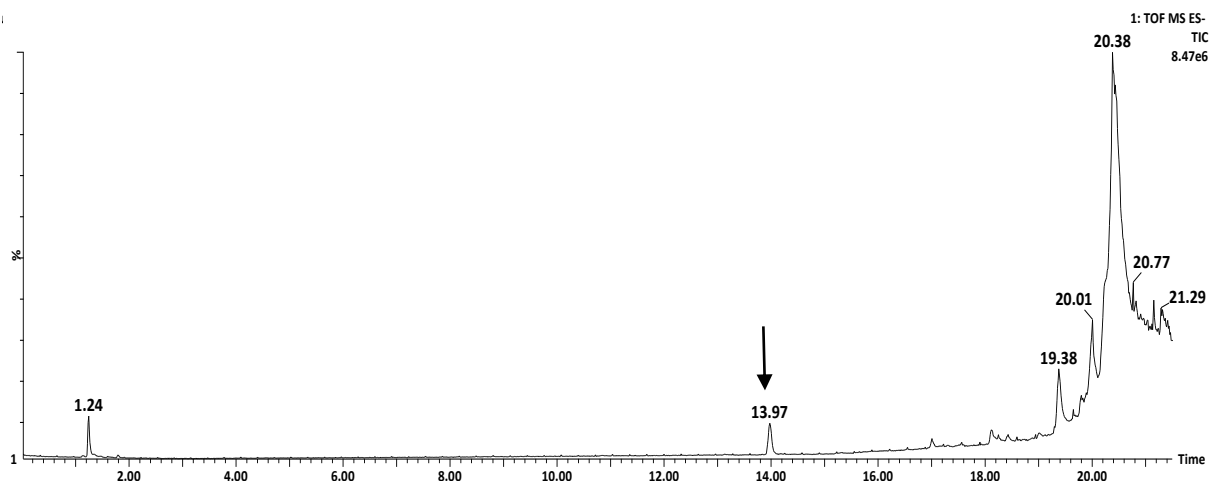
Analýza směsí připravených oxidací MEKK byla provedena v negativním ionizačním módu (ES⁻). Analyzované směsi odpovídaly koncentraci 55 μM MEKK. Data byla zpracována v programu MassLynx.

Při analýze směsi 1 byly detekovány dva výraznější píky v retenčních časech (RT) 12,8 a 14,01. RT 12,8 značil přítomnost neznámé látky s hodnotou m/z 248 a v RT 14,01 byla detekována přítomnost MEKK (Obrázek 17).



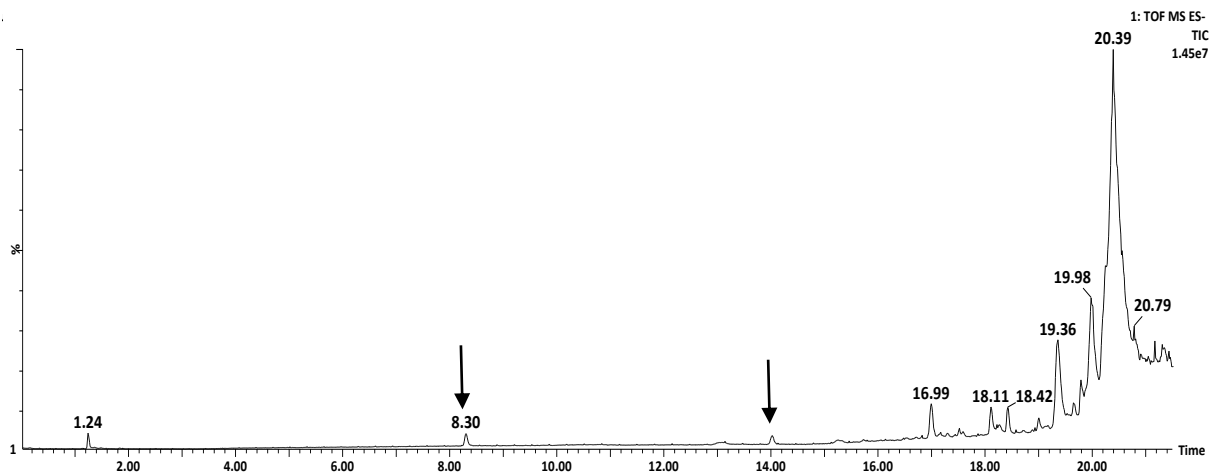
Obrázek 17 Chromatogram smění 1 v ES⁻. Zobrazení v režimu Total Ion Current (TIC), který zaznamenal všechny vzniklé ionty. Záznam prvního píku v RT 1,24 znázorňoval nástřík vzorku. Píky v RT 17,0 – 21,39 detekovaly přítomnost kontaminací z eluované kolony. Černé šipky označují jednotlivé RT.

V reakční směsi 3 byla detekována pouze látka MEKK s RT 13,97 (Obrázek 18).



Obrázek 18 Chromatogram směsi 3. Zobrazení negativního módu v režimu Total Ion Current (TIC). Černé šipky označují vybrané RT.

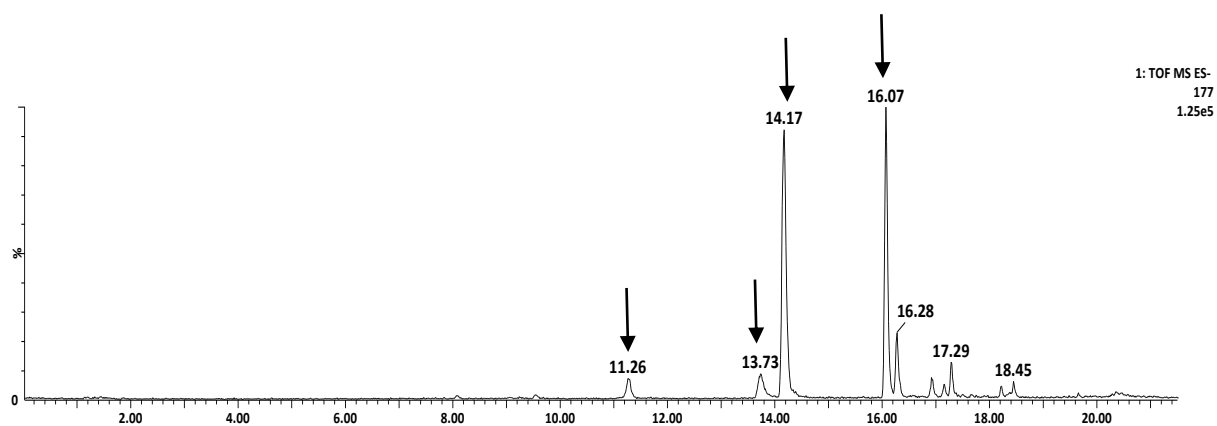
Přítomnost MEKK byla také detekována v směsi 2 v RT 14,03. V RT 8,30 byl identifikován molekulární iont m/z 163, který odpovídá přítomnosti kyseliny kumarové (Obrázek 19).



Obrázek 19 Chromatogram směsi 2. Zobrazení negativního módu v režimu Total Ion Current (TIC). Černé šipky označují vybrané RT.

Nejvíce nových produktů oxidace MEKK bylo zaznamenáno u směsi 5. Byly detekovány 4 píky. V RT 11,26 a 13,73 byly rozpoznány molekulární ionty s odpovídající hodnotou m/z 263 případně 371. V RT 14,17 byla v chromatogramu zaznamenána látka MEKK. Poslední chromatografický pík v RT 16,07 detekoval

přítomnost látky s dvakrát větší molekulovou hmotností než samotný MEKK, přesněji 354 g/mol (Obrázek 20).

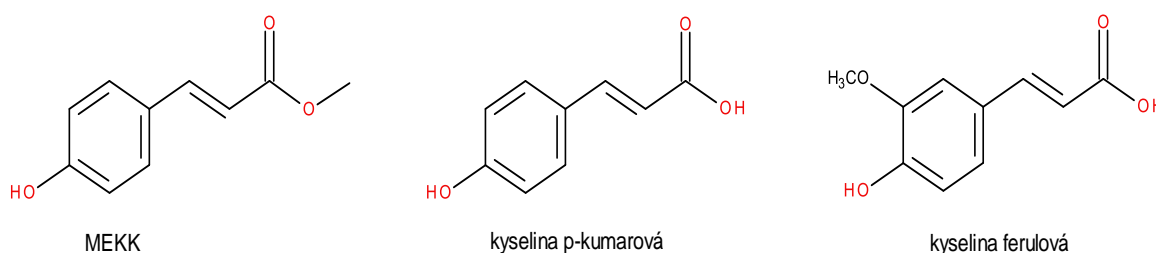


Obrázek 20 Chromatogram směsi 5. Zobrazení ES- na přiblížení na oblast s molekulovou hmotností odpovídající MEKK.

6 Diskuze

Celkem šest reakčních směsí bylo připraveno oxidační transformací MEKK. První čtyři směsi byly připraveny mechanismem autooxidace a zbylé dvě směsi enzymatickou transformací HRP. U všech těchto směsí se následně stanovovaly antioxidační, cytotoxické, antimikrobiální a anthelmintické účinky. Na závěr byly všechny směsi chemicky analyzovány pomocí UHPLC-MS.

Doposud nebyl studován vliv MEKK ani jeho produktů oxidace na biologickou aktivitu. Proto bylo srovnávání výsledků s publikovanými daty zaměřeno především na vyhledávání biologických aktivit kyseliny p-kumarové (p-KK) a kyseliny ferulové (FK), které jsou strukturně podobné MEKK (Obrázek 21).



Obrázek 21 Chemická struktura MEKK, kyseliny p-kumarové a kyseliny ferulové

Vliv p-KK a FK na aktivaci Nrf2 dráhy byl studován v souvislosti s indukcí genové exprese cytoprotektivních genů u potkanů. Tato studie prokázala, že po podání 100 mg/kg FK a p-KK testovaným potkanům po dobu 14 dní byla detekována zvýšená aktivita srdečních enzymů superoxiddismutasy, katalasy a také glutathion peroxidasy, což jsou proteiny, které neutralizují superoxidové radikály a katalyzují rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Zaznamenána byla také i zvýšená hladina transkripčního faktoru Nrf2, který se v promotorových oblastech váže na ARE oblast cílových cytoprotektivních genů. Studie tedy předpokládá, že testované fenolické látky spouští Nrf2 dráhu a tím indukují expresi výše zmíněných antioxidačních enzymů (Yeh Ch.-T, Ching L.-Ch., Yen G.-Ch., 2009).

Jiné studie zabývající se antioxidačními účinky fenolických látek prokázaly, že kyselina p-KK i FK působí jako účinný antioxidant v *in vitro* testech. Bylo zjištěno, že tyto kyseliny dokázaly vyladit volné radikály, minimalizovat peroxidaci lipidů, zpomalit tvorbu oxidačních produktů a tím udržovat nutriční kvalitu potravin a léčiv.

V mnoha experimentech si dokonce kyselina p-KK vedla lépe, než všeobecně známé antioxidanty jako jsou kyselina askorbová, tokoferol anebo butyl-hydroxytoluen. V dalších studiích bylo prokázáno, že ještě silnější antioxidační účinky než p-KK vykazuje FK (Kilic, I., Yesiloglu, Y., 2013; Mathew S., Abraham T. E., Zakaria A. Z., 2015). V této bakalářské práci bylo pomocí *in vitro* testu zjištěno, že všechny směsi spouští signální dráhu Nrf2–ARE silněji než negativní kontrola. Ve směsi 2 byla metodou UHPLC-MS detekována přítomnost p-KK, která se mohla podílet na aktivaci Nrf2 dráhy, jak bylo zjištěno v *in vivo* studii Yeh Ch.-T, Ching L.-Ch., Yen G.-Ch., 2009. Neaktivnější produkty oxidace MEKK pravděpodobně vznikly ve směsi 1 a 3 u níž byl transkripční faktor Nrf2 aktivován dvakrát silněji než v pozitivní kontrole.

Při studiu cytotoxických účinků p-KK na nádorovou buněčnou linii N2a myšího neuroblastomu bylo zjištěno, že kyselina p-KK působí výrazně cytotoxicky. Po 72 hodinové expozici 150 μM p-KK byla snížena viabilita buněk o 82 %. Bylo tedy dokázáno, že p-KK zvyšuje hladinu reaktivních forem kyslíku a tím narušuje fyziologickou funkci mitochondrií, což vede k apoptóze buňky N2a (S. Shailasree, et al., 2014). Inhibice proliferace buněk byla zjištěna také u nádorové buněčné linie plic (A549) a tlustého střeva (HT29-D4). Cytotoxický efekt se projevil po 24 hodinách inkubace s buňkami otrávenými 50–1 000 μM p-KK (Bouzaiene N. N., et al., 2015). V experimentální části této bakalářské práce nebyl detekován výrazný cytotoxický efekt reakčních směsí 1–6. Životaschopnost buněčné linie BJ byla jen mírně snížena o 12–23 %.

Stead D., 1993 zjistil, že p-KK i FK mají inhibiční potenciál na bakterie, které jsou příčinou zkažení vína, *Lactobacillus collinoides* a *Lactobacillus brevis*. Ve studii Lou. Z, et al., 2012 bylo zjištěno, že p-KK má vliv na inhibici růstu bakterie *Staphylococcus aureus* (6538), *Bacillus cereus* (9372) a *Escherichia coli* (ATCC25922). Hodnoty MIC odpovídaly 20 $\mu\text{g/ml}$ pro bakterie *S. aureus*, *B. cereus* případně 80 $\mu\text{g/ml}$ pro *E. coli*. Přítomnost p-KK byla metodou UHPLC-MS detekována pouze ve směsi 2, u které ale nebyla zaznamenána inhibice žádného z testovaných bakteriálních kmenů. Antimikrobiální účinky u testovaných směsí vykazovala pouze směs 3 u níž došlo k inhibici růstu bakterií *Actinomyces odontolyticus* (CCM 4740) a *Staphylococcus aureus* (CCM 3953). U obou bakteriálních kmenů odpovídala MIC = MBS 170 $\mu\text{g/ml}$, což je přibližně devětkrát vyšší koncentrace, než bylo zjištěno v odborné publikaci Lou. Z, et al., 2012. Rozdílné výsledky MIC mohly být způsobeny použitím kmenů s nižší citlivostí na antimikrobiální látky.

V nedávné studii byly prokázány, anthelmintické účinky p-KK proti larválnímu stádiu hlístic. K experimentu byly využity hlístice *H. contortus*, které byly ovlivněny 400 $\mu\text{g/ml}$ p-KK a inkubovány po dobu 48 hodin. Po dvou dnech byl pozorován ovicidní účinek v 8,7 % případů, selhání líhnutí larev v 2,9 % a u 97 % z všech testovaných hlístic došlo ke změně buněčné struktury larev (Castañeda-Ramírez S. G., et al., 2019). V experimentální části této práce byly hlístice *C. elegans* ovlivněny pětikrát nižší koncentrací připravených směsí. U směsi 1 a 3 bylo po 72 hodinové inkubaci detekováno snížení anthelmintické aktivity o 76–82 %. Pravděpodobně tedy ve směsích 1 a 3 vznikly produkty, které inhibovaly líhnutí larev již při nižších koncentracích, než bylo zjištěno ve studii Castañeda-Ramírez S. G., et al., 2019.

Ve studii Grúz J, et al., 2015 byl využit enzym HRP k oxidaci směsí hydroxyskořicových kyselin (p-KK, FK a sinapová kyselina) stejným postupem jako byly připraveny směsi 5–6 v bakalářské práci. Připravené směsi byly analyzovány metodou UPLC–MS/MS a následně byla detekována kyselina disinapová s odpovídající m/z 358. Tato hodnota m/z byla podobná látce detekované v testované směsi 5, lze se tedy domnívat, že mohl vzniknout produkt, který je strukturně podobný kyselině disinapové. U ostatních směsí bylo detekováno jen malé množství vzniklých produktů. Pravděpodobně vznikly látky, které se špatně ionizovaly v ES- nebo se chovaly nestandardně na koloně a proto nebyly v chromatogramech zaznamenány.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo připravit potenciálně aktivní směsi oxidací methylesteru kyseliny kumarové, určit jejich biologickou aktivitu a analyzovat připravené směsi metodou UHPLC-MS. Všechny tyto předem vytyčené cíle byly splněny.

Teoretická část této práce se zabývala charakteristikou fenypropanoidů, mechanismem oxidačních transformací a popisem účinků biologicky aktivních látek. Experimentální část byla zaměřena na syntézu šesti směsí, které byly připraveny metodou necílené oxidační transformace. Tento způsob přípravy měl tu výhodu, že současně byl testován větší počet vzniklých produktů. Nevýhodou bylo to, že vzniklé produkty se mohly ve směsi nacházet v nízkých koncentracích.

S využitím buněčných linií EpRE a BJ, které byly ovlivněny připravenými směsmi byla studována míra aktivace transkripčního faktoru Nrf2 a cytotoxická aktivita. Bylo zjištěno, že směs 1 a 3 působí jako účinný aktivátor transkripčního faktoru Nrf2, který se následně váže do ARE oblasti promotorů, a tak spouští expresi cytoprotektivních enzymů. Cytotoxický efekt reakčních směsí nebyl prokázán u žádné z testovaných směsí. Dále byl pomocí mikrodiluční metody studován vliv směsí na růst vybraných bakteriálních kmenů. Zjistilo se, že směs 3 byla schopna inhibovat růst bakterií *S. aureus* a *A. odontolyticus*. Testováním chitinázové aktivity bylo stanoveno, že směsi 1 a 3 působily mírně anthelminticky na vajíčka *C. elegans*. Poslední částí práce byla chemická analýza všech směsí metodou UHPLC-MS. V nejaktivnějších směsích 1 a 3 byla detekována výchozí látka a pouze malé množství vzniklých produktů. Pravděpodobně ve směsích vznikly produkty, které se špatně ionizovaly v ES- nebo se chovaly nestandardně na koloně a proto nebyly v chromatogramu zaznamenány. Vzhledem v projevům biologické aktivity směsi 1 a 3 by stálo za to dále prozkoumat tyto směsi jinými metodami, aby se zjistilo, které nasyntetizované látky se podílí na biologické aktivitě.

Použitá literatura

Adlercreutz H. (2007) Lignans and Human Health, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5-6), 483–525.

Azevedo A. M., Martins V. C., Prazeres D. M. F., Vojinović V., Cabral J. M. S., Fonseca L. P. (2003) Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, 9, 199–247.

Bedigian D., Seigler D. S., R.Harlan J. R. (1985) Sesamin, sesamol and the origin of sesame. *Biochemical Systematics and Ecology*, 13(2), 133–139.

Bouzaiene N. N., Jaziri K. S., Kovacic H., Chekir-Ghedira L., Ghedira K., Luis J. (2015) The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European Journal of Pharmacology* 766, 99–105.

Bürglin T. R., Lobos E., Blaxter M. L. (1998) *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology* 28(3), 395–411.

Castañeda-Ramírez S. G., Torres-Acosta J. F. J., Sandoval-Castro A. C., Borges-Argáez R, Cáceres-Farfán M., Gabriela Mancilla-Montelongo G., Mathieu C. (2019) Bio-guided fractionation to identify *Senegalia gaumeri* leaf extract compounds with anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Veterinary Parasitology* 270,13–19.

Cornelli U. (2009) Antioxidant use in nutraceuticals, *Clinics in Dermatology* 27(2),175–194.

Ellerbrock R. B, Coscarelli M. E., Gurney E. M, Geary. G. T. (2004) Screening for presenilin inhibitors using the free-living nematode, *caenorhabditis elegans*. *Journal of biomolecular screening* 9(2),147–152.

Gortari C. M., Hours A.R. (2008) Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress* 7, 221–238.

Grúz J., Pospíšil J., Kozubíková H., Pospíšil T., Doležal K., Buzel M., Strnad M. (2019) Determination of free diferulic, disinapic and dicoumaric acids in plants and foods. *Food Chemistry* 171, 280-286.

Harmatha J. (2005) Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných fenylpropanoidů. *Chem. Listy* 99, 622–632.

Harmatha, Juraj (2002) Fenylpropanoidy, lignany a jejich biologické účinky. *Chemie a biochemie přírodních látek. Cyklus Organická chemie*, 27, 117–142.

Herald J. P., Davidson M. P. (1983) Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Food Science* 48(4).

Herrmann K. M., Lisa M. W. (1999) The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 473–503.

Holden-Dye L., Walker R.J. (2014) Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *The Online Review of C. elegans Biology*.

Chang G. J., Welton M. L. (2004) Human Papillomavirus, Condylomata Acuminata, and Anal Neoplasia. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 17(4), 221–230.

Kamal-Eldin A., Moazzami A., Washi S. (2011) Sesame Seed Lignans: Potent Physiological Modulators and Possible Ingredients in Functional Foods & Nutraceuticals. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 3(1), 17–29.

Kilic, I., Yesiloglu, Y. (2013) Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 115, 719–724.

Korkina L. G. (2007) Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology*, 53(1), 15–25.

Lim J. S., Adachi Y., Takahashi Y., Ide T. (2007) Comparative analysis of sesame lignans (sesamin and sesamol) in affecting hepatic fatty acid metabolism in rats. *British Journal of Nutrition*, 97(1), 85–95.

Loftsson T. (2014) Degradation Pathways. *Drug Stability for Pharmaceutical Scientists*, 63–104.

Lou Z., Wang H., Rao S., Sun J., Ma Ch., Li J. (2012) p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* 25(2), 550–554.

Lu M.-Ch., Ji J.-A. Jiang Z.-Y., You Q.-D. (2016) The Keap1–Nrf2–ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Medicinal Research Reviews* 36(5), 924–963.

Lucarini M., Pedulli G.F. (2010) Free Radical Intermediates in the Inhibitors of the Autoxidation Reaction. *Chemical Society Reviews* 39(6), 2106–2119.

MacRae W. D., Towers G. H. N. (1984) Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, 23(6), 1207–1220.

Maeda H., Dudareva N. (2012) The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 73–105

Mathew S., Abraham T. E., Zakaria A. Z (2015) Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of Food Science and Technology* 52, 790–798.

Matos M. J., Santana L., Uriarte E., Abreu O. A., Molina E., Yordi E. G. (2015) Coumarins — An Important Class of Phytochemicals, *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. 113–140.

Miret S., De Groene E. M., Klaffke W. (2006) Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening* 11(2), 184–193.

N. F. Santos-Sánchez, R. Salas-Coronado, B. Hernández-Carlos, C. Villanueva-Cañongo (2019) Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*.

Nguyen T., Nioi P., Pickett C.B (2009) The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *The Journal of biological chemistry* 284(20), 13291–13295.

- Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. (2016) Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- Phytochemistry*, 65(3), 249–259.
- Raffaelli B., Hoikkala A., Leppälä E., Wähälä K. (2002) Enterolignans. *Journal of Chromatography B*, 777(1-2), 29–43.
- Reihmann, M., Ritter, H. (2006) Synthesis of Phenol Polymers Using Peroxidases. *Advances in Polymer Science*, 149, 1–49.
- Ruben de R., Georgina S. (2013) Biocatalysis for Biobased Chemicals. *Biomolecules*. 3, 812-847.
- Shailasree, S., Venkataramana, M., Niranjana, S.R. Prakash H.S. (2014) Cytotoxic Effect of p-Coumaric Acid on Neuroblastoma, N2a Cell via Generation of Reactive Oxygen Species Leading to Dysfunction of Mitochondria Inducing Apoptosis and Autophagy. *Molecular Neurobiology* 51, 119–130.
- Silva C.G., de Almeida V.L., Campana P.R.V., Rocha M.P. (2017) Plant Cell Cultures as Producers of Secondary Metabolites: Podophyllum Lignans as a Model. V: Jha S. *Transgenesis and Secondary Metabolism. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, 67–102.
- Singh K., Kumar S., Rani A., Gulati A., Ahuja P. S. (2009) Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Functional & Integrative Genomics*, 9(1), 125–134.
- Stead D. (1993) The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 75(2).
- Sutphin G. L., Kaeberlein M. (2009). Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span on Solid Media. *Journal of visualized experiments* 27, 1152.
- Tzin V., Galili G. (2010) New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Molecular Plant*, 3(6), 956–972.

Ukelis U., Kramer P.-J., Olejniczak K., Mueller S. O. (2008) Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. Elsevier, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 51, 108–118.

Vasudevan P.T., Li L.O. (1996) Peroxidase catalyzed polymerization of phenol. *Appl Biochem Biotechnol* 60, 73–82.

Veitch N. C. (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme.

Vejražka M. (2008) Buněčné kultury. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 1–19.

Vogt T. (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20.

Votava M., Broukal Z., Vaněk J. (2007) Antimikrobiální látky. Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře. 163–166.

Wan Y., Li H., Fu G., Chen X., Chen F., Xie M. (2015) The relationship of antioxidant components and antioxidant activity of sesame seed oil. *J. Sci. Food Agric.*, 95(13), 2571–2578.

Yeh Ch.-T, Ching L.-Ch., Yen G.-Ch. (2009) Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20(3), 163–171.