UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Izolace Nrf2-aktivujících složek z rostlinných extraktů

Diplomová práce

Autor: Bc. Mariana Rýznarová

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Mariana Rýznarová
Název práce	Izolace Nrf2-aktivujících složek z rostlinných extraktů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Tématem diplomové práce byla identifikace aktivátorů Nrf2 dráhy získaných z rostlinných extraktů. Molekula Nrf2 se nachází v cytoplasmě buňky vázaná na protein Keap1. Po aktivaci se Nrf2 vyvazuje z vazby s Keap1 a putuje do jádra buňky, kde se připojuje ke genové sekvenci ARE/EpRE, a tím zahajuje transkripci antioxidačních enzymů.Cílem mé diplomové práce bylo vypracovat odbornou rešerši zabývající se antioxidačním systémem, transkripčním faktorem Nrf2 a také bioassay-guided fractionation. V experimentální části jsem se v první řadě testovala rostlinné extrakty na buněčné linii EpRE-LUX a měřila aktivitu luciferázy v závislosti na aktivitě standardu kyselině lipoové. Aktivní rostliny *Crocus sativus* a *Satureja hortensis,* byly poté změřeny pomocí necílené LC-MS. Koncentrace všech detekovaných metabolitů byla následně korelována pomocí Spearmanovy korelace s relativní aktivitou luciferázy u jednotlivých vzorků. Metabolity s nejvyšším korelačním koeficientem, jakožto nejpravděpodobnější kandidáti Nrf2 aktivujících látek, byly předběžně identifikovány a bylo určeno jejich elementární složení.
Klíčová slova	Nrf2, EpRE-LUX, frakcionace
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Mariana Rýznarová
Title of thesis	Isolation of Nrf2-activating components from plant extracts
Type of thesis	Master (Diploma)
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	The theme of thesis was to identify activators of Nrf2 pathway obtained from plant extracts. Nrf2 molecule is bound to Keap1 protein which is located in cytoplasm. When Nrf2 is activated, it is released from Keap1 protein, and translocated to cell nucleus where it initiates transcription of antioxidant enzymes by binding to ARE/EpRE gene sequence. The aim of this thesis was to compose theoretical instroduction focused on antioxidant system, Nrf2 transcription factor and bioassay-guided fractionation. In the experimental part, plant extracts were tested against EpRE-LUX cell line and their ability to activate Nrf2 was compared to that of lipoic acid. The active plants of *Crocus sativus* and *Satureja hortensis* were then measured by untargeted LC-MS method. The concentration of all detected metabolites was subsequently correlated by Spearman's correlation with the relative luciferase activity of the individual samples. The metabolites with the highest correlation coefficient, as the most probable candidates for Nrf2 activating substances, were tentatively identified and their elemental composition was determined.
Keywords	Nrf2, EpRE-LUX, fractionation
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

Shrnutí

Tématem diplomové práce byla identifikace aktivátorů Nrf2 dráhy získaných z rostlinných extraktů. Molekula Nrf2 se nachází v cytoplasmě buňky vázaná na protein Keap1. Po aktivaci se Nrf2 vyvazuje z vazby s Keap1 a putuje do jádra buňky, kde se připojuje ke genové sekvenci ARE/EpRE, a tím zahajuje transkripci antioxidačních enzymů.

Cílem mé diplomové práce bylo vypracovat odbornou rešerši zabývající se antioxidačním systémem, transkripčním faktorem Nrf2 a také bioassay-guided fractionation. V experimentální části jsem se v první řadě testovala rostlinné extrakty na buněčné linii EpRE-LUX a měřila aktivitu luciferázy v závislosti na aktivitě standardu kyselině lipoové.

Aktivní rostliny *Crocus sativus* a *Satureja hortensis,* byly poté změřeny pomocí necílené LC-MS. Koncentrace všech detekovaných metabolitů byla následně korelována pomocí Spearmanovy korelace s relativní aktivitou luciferázy u jednotlivých vzorků. Metabolity s nejvyšším korelačním koeficientem, jakožto nejpravděpodobnější kandidáti Nrf2 aktivujících látek, byly předběžně identifikovány a bylo určeno jejich elementární složení.

Summary

The theme of thesis was to identify activators of Nrf2 pathway obtained from plant extracts. Nrf2 molecule is bound to Keap1 protein which is located in cytoplasm. When Nrf2 is activated, it is released from Keap1 protein, and translocated to cell nucleus where it initiates transcription of antioxidant enzymes by binding to ARE/EpRE gene sequence. The aim of this thesis was to compose theoretical instroduction focused on antioxidant system, Nrf2 transcription factor and bioassay-guided fractionation. In the experimental part, plant extracts were tested against EpRE-LUX cell line and their ability to activate Nrf2 was compared to that of lipoic acid.

The active plants of *Crocus sativus* and *Satureja hortensis* were then measured by untargeted LC-MS method. The concentration of all detected metabolites was subsequently correlated by Spearman's correlation with the relative luciferase activity of the individual samples. The metabolites with the highest correlation coefficient, as the most probable candidates for Nrf2 activating substances, were tentatively identified and their elemental composition was determined.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za využití citované literatury.

V Olomouci,

…….. Podpis

Děkuji svému vedoucímu práce Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, rady a mnoho znalostí, které mi předal. Také bych chtěla poděkovat Ing. Michaele Šubrtové za trpělivost pomoc v laboratoři.

Obsah

1. Úvod 9
2. Teoretická část 10
2.1. Význam antioxidačního systému 10
2.2. Transkripční faktor Nrf2 11
2.2.1. Mechanismus aktivace 11
2.2.2. Aktivované enzymy 12
2.2.2.1. Superoxiddismutáza 12
2.2.2.2. Glutathionperoxidáza 13
2.2.2.3. Kataláza 14
2.2.3. Aktivátory transkripčního faktoru Nrf2 14
2.2.4. Inhibitory transkripčního faktoru Nrf2 15
2.3. EpRE-LUX 15
2.4. Vyhledávání biologicky aktivních látek 16
2.4.1. Extrakční techniky 16
2.4.1.1. Ultrazvuková extrakce 16
2.4.1.2. Enzymová extrakce 16
2.4.1.3. Superkritická fluidní extrakce 16
2.4.2. Frakcionace 17
2.4.2.1. Frakcionace (extrakce) na pevné fázi. 17
2.4.3. Dereplikace 18
2.4.4. Korelační přístupy 19
2.4.5. LC-MS metabolomika 20
2.4.5.1. Princip LC-MS 20
2.4.5.2. Necílená analýza 23
2.5. Rostlinný materiál 24
2.5.1. Satureja hortensis 24
2.5.1.1. Morfologie 24
2.5.1.2. Fytochemické složení 25
2.5.1.3. Antioxidační účinky 26
2.5.2. Crocus sativus 26
2.5.2.1. Morfologie 26
2.5.2.2. Fytochemické složení 27
2.5.2.3. Antioxidační účinky 29

3. Experimentální část 30
3.1. Rostlinný materiál 30
3.2. Chemikálie 30
3.3. Metody 30
3.3.1. Kultivace buněk 30
3.3.2. Příprava buněk na experiment 31
3.3.3. Extrakce rostlinného materiálů 31
3.3.4. Frakcionace rostlinného materiálu 31
3.3.5. Testování vzorků na buňkách 32
3.3.6. UHPLC-MS/MS 34
3.3.7. Vyhodnocení dat 35
4. Výsledky 36
4.1. Screening extraktů 36
4.2. Frakcionace pomocí SPE 37
4.3. LC-MS analýza vybraných extraktů 45
4.3.1. Korelační analýza 45
4.3.2. Předběžná identifikace kandidátů 46
5. Diskuze 53
6. Závěr 56
Seznam použité literatury 57

Seznam zkratek

ARE	antioxidant response element
ATP	adenosintrifosfát
DCTA	kyselina 1,2.diaminocyklohexan –N-N-N-N-tetraoctová
DTT	dithiothreithol
EMEM	Eagle´s Minimum Essential Medium
Epre-LUX	induction of electrophile element – luciferase reporter gene
ESI	elektro sprejová ionizace
K+	iont draslíku
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protain 1
MeOH	metanol
Na+	iont sodíku
NH3	amoniak
Nrf2	nuclear factor erythorid 2
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
RNS	reactive nitrid species (reaktivní forma dusíku)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní forma kyslíku)
Tris	trisaminomethan
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1. Úvod

Jeden z obranných mechanismů organismu je antioxidační systém, který reguluje hladinu volných radikálů, které vznikají rozkladem molekul a poškozují buňky. Aktivátory antioxidačního systému se nachází volně v potravě, ale můžeme je vyrobit i synteticky. Hlavním regulátorem genů kódujících antioxidační systém je transkripční faktor Nrf2, který je v buňce umístěn v cytoplasmě a ukotven ve vazbě s proteinem Keap1, který zároveň reguluje hladinu Nrf2 v cytoplasmě. Po aktivaci se Nrf2 odpoutává od proteinu Keap1 a putuje do jádra, kde se váže na promotor genové sekvence zvanou ARE/EpRE a tím spouští transkripci antioxidačních enzymu. Mezi nejvýznamnější antioxidační enzymy patří superoxid dismutáza, glutathioperoxidáza a kataláza.

Cílem experimentální části diplomové práce bylo předběžně charakterizovat přírodní aktivátory Nrf2 dráhy z vybraných rostlinných druhů. Pro účel této práce bylo vybráno několik desítek rostlin, které byly, extrahovány, frakciovány a následně byla změřena relativní luciferázová aktivita jednotlivých extraktů pomocí myší buněčné linii EpRE-LUX. Tato buněčná linie obsahuje ve svém genetickém kódu luciferázový plasmid, který se nachází poblíž promotorové sekvence ARE/EpRE. Při aktivaci Nrf2 dráhy a následné expresi antioxidačních enzymů se luciferázový plasmid transkribuje společně s antioxidačními enzymy ve stejném poměru. Rostliny, které vykazovaly největší relativní luciferázovou aktivity byly dále zkoumány pomocí LC-MS za účelem určení aktivních složek extraktů. Toho bylo dosaženo pomocí korelace relativních ploch všech metabolitů s aktivitou luciferázy v různých frakcích. Výsledný seznam kandidátů aktivních molekul byl částečně anotován a u všech položek bylo určeno elementární složení.

2. Teoretická část

2.1. Význam antioxidačního systému

V každé buňce se nachází volné radikály, které se dostávají o organismus zvenčí nebo vznikají v důsledku metabolických procesů v buňce samovolně. Volné radikály se nachází ve dvou formách jako aktivní formy kyslíku (ROS) nebo aktivní formy dusíku (RNS). V každé normální buňce existuje systém, který vyrovnává hladiny volných radikálů, pokud je tento systém poškozen dochází k oxidativnímu stresu (Inhad M. *et al*., 2002). Aby nedošlo k poškození buňky v důsledku nadměrného množství volných radikálů, má každá buňka antioxidační obranný mechanismus, který udržuje hladinu RNS a ROS v normě (Gupta V. *et al.*, 2013)

Antioxidační systém obsahuje antioxidanty, což jsou látky nebo sloučeniny, které zpomalují nebo zabraňují tvorbě volných radikálů, popřípadě zamezují šíření volných radikálů (Brewer, M. *et al*., 2011). Antioxidanty existují v přírodní formě či v syntetické formě. V přírodní formě se do organismu dostávají prostřednictvím potravy, zejména v ovoci, zelenině a koření. (Isabel M. C. *et al*., 2013)

Antioxidanty se dělí do čtyř linií antioxidační obrany. První linie antioxidační obrany se skládá z preventivných antioxidantů, které potlačují O^{2-} a rozkládají ho na H_2O_2. Mezi anti-oxidativní enzymy první linie patří superoxid dismutáza, které je obsažena v každé buňce, jedná se o hlavní antioxidační enzym, který katalyzuje dismutaci superoxidu na peroxid vodíků a dioxygen. Dále do první antioxidační obrané linie patří glutathionperoxidaza, které za přítomnosti bílkoviny gluthationu redukuje peroxid vodíků na vodu.(Bounous G., Sukkar S., Molson J.H., 2003). Posledním důležitým enzymem jsou katalázy, které katalyzují dismutaci peroxidu vodíků na kyslík a vodu. Mezi pomocné antioxidační prvky první linie patří selen, zinek a měď(Inhad M. et Chaudhuri P.S. 2002).

Druhá linie antioxidační obrany obsahuje vysokomolekulární antioxidanty, což jsou proteiny, které jsou schopny vázat přechodné prvky, jako jsou železo a měď a měnit jejich oxido-redukční vlastnosti tak, aby přestaly katalyzovat radikálové reakce. Mezi vysoko molekulární antioxidanty řadíme bilirubin, albumin, feritin a další. Dále zde patří nízkomolekulární antioxidanty, mezi které patří vitamín C, který funguje jako redukční činidlo, redukuje anorganické a organické radikály. Vitamín E, který je hlavní antioxidantem membrán, přeměňuje alkylperoxilové radikály na hydroperoxidy, také tlumí peroxidaci lipidů

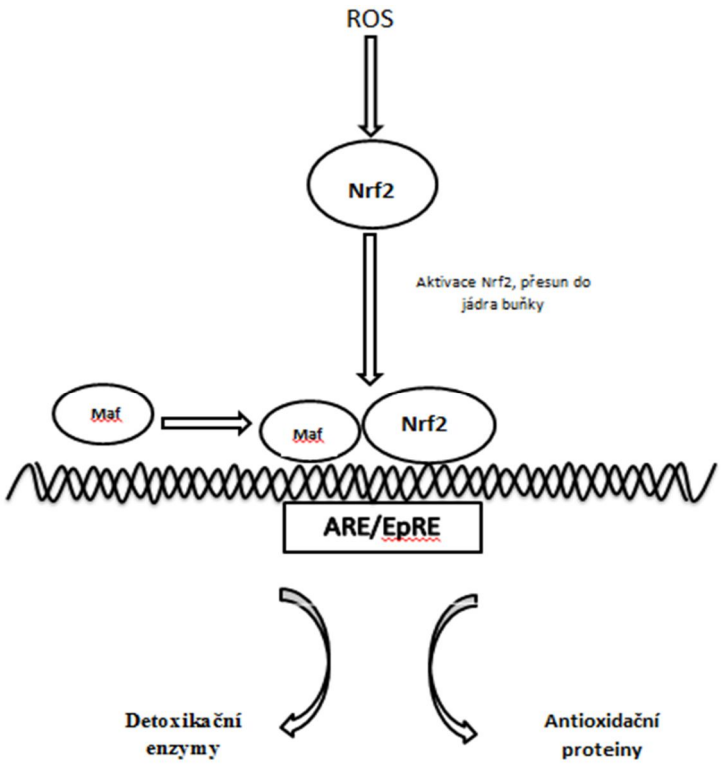
a lipoproteinů v membránách. Karotenoidy odstraňují radikály v lipidech (Inhad M. et Chaudhuri P.S., 2002).

2.2. Transkripční faktor Nrf2

Transkripční faktor Nrf2 je hlavním regulátorem genů kódující antioxidační enzymy druhé fáze a antioxidační stresové proteiny, v reakci na oxidativní stres. Nrf2 je v buňce lokalizován v buněčné cytoplasmě, konkrétně v blízkosti buněčného jádra, kde ho v pohotovosti udržuje protein Keap1. (Zhang D., 2008)

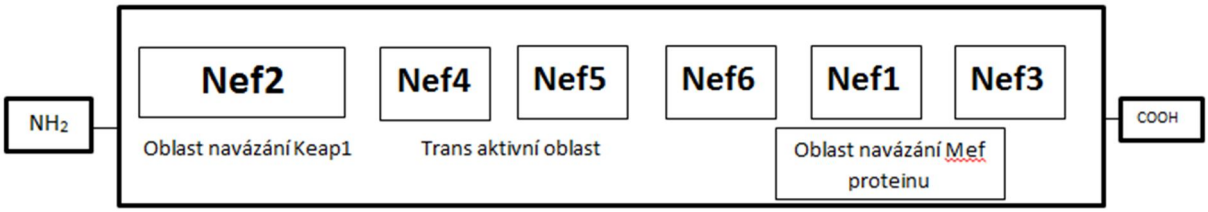
2.2.1. Mechanismus aktivace

Signalizace transkripčního faktoru Nrf2 je regulována segregací jednotlivých části. Nfr2 je v klidových podmínkách přítomen v cytoplasmě buňky vázaný na regulační protein Keap1. Při oxidačním stresu Nrf2 proniká do jádra, kde spouští transkripci genů, které vyvolávají antioxidační reakci. Pro finální spuštění antioxidační reakce je za potřebí kombinace nejméně čtyř komponentů, jmenovitě se jedná o Nrf2, Keap1, skupinu malých proteinů muskaponerotického fibroblastu (zkráceně Maf) a enhanceru ARE/EpRE (Wenge L. 2009).



Obr.č. 2 Schématické znázornění antioxidační stresové odpovědi pomocí Nrf2 a ARE/EpRE systému, podle Ishii T. *et al.,* 2000

Nrf2 je základním transkripčním faktorem leucinového zipu. Struktura Nrf2 má několik homologních domén (Neh). Jednotlivé domény mají své specifické funkce. Doména Neh1 umožňuje vytváření heterodimeru s proteiny Mef. (Motohashi H, Yamamoto M., 2004) Doména Neh2 vázána na Keap 1 a umožňuje rozvázání vazby s cytosolovým represorem Keap1. Doména Neh4 a Neh5 společně zodpovídají za trans aktivační aktivitu Nrf2. Doména Nah6 se nachází v intervenující oblasti a propojuje Neh5 a Neh1. Neh1 je také oblast, která umožňuje navázání Mef proteinů a váže se k DNA. (Nioi P. *et al.*, 2005)



Obr. č 1. Struktura Nrf2, podle Abed et al., 2015

Keap1 je silným cytosolovým represorem Nrf2, který se skládá z pěti domén. Keap1 je také adaptérem Cullin 3-dependentní substrátový aparát pro komplex ubikvitin ligázy E3, takže Nrf2, který je ukotven s Keap1 je zároveň i konstantně degradován. Keap1 je protein bohatý na cystein, přičemž některé jsou reaktivní cysteiny (Cullinan S. *et al.*, 2004). Tedy se předpokládá, že Keap1 má důležitou roli jako primární redukční činidlo, které v přítomnosti redukčního stresu může modifikovat některé z cysteinů a vyvolat tím změnu konformace a následně uvolnit Nrf2 z vazby. Nrf2 se poté transportuje do jádra a vytváří heterodimer se skupinou nukleárních proteinů Maf, Fos, Jun a jiné. Heterodimer Nrf2/Maf se poté váže na enhancer ARE/EpRE umístěný v promotoru genu, což iniciuje transkripci genů, tvorbu proteinů a antioxidační reakci (Wenge L. 2009).

2.2.2. Aktivované enzymy

Aktivovaný Nrf2 transkripční faktor se přemístí do jádra, kde aktivuje transkripci genů a tím vznik nových enzymů, které se podílí na antioxidačním systému organismu.

Mezi nejvýznamnější antioxidační enzymy řadíme superoxiddismutázu, glutathioperoxidázu a katalázu. Nesmírně důležitá je souhra všech anntioxidačních enzymů navzájem i s ostatními vnitrobuněčnými neenzymovými antioxidanty. (Kensler T.W. *et al.*, 2007)

2.2.2.1. Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza patří do skupiny základních antioxidačních enzymů. Superoxidový radikál je reaktivní kyslíková částice, která vzniká jednoelektronovou redukcí

molekuového kyslíku. Avšak mohou se vytvářet i reaktivnější formy kyslíku jako jsou hydroxilový radikál, peroxidový radikál či kyselina chlorná. Superoxid dismutáza je jeden z klíčových enzymů katalyzující dismutaci superoxidovaného aniontového radikálu na peroxid vodíku a molekelární kyslík (Miriaja S. *et al.,* 2011)

Superoxiddismutáza kontroluje hladinu superoxidu v buňce tím, že urychluje dismutaci superoxidu. U živých organismů rozeznáváme tři druhy superoxiddismutázy (SOD), které se liší kofaktorem, což je vždy atom kovu, který zastává roli v katalytickém účinku daného enzymu. (Yuewei Sheng *et al.,* 2014)

a) Mn+ SOD a Fe+SOD

Jedná se o homotetramer, který obsahuje atom manganu, který cirkuluje mezi Mn^{+3} a Mn^{+2} během dismutace superoxidu. Exprese Mn-SOD je nezbytná pro přežití aerobního života a pro vývoj buněčné rezistence vůči toxicitě způsobenou kyslíkovými radikály.

b) Cu/Zn SOD

Hraje hlavní roly v ochraně cytoplasmy. Cu/Zn SOD byl spojen s amyotrofickou laterární sklerózou a jeho nedostatek je spojen s urychleným stárnutím.

c) NiSOD

Je složen ze čtyř identických podjednotek, je stabilní při pH 4,0-8,0 a až při 70°C. je inhibován kyanidem

2.2.2.2. Glutathionperoxidáza

Jedná se o enzym peroxidázy obsahující ve své struktuře selen, který katalyzuje redukci různých hydroxyperoxidů za současné oxidace glutathionu, čímž chrání buňky před oxidačním poškozením. Aby glutathionperoxidáza mohla plynule zajišťovat odbourávání peroxidu vodíku, je třeba regenerovat glutathion v redukované formě za využití koenzymu NADPH.

U savců existuje pět různých izoenzymů GPX, ačkoliv exprese všech GPX probíhá ve všech tkáních, hladina jednotlivých izoenzymů se liší v závislosti na typu tkáně. (Khan, M. A. *et al.,* 2010)

GPX1 a fosfolipid hydroperoxid glutathion peroxidáza GPX4 se nacházejí ve většině tkání. GPX4 se nachází v cytozolu, tak v membráně. GPX4 mohou přímo redukovat fosfolipidové hydroperoxidy a hydroperoxidy cholesterolu. GPX1 je převážně přítomen v erytrocytech, ledvinách a játrech. GPX4 je vysoce exprimován v buňkách renálních

epiteliálních buněk a varlatech. Intracelulární GPX2 a extracelulární GPX3 jsou přítomny ve všech tkáních a výjimkou gastrointestinálního traktu a ledvinách. Posledním je GPX5, který byl objeven v myším epidermu.

2.2.2.3. Kataláza

Kataláza je tetramerní enzym sestávající se ze čtyř identických tetrahedrálně spořádaných podjednotek. Kataláza je jeden z nejúčinnějších enzymů, protože působí na peroxid vodíku ve vysokých koncentracích, čímž se liší od peroxidáz, které působí v nízkých koncentracích. Přeměňuje peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík a při nízkých koncentracích peroxidu vodíku pomáhá k oxidaci nízkomolekulárních alkoholů. I když kataláza není nezbytná pro všechny typy buněk, hraje důležitou roli při získávání tolerance k oxidativnímu stresu v adaptivní odezvě buněk. Nachází se hlavně v mitochondriích, peroxisomech hepatocytů a v cytoplasmě enterocytů.

2.2.3. Aktivátory transkripčního faktoru Nrf2

Aktivátorů transkripčního faktoru je mnoho, avšak ne u všech je objeven mechanismus, jakým působí na celý antioxidační systém. Aktivátory Nrf2 se dělí do rozličných chemických tříd:

1. Oxidovatelné difenoly a chinony
2. Michaelové akceptory
3. Isothiokyanáty
4. Thiokarbonáty
5. Trojmocné arsenikýty
6. Dithioletriony
7. Hydroperoxidy
8. Těžké kovy
9. Polyeny

Nejprozkoumanější jsou isothiokyanáty, do kterých patří nejznámější aktivátor Nrf2 sulforafan a dithiolethiory, kde nejznámější je oltipraz. (Kensler T.W. et al., 2010)

Sulforafan patří do skupiny isothiokyanátů nacházejících s v kořenové zelenině, obzvláště v brokolici. Byl identifikován jako chemopreventivní činidlo založené na schopnosti aktivovat Nrf2 dráhu. V současné době se řadí mezi nejúčinnější aktivátory antioxidačních drah. Jeho účinnost spočívá v modifikování všech pěti domén Keap1, kdy specifické cysteinové zbytky působí jako senzor, na které se sulforafan naváže, což vede

k rozvolnění vazby mezi Nrf2 a proteinem Keap1. Dalším mechanismem, kterým může sulforafan aktivovat jsou, geny řízené ARE je prostřednictvím dráhy aktivované mitogenem proteinkinázy (Myzak M.C. *et al.*, 2006).

Oltipraz je dobře známý induktor NADPH. Jedná se o chemopreventivní sloučeninu patřící do třídy dithiolethionas. Jeho působení zvyšuje expresi řady enzymů první a druhé fáze detoxikačního procesu. Za normálních podmínek je Nrf2 asociován v cytosolu s Keap1, který působí jako adaptér pro ubikvitin ligázu Cullin 3. Předpokládá se, že mechanismus účinky optiprazu spočívá v tom, že se váže na elektrofilní vazbu k Keap1 a tím naruší proces ubikvitinace a inhibuje degradaci Nrf2, kdy v návaznosti na to koncentrace Nrf2 stoupá. (Merrell M. *et al.*, 2008)

2.2.4. Inhibitory transkripčního faktoru Nrf2

Stejně jako existují aktivátory transkripčního fakturu Nrf2, byly objeveny i inhibitory této dráhy. Bylo prokázáno, že transkripční faktor Nrf2 hraje svou roli v onkogenezi a zvažuje se, že inhibice Nrf2 by se mohla stát prospěšnou při léčbě pokročilých stádií rakoviny. Na rozdíl od četně identifikovaných aktivátorů Nrf2 je velmi málo objevených inhibitorů. Nejznámějším inhibitorem Nrf2 je brustol, což je chemická látka ze skupiny kvasinoinoidů, která byla izolována z Bracea javanica. Brustol způsobuje zrychlenou ubikvitinaci a degradaci Nrf2 a tím snižuje jeho koncentraci v buňce. Poločas života molekuly Nrf2 je za normálních podmínek 62 minut, brustal snižuj tuto životnost na pouhých 25 minut. (Dongmei Ren *et al.*, 2010) Dalším prokázaným inhibitorem je luteolin, flavonoid přítomný například v celeru, paprice či petrželi. Nedávno objeveným inhibitorem je také alkaloidní ženšen. Podrobný mechanismu všech popsaných inhibitorů není znám, ale předpokládá se, že všechny urychlují ubikvitinaci a degradaci Nrf2.

2.3. EpRE-LUX

Je prokázáno, že chemopreventivní látky aktivují antioxidační systém druhé fáze. Zvýšená aktivita se děje na úrovni transkriptu, který se nazývá elektrofilně citlivý prvek (EpRE), díky elektrofilní povaze aktivátorů této sekvence. Dříve se pro detekci aktivity EpRE používalo přechodné transfekce s luciferázovými reportérovými genovými konstrukty, což bylo velmi neefektivní. Proto byla vyvinuta stabilní linie buněk s luciferázovým reportérem.

V první řadě byl zkonstruován reportérovy plasmid luciferázy, který byl vložen do jádra buňky v blízkosti promotoru genu EpRE. Výsledkem je konstrukce buněk, které poskytují expresi luciferázy řízené transkripcí sekvence EpRE v buňce.

Ve finále byly izolovány pouze buňky s ukotveným plasmidem luciferázy, kdy exprese luciferázy ve vytvořených buněčných liniích jsou v souladu s předpokládanou expresí EpRE (Boerboom A-M. *et al*,. 2006).

2.4. Vyhledávání biologicky aktivních látek

2.4.1. Extrakční techniky

Extrakce je separační metoda. Z pohledu fyzikální chemie je proces extrakce přechod složky mezi fázovým rozhraním dvou nemísitelných látek. Přechod částic z jedné fáze do druhé je způsobeno interakcí rozpouštědla a rozpuštěné látky. Existuje spousta extrakčních technik, v této rešerši jsem zmínila pouze ty nejpoužívanější.

2.4.1.1. Ultrazvuková extrakce

Provádí se v ultrazvukové vaně. Postup techniky je takový, že rozemletý vzorek je smíchán s vhodným rozpouštědlem. Mechanismus je založen na kavitaci, kdy se během procesu vytváří kavitační bubliny, které rostou až do kritického bodu, kdy se bublina zhroutí a uvolní se velké množství energie, které vyvolávají velký tlak. Analyt se tak převádí do rozpouštědla. Po ukončení se extrakt přefiltruje a zkoncentruje odpařením rozpouštědla. Jedná se o rychlou a levnou metodu. Výhodou je, že ultrazvuk může snížit extrakci bílkovin a dle výsledků může zvýšit extrakci aromatických látek.

2.4.1.2. Enzymová extrakce

Enzymy se vyznačují vysokou specifičností a také vysokou účinností. Při enzymové extrakci se využívá celulóza, pektináza a hemicelulóza. Tyto enzymy lze získat z hub, rostlin, ovoce a živočišných orgánů. Bylo prokázáno, že techniky enzymové extrakce zlepšují extrakční účinnost antioxidantů. Nedávno bylo vyvinuto spojení enzymové extrakce s ultrazvukovou či mikrovlnou extrakcí. Spojením těchto metod byla prokázána vyšší výtěžek extrakce při nižších nákladech.

2.4.1.3. Superkritická fluidní extrakce

Metoda pracuje se specifickými vlastnostmi superkritické tekutiny. Superkritická tekutina je z pohledu fyzikálně chemických vlastností tvořena přechodem mezi plynnou a kapalnou fází a tím vykazuje specifické vlastnosti, jako jsou například vysoká hustota, velká solvelační schopnost a také nízká viskozita. Všechny tyto vlastnosti jsou výhodou pro extrakci organických látek z tuhých matric. Nejvýznamnějším rozpouštědlem se stal oxid uhličitý, jehož výhodou je snadné dosažení nadkritické teploty a tlaku, je netoxický, nehořlavý a velmi

ekonomický. Superkritická fluidní extrakce se používá k vytěžení éterických olejů a jejich derivátů hlavně v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu (Dong-Ping Xu *et al*., 2017).

2.4.2. Frakcionace

Po získání extraktu je nutnost provést čistící procesy, které předcházejí samostatné konečné analýze. Frakcionace u surových extraktů je nezbytná, protože může existovat možnost, že se ve směsi nacházejí další příměsi, jako jsou vosky, chlorofyly, tuky, terpeny a jiné. Dále je frakcionace důležitá pro za koncentrování jednotlivých skupin analytů a tím provést separaci původního vzorku na určitý počet frakcí, kdy každá určitá frakce obsahuje rozdílný poměr jednotlivých složek původního vzorku. (Haleem J. Issaq *et al*., 2002)

2.4.2.1. Frakcionace (extrakce) na pevné fázi.

Považuje se za jeden z nejúčinnějších technik jak pro rostlinné tak i pro biologické vzorky. Jedná se o metodu, která využívá interakci organických látek s SPE kolonou a poté následuje jejich postupné vymývání, čím získáme frakce s podobnými látkami. Sorbenty se dělí na tři skupiny polární, nepolární a iontová.

Frakcionace se provádí ve čtyřech krocích

- Kondicionace – funkční skupiny sorbentu jsou aktivovány a připraveny pro interakci se vzorkem
- Retence – analyt interaguje se sorbentem a je vázán
- Selektivní promytí – odstranění nežádoucích složek, které nebyli navázány
- Eluce – analyt je vyvázán z vazby se sorbentem a jímán do zkumavek

V diplomové práci byly použity kolonky C18. Pro postupné uvolňování látek používá rozdílné polarity roztoku vody a metanolu v rozmezí od 0% do 100%, kdy se postupně v první řadě vymývaní látky polární a v poslední řadě látky málo polární nebo nepolární. Metoda SPE je rychlá dobře reprodukovatelná a levná. Provádí se převážně pro kapalné vzorky. (Buldini P. L. *et al*., 2002)

2.4.2.2. Frakcionace (extrakce) kapalina-kapalina

Používá se pro přípravu vzorků pro kvantitativní a kvalitativní analýzu. Jedná se o nejstarší metodu. Mechanismus extrakce je založen na relativní rozpustnosti analytu ve dvou nemísitelných fázích. Praktiky se jedná o přechod rozpuštěné látky z jedné kapaliny do druhé. (Ridgway K. *et al*., 2007)

2.4.3. Dereplikace

Dereplikace je definována jako rychlá identifikace dříve izolovaných sloučenin automatizovaným způsobem. Identifikuje sloučeniny srovnáváním zpracovaných experimentálních dat s daty známých sloučenin. Pro proces dereplikace je proto potřeba různých výpočetních zdrojů jako jsou databáze. Standardní experimentální postup pro identifikaci látek začíná purifikací bioaktivních sloučenin pomocí frakcionace řízenou bioanalýzou z přírodních extraktů. Dále se změří spektrální údaje, které jsou manuálně interpretovány, aby se následně odvodila struktura sloučeniny pomocí literárních zdrojů. Avšak tento postup je s rostoucí pravděpodobností izolace již známých sloučenin časově i ekonomicky náročný a nepřiměřený konečným výsledkům. Dereplikace vyžívá předchozích znalostí dřív izolovaných sloučenin pro včasnou identifikaci za účelem minimalizovat přítomnost člověka. V ideálním případě se používají již předběžné experimentální údaje a vyloučení již identifikovaných sloučenin. Velkou účast v rychlé identifikaci již známých sloučenin má rozvoj digitálních databází. Databáze obsahují chemické sloučeniny s jejich biologickými a fyzikálními vlastnostmi.

Dělíme je na obecné databáze a databáze specifické pro přírodní produkty. Pojem obecná databáze zahrnuje celkově asi 15 chemických databází, které pokrývají více než 10% již izolovaných přírodních produktů, obsahuje asi 4 tisíce položek, včetně syntetických a přírodních sloučenin a také obsahují důležité informace pro dereplikaci, jako jsou bioaktivita látek, zdrojový organismus nebo výsledná spektra izolovaných látek. Navzdory širokému pokrytí není vyhledávání pro dereplikaci v těchto databázích jednoduchá, protože obsahují i seznamy syntetických sloučenin. Dále existuje asi 15 databází specifických pro přírodní produkty, které obsahují katalog molekul pouze přírodního původu. Některé specifické databáze mají nižší pokrytí, protože se zaměřují pouze na konkrétní sloučeniny či bioaktivitu nebo na konkrétní skupinu zdrojových organismů. I přes velký pokrok jsou výpočetní nástroje pro dereplikaci stále ještě ve vývoji (Ahmed Mohamed *et al*., 2016).

2.4.4. Korelační přístupy

Korelace je statistické měřítko vztahů mezi dvěma veličinami pokud se jedna mění a druhá ne. Pokud se mezi dvěma veličinami ukáže korelace, je zde pravděpodobnost, že se sobě závisí. Aby se představil závislost mezi veličinami X a Y, lze získat tak, že tyto znaky sledujeme u *n* statistických jednotek. Korelační analýza je základní metodou pro zkoumání závislostí mezi proměnnými. Cílem korelační analýzy je popsat vzájemný vztah mezi dvěma proměnnými. Výsledkem korelační analýzy jsou určité hodnoty v závislosti na škále v intervalu <-1;+1>. Korelace mezi proměnnými lze měřit s použitím různých indexů neboli koeficientů. Nejpoužívanější koeficienty jsou Kendallův koeficient, Pearsonův koeficient a Spearmanův koeficient (Hauke, J. *et al*., 2011).

Kendallův koleračí koeficint může být použit jako alternativní ke Spearmanovu koeficientu pro data ve formě řad. Jak řekl Kendall:„Koeficient, který jsme zavedli, poskytuje průměrnou hodnotu mezi dvojicemi členů“. Hlavní výhodou Kendellova koeficientu je skutečnost, že jeho distribuce má mírně lepší statistické vlastnosti a existuje přímá interpretace této statistiky z hlediska porovnávání shodných a neshodných dat (Hauke, J. *et al.,* 2011).

Pearsonův koeficient byl objeven v roce 1846 Bravisonem, ale byl to až Karl Pearson, který nejprve popsal jeho výpočet a ukázal, že se jedná o jednu z nejlepších možných koeficientů. Pearsonův korelační koeficient je měřítko síly lineárního vztahu mezi dvěma proměnnými. Tedy může charakterizovat pouze lineární vztah, odráží pouze variabilitu kolem lineárního trendu. Nabývá hodnoty od <-1;+1> s tím, že hodnota R je kladná, když vyšší hodnota X veličiny souvisí s vyššími hodnotami veličiny Y a naopak. Hodnoty 1 získáme pouze v případě, kdy body leží v bodovém grafu na přímce s kladnou směrnicí. (Bonett D., 1999)

Spearman přijal Pearsonův koeficient jako míru síly vztahu mezi dvěma proměnnými, které nelze kvantitativně měřit. Spearmenův korelační koeficient je ne parametrická statistika, navržená jako měřítko síly spojené mezi dvěma proměnnými. Nejedná se o měřítko lineárního vztahu mezi dvěma proměnnými. Spearmanův koeficient pracuje pouze s pořadím pozorovaných hodnot. Na rozdíl od Pearsonova koeficientu, který popisuje lineární vztahy mezi dvěma veličinami X a Y, Spearmanův koeficient popisuje vztah mezi veličinou X a Y a odpovídá montónním funkcím, které mohou být i nelineární.(Haukeet J. *et al*., 2011)

2.4.5. LC-MS metabolomika

Metabolomika je vědní obor zabývající se komplexní analýzou všech metabolitů v biologickém systému, tím doplňuje transkriptomiku a proteomiku, protože poskytuje kvantitativní hodnocení analytů, které mají molekulovou hmotnost menší než 1800 Da. (Zhou B. *et al*., 2013)

2.4.5.1. Princip LC-MS

Kapalinová chromatografie je nejběžnější používanou separační technikou. Analyzovaný vzorek je v prvním kroku převeden do kapalného roztoku a mísen s mobilní fází, směs posléze prochází pod tlakem přes pevnou stacionální fázi umístněnou v koloně. Při průchodu kolonou jsou jednotlivý části analytu zpomalovány v závislosti na specifických interakcích se stacionální fází. Míra pomalení analytu tedy závisí na povaze vzorku, složení mobilní fáze i na složení staciolnální fáze. Analyt je poté z kolony postupně vymýván ve specifickém retenčním čase. Nejčastěji se používají fáze, kdy jedna se hydrofilní a druhá hydrofobní. U kapalné chromatografie existují dvě základní typy kolon a to kolony s normální a kolony s reverzní fází (obrácené) (Huber C.G, Oberacher H., 2001)

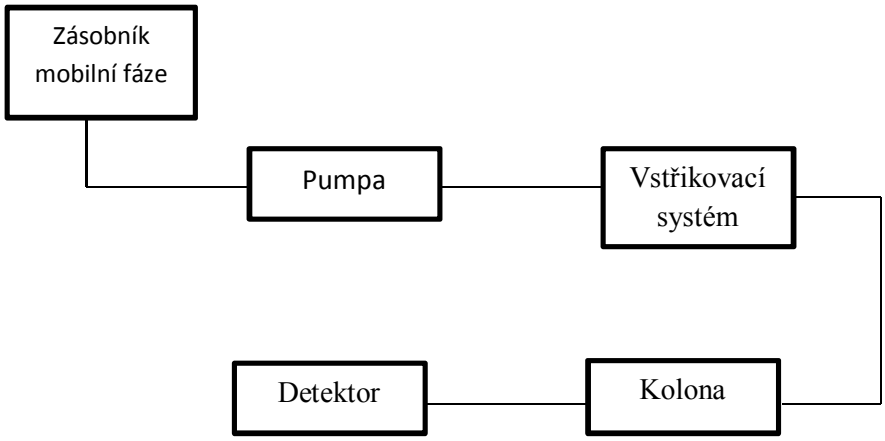
Kolony s normální fází pracují na pripcipu seperace analytu v závislosti na jeho polaritě. Kolona (staciolnální fáze) je v tomto případě naplněna polárním materiálem. Mobilní fáze je v tom případě nepolární a je tvořena ze směsi hydrofobních rozpouštědel.

Kolony s reverzní fází jsou opakem normální fáze. Stacionální fáze je nepolární. Kolony jsou plněny silikagelovými kuličkamy o průměru několika μm, na které jsou navázány nerozvětvené alkylové řetězce o délce 8-18 uhlíků. Mobilní fáze se poté skládá z polárních rozpouštědel například metanolu či vody. Kapalinové chromatografie s reverzní fází jsou v metabolomice používanější, protože se metabolity lépe rozpouští v polární mobilní fázi a v koloně lépe interagují s nepolární stacionální fází. (Douša, M 2002)

Existují i další typy kapilární chromatografie jako jsou iontoměničová chromatografie či gelová permeační chromatografie (Manz *et al*., 2015).

Dalším parametrem, který ovlivňuje separaci vzorku je vnitřní průměr kolony, kdy kolony v nižším průměrem mají lepší citlivost s menší spotřebu vzorku. Pro separaci LC/MS se využívají kolony o průměru 1-2 mm.

Detektory používané ve spojení s LC jsou založeny na absorpci UV záření, absorpci sekundárního záření UV, detektory založené na měření intenzity rozptýleného světla a v neposlední řadě hmotnostní spektrometry.



Obr.č.3. Schéma HPLC, převzato dle https://slideplayer.fr/slide/11721109/

Dle všeobecně platné definice je hmotnostní spektrometrie fyzikálně-chemická metoda, která využívá separace urychlených ionizovaných částic ve vakuu, dle jejich hmotnosti při průchodu magnetickým polem. Principem je tedy převod neutrálně nabité částice na kladné či záporné ionty, ty jsou poté hodnoceny na základě *m/z* (efektivní hmota), kde *m* je hmotnost a *z* je náboj částice. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří částí iontového zdroje hmotnostního spektrometru a detektoru. (Huber C.G, Oberacher H., 2001)

Prvním krokem je převod analytu do ionizovaného stavu. Nejčastější typem ionizace je ionizace elektorosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku. ESI je měkká ionizační technika. Principem ionizace touto metodou je, že kapičky roztoku, které obsahují analyt, jsou rozprašovány za atmosférického tlaku. Mezi vstřikováním kapaliny a vstupem do MS analyzátoru je vloženo napětí (3-5kV), čím se z kapiček stávají nabité kapičky, ze kterých se postupně odpařuje rozpouštědlo, čímž na povrchu kapičky vzniká vyšší napětí, až ke kritickému bodu. V momentě, kdy je napětí na povrchu kapičky příliš velké, dojde k rozpadu kapičky na jednotlivé ionty, tento jev se nazývá coulombická exploze. Tato metoda je vhodná pro anality, které jsou polárního charakteru. (Fenn J.B., 2002)

Chemická ionizace za atmosférického tlaku patří do skupiny měkkých ionizačních technik se současnou desorbcí. Mobilní fáze proudí z chromatografického systému vyhřívanou vnitřní kapilárou, která obsahuje napětí 2,5-5 kV, jejich konec vede do MS analyzátoru. Na konci kapiláry je mobilní fáze rozprášena na drobné kapičky, které jsou vysušovány, čímž vzrůstá povrchové napětí a z kapky se postupně uvolňují ionty. Tato ionizace se hodí pro nepolární a lehce polární látky.

Mezi další ionizační techniky paří MALDI, která se používá pro studium proteinů, či elektronová ionizace, která vede k fragmentaci molekul.

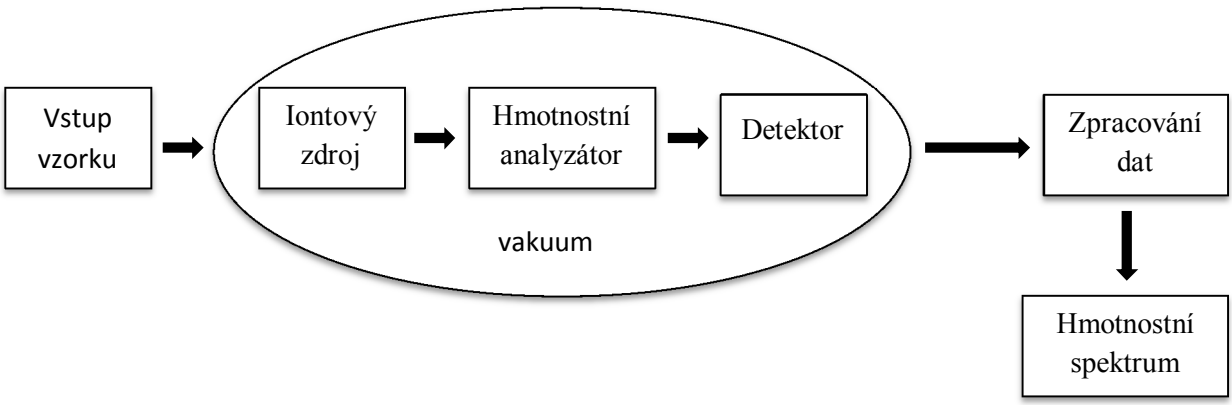
Další nedílnou součástí hmotnostního spektrometru je hmotový analyzátor, který slouží k rozdělní iontů podle hodnoty m/z. Existuje několik typů analyzátorů. Prvním z nich je kvadrupólový hmotový analyzátor, který využívá oscilujícího elektrického pole pro stabilizaci iontu. Ionty procházejí mezi čtyřmi tyčemi, kterými prochází napětí opačné polarity. Ionty ve střídavém elektrickém poli oscilují a dle nastavení filtru selektují ionty o určitém poměru m\z.

V analyzátoru doby letu, jsou ionty separovány při průletu mezi zdrojem a detektorem. Jednotlivé ionty mají rozdílnou dobu letu, která je dána velikostí iontu. Dle doby letu se pak vypočítává hodnota m/z.

Iontová past využívá elektrické pole k uzavření iontů v ohraničeném prostoru, ve kterém se ionty pohybují po kruhové trajektorii. V momentě, kdy iont dosáhne určitého napětí, opustí kruhovou trajektorii a putuje směrem k detektoru.

Pro metabolomickou analýzu se využívá tandemové MS, tedy kombinace dvou a více hmotnostních spektrometrů navazující na sebe. Nejvýznamnější kombinací jsou dva kvadrupóly či kvadrupól a analyzátor doby letu. Princip uspořádání MS/MS je takový, že vybraný iont je podroben excitaci, většinou srážkou s inertním plynem, čím dochází k rozpadu iontu a fragmenty, jejich hmotnostní spektrum je měřeno druhým analyzátorem

Obr.č.5 Schéma hmotnostního spektrometru, podle http://www.muj-web.cz/vyuka/MS/kestazeni.htm



2.4.5.2. Necílená analýza

Metabolomická analýza se dělí na cílenou a necílenou analýzu. Cílený přístup se zaměřuje na identifikaci a kvalifikaci vybraných metabolitů. U cíleného přístupu jsou známé chemické vlastnosti analyzovaných látek, a proto může být vzorků upravena tak, aby se snížily účinky matrice a ostatních látek obsažených ve sloučenině vzorků. Cílený přístup je většinou založen na hypotézách na rozdíl od necíleného přístupu, kdy lze vygenerovat analýzu novou. (Zhou B. et al., 2013)

U necílené analýzy je nejprve navržen experiment, připraví se vzorek, proběhne extrakce a dále je vzorek separován. Následně je separovaný vzorek analyzován, nejčastěji pomocí hmotnostní spektrometrie.

Poté co jsou ionty zpracovány hmotnostním spektrometrem, jsou dostupná pouze surová data, která se před konečnou analýzou musí zpracovat. Zpracování surových dat zahrnuje několik důležitých kroků, jako jsou:

a) Odečtení cílené odchylky, která má za úkol eliminovat vrcholy, které vykazují nepřirozeně velkou či malou hodnotu v porovnání s ostatními vrcholy
b) Filtrování, které složí k odstranění šumu či kontaminací
c) Iontová anotace, které sdružuje ionty, které pocházejí ze stejného metabolitu, protože v metabolomice založené na metodě LC/MS může být jeden metabolit často reprezentován více píky, které mají rozdílné hodnoty hmoty, ale mají podobný retenční čas. Tedy jeden metabolit může být prezentován také jako izotop, adut či fragment.

Cílem necílené analýzy je identifikovat všechny molekuly, které byly obsaženy ve vzorku. Což je komplikovaný proces, protože vzorek obsahuje i molekuly, které nejsou zájmové, proto se v praxi používá diferenční analýza, která porovnává profil molekuly mezi dvěma vzorky, a hledají se látky, které představují rozdíl mezi nimi. Při necílené analýze jsou ze vzorků vyextrahovány píky látek. Jedná se o komplikovaný proces, který vyhledává signály odpovídající jedné sloučenině a spojuje je do molekulových signálů (features), kdy jednotlivé ionty spojuje jejich neutrální hmotnost.

Následná identifikace metabolitů necílené metabolomické analýze je dosaženo hlavně pomocí vyhledávání na základě hmoty a následnou manuální verifikací. Nejprve se vyhledává hodnota m/z požadovaného molekulového iontu oproti databázi. Z databáze se dostane několik předběžných identifikací molekuly, která má molekulovou hmotnost v rozmezí

k molekulové hmotnosti, která byla změřena. Avšak necílená identifikace může zřídka kdy poskytnout jednoznačnou identifikaci zájmového iontu z několika důvodu. Například bylo zjištěno, že dokonce s přesností menší než 1ppm je tento způsob identifikace nedostatečný z důvodu přítomnosti dalších sloučenin, které mají extrémně podobnou molekulovou hmotnost jako zájmový iont. Dalším nedostatkem je neschopnost systému rozlišit izomery, které mají stejné elementární složení, ale mají jinou strukturu. Dalším problémem je tvorba již zmíněných aduktů (Na^+, K^+, NH_3), izotopů nebo dvojnásobně nabytých iontů, které zvyšují počet detekovaných vrcholů. A v neposlední řadě je zde problém databází metabolitů, které nejsou neomezené. V praxi to tedy znamená, že většina iontů zůstává neidentifikována nebo v lepším případě se objeví několik kandidátů pro identifikaci.(Zhou B. et al., 2013)

2.5. Rostlinný materiál

2.5.1. Satureja hortensis

Český název pro *Saturea hortensis* zní Saturejka zahradní. Z botanického hlediska se jedná o jednoletou, výjimečně dvouletou rostlinu, která je silně aromatická

2.5.1.1. Morfologie

Kořen je větvený, tenký a vřetenovitý. Lodyha je přímá asi 0,3 m vysoká od spodu většinou dřevnatá, směrem vzhůru se rostlina silně větví a dostává se jí zelené či fialové barvy. Listy se skládají z krátkého řapíku s kopisťovitou čepelí, které bývají 1-2,5cm dlouhé a 2-5cm široké. U vrcholu jsou listy zašpičatělé, okraje listů jsou jemně brvité. Květenství je tvořeno lichopřesleny, které poté vytvářejí lichoklasy. Období kvetení je od července do září. Kalich je 3-4mm dlouhý, zvonkovitý s nezřetelnými dvoupysky. Koruna je 3-7mm dlouhá výrazně dvoupyská, barvy většinou světle fialové či růžové. Tyčinky jsou krátké, dvojmocné a z koruny nevyčnívají, semeník je svrchní a dokonale čtyřdílný. Plodem jsou čtyři šedozelené, 1-1,5mm dlouhé, hladké tvrdky. (Chrtek T. et Tomšovic R., 2000)

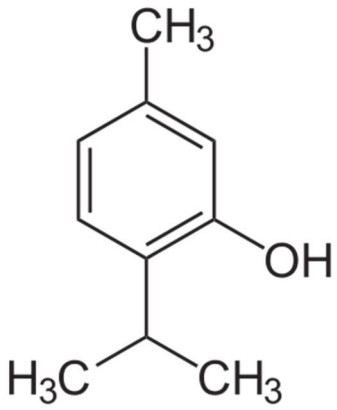
Původ saturejky je v jihovýchodní Evropě, odkud se dále šířil do Evropy a Asie. V současné době se jako planě rostoucí druh vyskytuje v jižní a střední Evropě, Indii a severní Americe. (Habán et al. 2001)

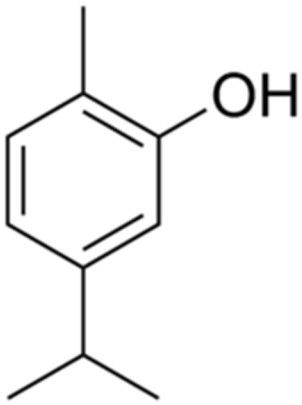
Saturejka se používá v potravinářství, farmakologii a kosmetickém průmyslu, díky svým jednoduchým kultivačním vlastnostem. Tradičně se používá proti bolesti hlavy či k léčbě střevních potíží. (Tepe B. et Clikiz M., 2014)

2.5.1.2. Fytochemické složení

Těkavé látky-terpeny

Satureja hortensis je obzvláště bohatá na okysličené monoterpeny, přičemž mezi nejvýznamnější patří thymol a karvakrol. Dalšími objevenými terpeny jsou linalol, borneol, limonem, myrca a další. Jednotlivé zastoupení jednotlivých esencionálních olejů je dáno faktory prostředí, jako jsou klimatické podmínky, typ půdy či nadmořská výška. (Tepe B. et Clikiz M., 2014)





Obr č.6. Strukturní vzorec thymolu a karvakrolu, převzato z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Fenoly

Bylo prokázáno, že v suchých listech je obsaženo 1,97% fenolických sloučenin. Déle na základ výsledků z chromatografické analýzy bylo celkově identifikováno šest flavonů a dva fenylpropanoidy – kyseliny rozmarýnové bylo prokázáno 3,75% a to převážně v listech a kyselina chlorogenní, která je přítomna v 0,35%. Mezi další fenoly patří keprová kyselina, galová kyselina, vanilová kyselina či kyslina p-kumarová. (Kemertelidze et al. 2004)

Flavonoidy

Flavonoidy se uplatňují v rostlinném systému jako barevné sloučeniny. V přírodě se vyskytují volně nebo vázané na glykosidy. Celkem bylo naměřeno 6,2% flavinoidů v suchém extraktu *Satureja hortensis.* Skupina flavinoidů se dále dělí na několik podskupin, jako jsou flavony, flavonoly a flavanonaly. Flavinoidy vážící se na glykosidy se také dělí do několika podskupin například flavinoidní glykosidy či glukosidové deriváty.

Jako nejčastější flavony u rodu Saturea byli identifikovány luteolin a apigenin, dále bylo zjištěno, že právě tyto dvě látky jsou nejvíce zastoupeny v *Satureja hortensis.* Do podskupiny flavonolů patří také látky kvarcilin, epiketechin-3-O-galát či myrcelin.

Kromě již výše zmíněných fytochemických látek byli objeveny i další. Například mastné kyseliny, enzymy, fytosteroidy. Avšak pouze u *Satureja hortensis* byli objeveny enzymy jako flavocytochorom (extrahován z listu), cytochrom b, peroxidázový isoenzym (extrahován z kořene i listu) nebo superoxiddismutáza. (Tepe B. et Clikiz M., 2014)

Anorganické sloučeniny

Mezi nejzajímavější anorganické prvky patří draslík (největší zastoupení ze všech minerálů), vápník a sodík. Také byly prokázány stopy fosforu a horčíku. Mezi další účinné látky, které byli izolovány z listů *Satureja hortensis* patří vitamín C a vitamín A, kterých jsou prokázané antioxidační účinky. (Kemertelidze et al. 2004)

2.5.1.3. Antioxidační účinky

Jak již bylo řečeno u *Satureja hortensis* byl zjištěn vysoký obsah fenolů a flavinoidů, proto byla *Satureja hortensis* testována různými antioxidačními testy, které zřetelně prokázali účinnost *Satureja hortensis* jako antioxidačního činidla. Také podle literatury bylo zjištěno, že éterické oleje rodu Saturea vykazují vysokou antioxidační aktivitu v důsledku jejich okysličených monoterpenů, konkrétně thymolu a karvicrolu (Tepe B. et Clikiz M., 2014).

Například bylo potvrzeno, že u potkanů, kterým byl podáván esenciální olej ze *Satureja hortensis*, vykazovali po 8 týdnech podávání prokazatelně vyšší koncentraci glukathionu a katalázy v séru oproti kontrolní skupině. (Fereshteh J. et kol, 2016)

2.5.2. Crocus sativus

Crocus sativus česky známí jako šafrán setý patří do třídy jednoděložných vytrvalých rostlin.

2.5.2.1. Morfologie

Rostlina se skládá z hlísty dorůstající až do 5cm, má žilnaté obaly. Listy jsou vzpřímené, zelené a lysé, obvykle 2,5cm široké, objevující se v době květu. Květy se vyskytují v nachových barvách s tmavými vlákny a tmavě fialovým zbarvením v hrdle květu. V každém květu jsou tři nitkovité, 2-3cm dlouhé purpurově hnědé čnělky, které se sbírají ručně

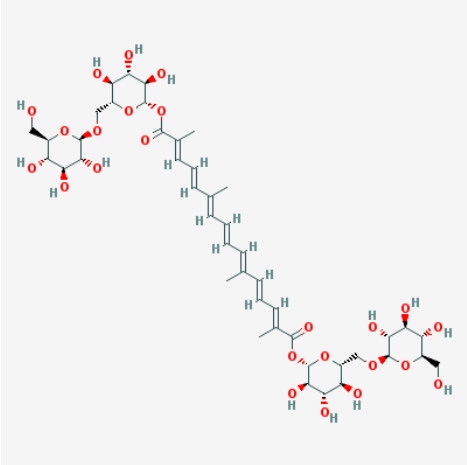
Původ šafránu je v Orientu. V současnosti není znám jako divoce rostoucí bylina. Nejvíce se pěstuje v oblasti středozemního moře a na středním východě. Hlavními producenty jsou Írán, Řecko a Maroko. Dle statistik se jedná o nejdražší koření na světě. (Negbi, M. 1999)

2.5.2.2. Fytochemické složení

Dle chemických analýz se odhaduje složení šafránu na12% bílkovin, 5% tuku, 5% minerálů a 63% cukrů. Šafrán obsahuje také stopové množství vitamínů. Rozsah jednotlivých složek závisí na podmínkách pěstování a země původu. Organická složka *Crocus sativus* obsahuje 150 různých těkavých a aromatických sloučenin. Jsou tu však obsaženy i látky netěkavé a to zejména skupina karotenoidů, které slouží jako barvivo. Hlavními bioaktivními sloučeninami jsou krocin, krocetin, picrokrocetin a safranal. (Somayeh R., 2015)

Krocin

Z chemického hlediska se řadí do skupiny hydrofilních přírodních karotenoidů, je tedy rozpustný ve vodě díky sacharidové vazbě s glukózou. Jedná se o nejvíce zastoupenou aktivní sloučeninu v sušině šafránu, dle odhadů se jedná o 30%. Molekula krocinu má typicky tmavě červenou barvu, díky které se používá jako barvivo a také způsobuje jeho zabarvení. (Bagur M.J. et al., 2018) Z pohledu stavby molekuly se jedná o diester odvozený od disacharidu gentiobiosy a dikarboxylové kyseliny krocetinu. U krocinu je dokázána farmaceutická aktivita, konkrétně antioxidační, kdy je krocin schopen rozkládat volné radikály kyslíku, a tím chrání buňky před oxidativním stresem. (Abdullaev F., 2009)

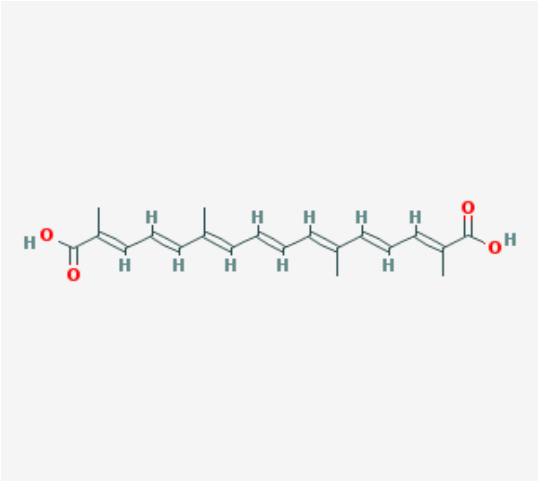


Obr.č.7. Strukturní vzorec krocinu, převzato z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.go

Krocetin

Jedná se o přírodní karotenoid dikarboxylové skupiny. Je málo rozpustný ve vodě, dobře se však rozpouští v organických rozpouštědlech. Přirozeně se nachází v cis i trans formě, což bylo dokázáno pomocí výkonné kapalinové chromatografie, přičemž cis forma volně přechází do trans formy, která je stabilnější. Krocetin je hlavním prekurzorem krocinu.

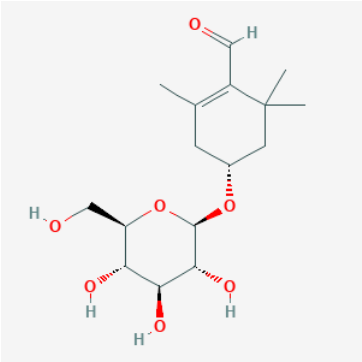
Proto se v rostlině ve volné formě nachází pouze v 6% volného krocetinu, zbylých 94% je vázáno jako krocin (Melnyk J.P. *et al*., 2009)



Obr.č.8. Strukturní vzorec krocetinu, převzato z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Picrokrocin

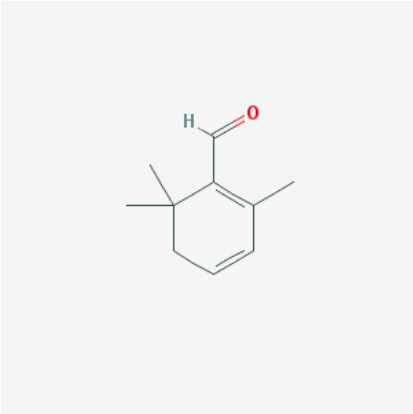
V rostlině je zodpovědný za hořkou chuť. Z chemického hlediska jde o monopren glykosidový prekurzor safranolu. V rostlině se vytváří jako produkt degradace zeaxanthinu. Jedná se o druhou nejrozšířenější aktivní sloučeninu, přítomna je až v 26% sušině. (Somayeh R. *et al.,* 2015)



Obr.č.9 Strukturní vzorec picrokrocinu, převzato z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Safranal

Jde o látku, která je zprostředkovatelem vůně, přestože je v šafránu okolo 40 sloučenin souvisejících s aroma, safranol představuje 65% z celkového množství. Vzniká jako produkce přirozené deglykosylace picrakrocinu. Kromě antioxidačních vlastností má safranal i antidepresivní vlastnosti. (Somayeh R. 2015)



Obr.č.10. Strukturní vzorec safranolu, převzato z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

2.5.2.3. Antioxidační účinky

Crocus sativus se již dlouho používá jako přírodní lék, ale v posledních letech byly objeveny i jeho protirakovinové a antioxidační vlastnosti. (Bagur M. J. *et al.,* 2018). Antioxidační účinky *Crocus sativus* jsou připisovány jeho fenolickým sloučeninám, u kterých byla obecně prokázána antioxidační aktivita. Avšak také jeho aktivním složkám jako je safranol či krocin. Antioxidační aktivita crocinu spočívá v jeho schopnosti zachytávat volné radikály, hlavně tedy superoxidované anionty a tím chránit buňky před oxidativním stresem. Další testy také potvrdili, že krocetin snižuje lipidovou peroxidaci, která je indukovaná reaktivním kyslíkem. Antioxidační testy potvrdily, že hlavní antioxidační aktivita může být připisována hlavně krocinu a safranolu (Mashmoul M. *et al.,* 2013) Avšak při vyšších dávkách může být šafrán i toxický, což se projevuje necitlivostí, nevolností či závratěmi. (J. P. Melnyk J.P. *et al.,* 2009)

3. Experimentální část

3.1. Rostlinný materiál

Pro první fázi experimentu byly použity náhodně vybrané vzorky rostlinného materiálu. Levandule lékařská – list *(Lavandula angustifolid)*, pepř černý *(Piper nigrum)*, levandule lékařská – květ *(Lavandula angustifolid)*, badyán pravý *(Illicium verum)*, majoránka zahradní *(Majorama hortensis)*, libeček lékařský *(Levisticum officinale)*, tymián obecný *(Thymus vulgaris)*, saturejka zahradní *(Satureja hortensis)*, dobromysl obecná *(Origanum vulgare)*, šafrán setý *(Crocus sativus)*, skořice celá *(Cinnamomum verum)*, česnek setý *(Allicim sativum)*, kurkuma *(Curcuma longa)*, bazalka pravá *(Ocimum basilicum)*, muškátový oříšek *(Myristica fragrans)*, rozmarýn lékařský *(Rosmarinum officinalis)*, zázvor lékařský *(Zingiben officinale)*.

Pro druhou část experimentu byly z náhodně vybraných vzorků vybrány dvě rostliny a to šafrán setý *(Crocus sativus)* a saturejka zahradní *(Satureja hortensis)*, které jsou běžně dostupné.

3.2. Chemikálie

Pro kultivaci buněk byly použity tyto chemikálie EMEM, penicilin, gluthanin , trypsin (vše od firmy Sigma-Aldrich, USA) a fosfátový pufr PBS (PENTA, Česká republika). Pro extrakci a frakcionaci byl použit metanol ≥99,9% (Linde, Germany), kyselina mravenčí (Signa-Aldrich, USA) a destilovaná voda. Pro testování extrakcí na buňkách byly použity stejné chemikálie jako pro kultivaci buněk a navíc jako standard byla použita kyselina lipoová (Sigma-Aldrich, USA). Pro měření relativní luciferázové aktivity byly použity dva roztoky. Prvním roztokem byl lyzační pufr obsahoval Tris, DTT a DCTA (vše od firmy Sigma-Aldrich, USA). Druhým roztokem byl Flash mix, který obsahoval tricin, ATP, uhličitan hořečnatý penta hydrát, síran hořečnatý heptahydrát a luciferin (vše od firmy Sigma-Aldrich, USA). Pro přípravu mobilních fází byly použity kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, USA), ≥99,9% acetonitril pro LC-MS (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany) a ≥99,9% metanol (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany). Semenáčky byly homogenizovány kapalným dusíkem (Linde, Munich, Germany).

3.3. Metody

3.3.1. Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích o objemu 15 ml (TPP, Švýcarsko) určených pro adherentní buňky. Buňky byly kultivovány v předem připraveném médiu, které obsahovala 440 ml EMEM, 50 ml fetálního séra, 5 ml antibiotik a 5 ml gluthaminu. Během inkubace v inkubátoru (Shel Lab, USA) byly udržovány tyto fyzikální podmínky: teplota v rozmezí od 36,8 až 37,2°C, 5-5,5% podíl CO_2 v atmosféře a 100% relativní vlhkosti vzduchu. Buňky byly pasážovány vždy ve střední kultivační lahvi vždy po 48 h. Manipulace s živými buňkami probíhala ve sterilním prostředí flowboxu.

3.3.2. Příprava buněk na experiment

Médium a ostatní roztoky byly předem vytemperovány na teplotu 37°C. Dále bylo od buněk odsáto médium a bylo přidáno 5ml 1x PBS na oplach buněk. Poté bylo PBS odsáto a bylo přidáno 2ml trypsinu. Láhev poté byla opět vložena na 5 minut do inkubátoru o teplotě 37°C. Po vyjmutí lahve z inkubátoru bylo zkontrolováno, zda se všechny buňky uvolnily ze dna lahve a poté se připipetovalo 8ml média. Pro experiment byly buňky přepočítány pomocí Burkerovy komůrky.

3.3.3. Extrakce rostlinného materiálů

Dvakrát 30mg vzorku bylo naváženo do mikrozkumavek Eppendorf 2 ml (Sigma-Aldrich, USA) na laboratorních analytických vahách (Pioneer PA24C, Ohaus, USA) s přesností na jedno desetinné číslo. Dále bylo přidáno ke vzorkům 1 ml 80% MeOH s přídavkem kyseliny mravenčí o finální koncentraci 0,1%. Extrakce probíhala v ultrazvukové lázni (VWR International, Radnor, USA) po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky homogenizovány na kulovém oscilačním mlýnku Verder MM 400 (Retsch, Haan, Germany) s kovovou kuličkou po dobu 5 minut při 57 Hz. Následně byly vzorky sonifikovány v ultrazvukové lázně (VWR International, Radnor, USA) po dobu 10minut při pokojové teplotě. Po vyjmutí zkumavek z ultrazvukové lázně byly zkumavky se vzorkem centrifugovány na centrifuze 5424 (Eppendorf, Hamburg, Germany) při 20238 g po dobu 10 min, kdy následně byl supernatant přepipetován do čistých mikrozkumaek Eppendorf 2ml, a odpařen pomocí dusíkové odparky TurboVap LV (Caliper LifeScience, Hopkinton, USA). Suchý extrakt byl rozpuštěn v redestilované vodě s přídavkem 0,1 % HCOOH, pokud byl vzorek dále frakciován. Pokud byl vzorek určen pouze k počáteční screeningovému testování, byl odparek rozpuštěn v 80 % metanolu. Vzorky byly umístěny do mrazicího boxu o teplotě -80°C.

3.3.4. Frakcionace rostlinného materiálu

Vzorky byly separovány reverzní chromatografií na pevné fázi s použitím kolonek C18 (Waters, Milford, USA). Kolony byly umístěny do stojanu a promyty 10ml MeOH pro odstranění nečistot. Dále byly připraveny roztoky MeOH s redestilovanou vodou v koncentrační řadě 10%-100% MeOH.

Proces frakcionace se skládá z několika kroků. Prvním krokem byla kondicionace, kdy je na kolonu naneseno 2ml MeOH, roztok se nechá vykapat. Druhým krokem byla ekvilibrace, která se v tomto případě provedla s pomocí 2ml vody, roztok se nechá samovolně vykapat. Třetím krokem bylo nanesení vzorku na kolonu, v tomto případě se jednalo o dva krát 1 ml extraktu rozpuštěného v okyselené vodě. Čtvrtým krokem je promytí 2 ml 0,1% HCOOH ve vodě. Posledním krokem frakcionace je eluce, kdy dochází k postupnému vymývání vzorku uchyceného v sorbentu kolony, dle polarity molekul obsažených v extraktu. Koncentrační řada metanolu byla navržena tak, aby se látky

obsažené v extraktu vymývaly postupně dle své polarity, což znamená čím vyšší koncentrace metanolu, tím byli vymývané látky méně polární. Postup eluce je vyobrazen v tabulceč.1. Jednotlivé frakce byly odebrány do oddělených mikro zkumavek Eppendorf.

Tabulka č. 1 Koncentrační řadě metanolu, použita pro první frakcionaci

Koncentrace MeOH	Objem MeOH	Číslo frakce
10%	3ml	F1
20%	3ml	F2
30%	3ml	F3
50%	3ml	F4
60%	3ml	F5
70%	3ml	F6
100%	3ml	F7

Po ukončení eluce byly jednotlivé frakce odpařeny v dusíkové odparce. Suché frakce byly poté rozpuštěny v 80 % metanolu.

Poté co byla provedena první frakcionace a testy na buňkách, bylo vybráno několik vzorků, které splňovaly podmínky pro další část experimentu. Další část experimentu zahrnoval další frakcionaci tentokrát s rozdílnou koncentrační řadou metanolu. Postup francionace na SPE kolonách byl stejný jako v předchozím postupu. Koncentrační řada metanolu je vyobrazena v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 Koncentrační řade metanolu, použita pro druhou frakcionaci

Koncentrace MeOH	Objem MeOH	Číslo frakce
10%	3ml	F1
20%	3ml	F2
30%	3ml	F3
40%	3ml	F4
50%	3ml	F5
60%	3ml	F6
80%	3ml	F7
100%	3ml	F8

3.3.5. Testování vzorků na buňkách

V dalším kroku byly frakce vzorků testovány na buňkách linie EpRE-LUX. V prvním kroku byly buňky sklizeny a naředěny na koncentraci 20000 buněk na jamku, pro 96 jamkovou mikro titrační destičku (Shoeller, Česká republika). Poté byly buňky vysazeny do 96 jamkové mikro titrační desky po 150 µl roztoku na jamku a inkubovány 24h při teplotě 37°C.

Po 24h bylo staré médium od buněk odsáto a vyměněno za nové médium EMEM, které obsahovalo 1% gluthamin a testované látky. Roztok média a testovaných látek byl předem připraven v rezervoárech, které byly sterilizovány pod UV zářením. Koncentrace extraktů v jednotlivých jamkách je uvedena v tabulce č. 3. Koncentrace jednotlivých frakcí extraktu je uvedena v tabulce č. 4. Jako pozitivní kontrola a také standard byla použita kyselina lipoová, pro negativní kontrolu byl použit 80% methanol, médium a 3 jamky bez buněk. 96 jamková deska, s buňkami ošetřenými testovacími látkami, byla uzavřena a inkubována 24h při teplotě 37°C.

Tabulka č. 3 Schéma 96 jamkové desky pro screening extraktů

	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12
A	**100 uM LipA**	1 mg/ml extrakt 1	1 mg/ml extrakt 2	1 mg/ml extrakt 3
B	**10 uM LipA**	100 µg/ml extrakt 1	100 µg /ml extrakt 2	100 µg /ml extrakt 3
C	**1 uM LipA**	10 µg /ml extrakt1	10 µg /ml extrakt 2	10 µg /ml extrakt 3
D	**0.1 uM LipA**	1 µg /ml extrakt 1	1 µg /ml extrakt 2	1 µg /ml extrakt 3
E	1 mg/ml extrakt	1 mg/ml extrakt	1 mg/ml extrakt	MeOH Medium Bez buněk
F	100 ug/ml extrakt	100 µg /ml extrakt	100 µg /ml extrakt	
G	10 ug/ml extrakt	10 µg /ml extrakt	10 µg /ml extrakt	
H	1 ug/ml extrakt	1 µg /ml extrakt	1 µg /ml extrakt	

Tabulka č.4 Schéma 96 jamkové desky pro testování jednotlivých frakcí extraktů

	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12
A	**100 uM LipA**	3 mg/ml frakce F1	3 mg/ml frakce F2	3 mg/ml frakce F3
B	**10 uM LipA**	300 µg /ml frakce F1	300 µg /ml frakceF2	300 µg /ml frakce F3
C	**1 uM LipA**	30 µg /ml frakce F1	30 µg /ml frakce F2	30 µg /ml frakce F3
D	**0.1 uM LipA**	3 µg /ml frakce F1	3 µg /ml frakce F2	3 µg /ml frakce F3
E	3 mg/ml frakce F4	3 mg /ml frakce F5	3 mg/ml frakce F6	MeOH Medium Bez buněk
F	300ug/ml frakce F4	300 µg /ml frakce F5	300 µg /ml frakce F6	
G	30 ug/ml frakce F4	30 µg /ml frakce F5	30 µg /ml frakce F6	
H	3 µg/ml frakce F4	3 µg /ml frakce F5	3 µg /ml frakce F6	

Po 24 hodinách byl roztok média a testovaných extraktů odsát a buňky byly omyty 100ul 1x PBS na jamku po dobu 2 minut na předem vyhřáté třepačce při teplotě 37°C. Následně byl roztok PBS odstát a bylo přidáno 50ul na jamku lyzačního pufru. Složení lyzačního pufru viz tabulka č.5

Tabulka č. 5. Složení lyzačního pufru pro přípravu 10ml roztoku

Složení lyzačního pufru	**10 ml** (1 deska)
10mM Tris	12,1 mg
2mM DTT	3,08 mg
2mM DCTA	7,3 mg

96 jamková deska byla vložena do lednice o teplotě 4°C po dobu 15 minut, poté byla přemístěna do chladicího boxu o teplotě -80°C po dobu 2h. Po vytažení destičky z chladicího boxu, byla 96 jamková deska rozmrazena na temperované třepačce (Heidolph, Incubator 1000) nastavenou na 37°C po dobu minimálně 10minut. Následně bylo pomocí optického mikroskopu ověřeno, zda byli buňky řádně zlyzovány. Zlyzované buňky byli přepipetovány do měřící 96 jamkové desky a bylo připipetováno 100ul na jamku Flash mixu. Složení flash mixu viz tabulka č.6.

Tabulka č. 6 složení Flash mixu pro přípravu 10ml roztoku

Složení Flash mixu	**10 ml FM** (1 deska)
20 mM tricin	35,8 mg
1,07 mM $(MgCO_3)_4$. $Mg(OH)_2$. $5H_2O$	5,2 mg
2,67 mM $MgSO_4$. $7H_2O$	13,48 mg
5mM ATP	27,6 mg
0,094 mM luciferin	10 µl ze zás. roztoku (9,4 mM v DMSO; v -80 °C)

Flash mix obsahuje liciferázu, která reaguje s genovým reportérem, který se transkribuje společně s antioxidačními látkami, v lyzovaných buňkách, kdy vedlejší reakcí je luminiscence. Intenzita luminiscence byla měřena pomocí na destičkovém analyzátoru TEKAN (Švýcarsko) v časových intervalech 0, 5, 10 a 12.

3.3.6. UHPLC-MS/MS

Jednotlivé frakce od vzorků, které vyhovovali dalšímu testování, byly převedeny do 20% metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí, tak aby výsledná koncentrace jednotlivé frakce byla 100mg/ml. 200µl vzorku bylo přefiltrováno přes celulózovou membránu 0,2µm mikrofiltru Micro spin Filter (Ciro

Manafoeturing Corp., USA). Mikrofiltry byly umístěny do centrifugy 5424 při 4136g, čím došlo k přefiltrování vzorku. Filtráty byly přeneseny do vialek pro UHPLC-MS/MS analýzu.

Jednotlivé frakce pro vybrané vzorky byly separovány na reverzní fázi na koloně Acquity UPLC BEH C18 1,7µm (Waters, USA), rozměry kolony jsou 150 x 2,1 mm. Systém UPLC je složen z pumpy, detektoru a Sample manageru (vše Waters, USA). Objem nastřikovaného vzorku je 5µl. Teplota kolony byla 30°C, teplota procházejícího vzorku kolonou byla 4°C. Jako mobilní fáze byly použity roztoky 5 mM kyseliny mravenčí v deionozované vodě a ≥99,9% acetonitri.

Detekce analytů probíhala na hmotnostní spektrometru Synapt G2-Si (Waters, USA). Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje ESI a analyzátory, které se skládá z kvadrupólu a TOF v tandemovém uspořádání. Měření vzorků probíhalo v negativní i pozitivním modu. Sběr dat probíhal v DDA režimu

3.3.7. Vyhodnocení dat

Surová data byla zpracována pomocí programu vyvinutého v LRR (UP, Olomouc). Pro necílovou analýzu bylo použito korelační analýzy. V první řadě byla vypočítána relativní aktivita luciferázy, které poté byla porovnávána s plochou features**.**

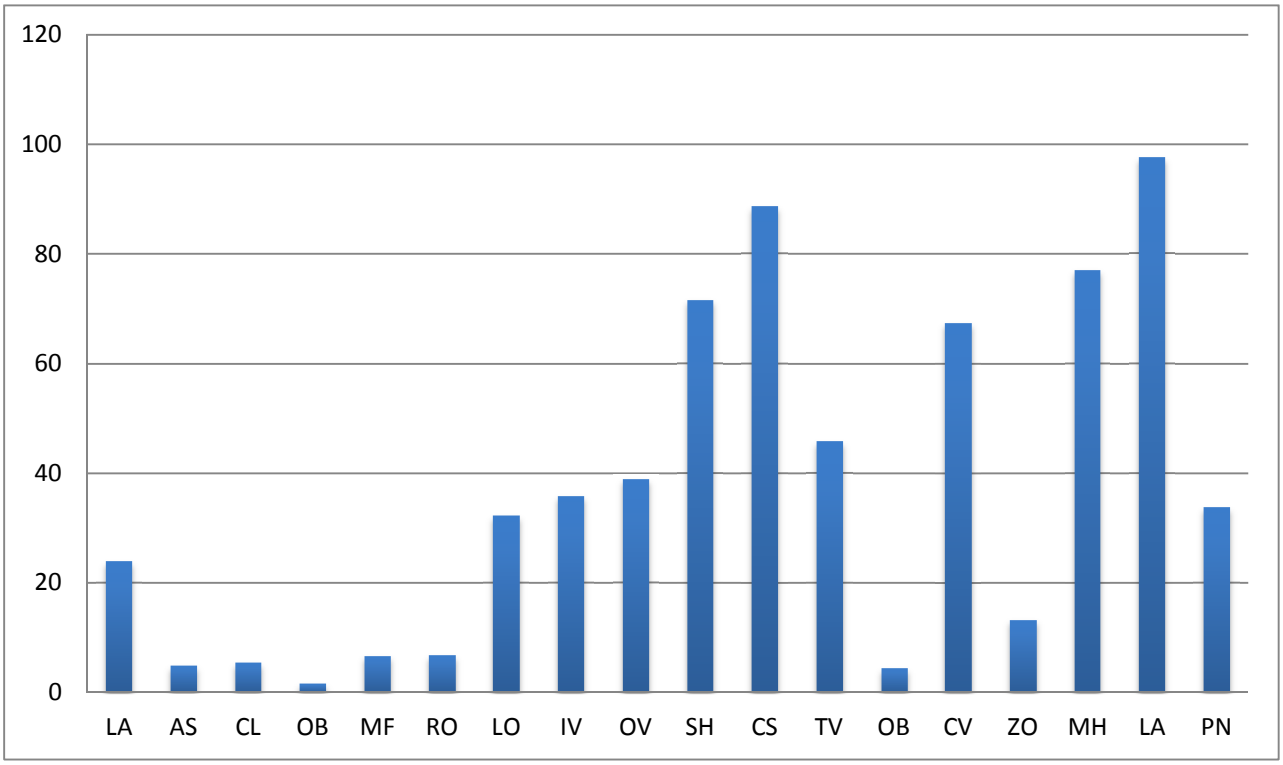
4. Výsledky

4.1. Screening extraktů

Prvním krokem v mé diplomové práci byl výběr rostlin či částí rostlin, které budou použity na experiment. Prvotní výběr zahrnoval rostliny, které dle literatury vykazují léčebné a detoxikační vlastnosti. Výběr rostlin byl proveden před počátkem mé diplomové práce. Experiment se v prvotní fázi prováděl na18-ti různých rostlinných materiálech.

V prvním kroku byly v dostupného rostlinného materiálu připraveny extrakty, které se poté testovaly na buněčné linie EpRE-LUX. Jako pozitivní kontrola, a také jako standard, byla použita kyselina lipoová. Extrakty nebyly před testováním frakciovány.

Poté co byly rostlinné extrakty změřeny na aktivitu luciferázy, byla porovnávána aktivita jednotlivých extraktů v závislosti na aktivitě kyseliny lipoové



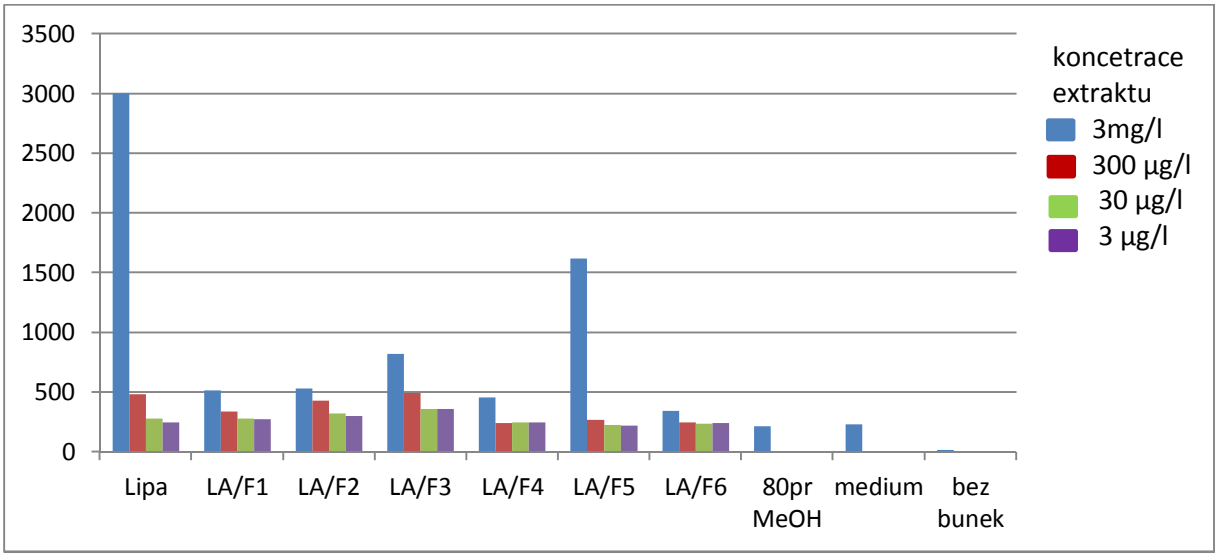
. Graf č.1 Grafické vyjádření aktivity luciferázy u extraktů testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

LA - *Lavandula angustifolid* (květ), AS - *Allicim sativum*, CL - *Curcuma longa*, OB - *Ocimum basilicum* (list), MF - *Myristica fragrans*, RO - R*osmarinum officinalis,* LO - *Levisticum officinale*, IV - *Illicium verum,* OV - *Origanum vulgare*, SH - *Satureja hortensis,* CS - *Crocus sativus,* TV - *Thymus vulgaris*, OB - *Ocimum basilicum* (stonek), CV - *Cinnamomum verum*, ZO - *Zingiben officinale*, MH - *Majorama hortensis*, LA - *Lavandula angustifolid* (květ), PN - *Piper nigrum*

Graf č. 1. znázorňuje výslednou relativní aktivitu luciferázy u jednotlivých extraktů. Test se prováděl na několika 96 jamkových deskách. Pro lepší orientaci a možnosti porovnávání jednotlivých desek mezi sebou byla výsledná aktivita luciferázy přepočítána tzv. ekvivalenty kyseliny lipoové, které jsme mohli hodnotit mezi sebou. Nejvyšší intenzita byla změřena u extraktů LA - list, PN, IV, CV, CS, MH, LO, TV, SH a OV, které byly následně frakciovány. U vzorků LA - květ, MF, RO, OB - stonek byla aktivita luciferázy zaznamenána v mnohem menším měřítku, proto byli vzorky vyřazeny z experimentu. Vzorky AS, CL a OB – list byly z experimentu také vyřazeny, protože byli pro buňky toxické.

4.2. Frakcionace pomocí SPE

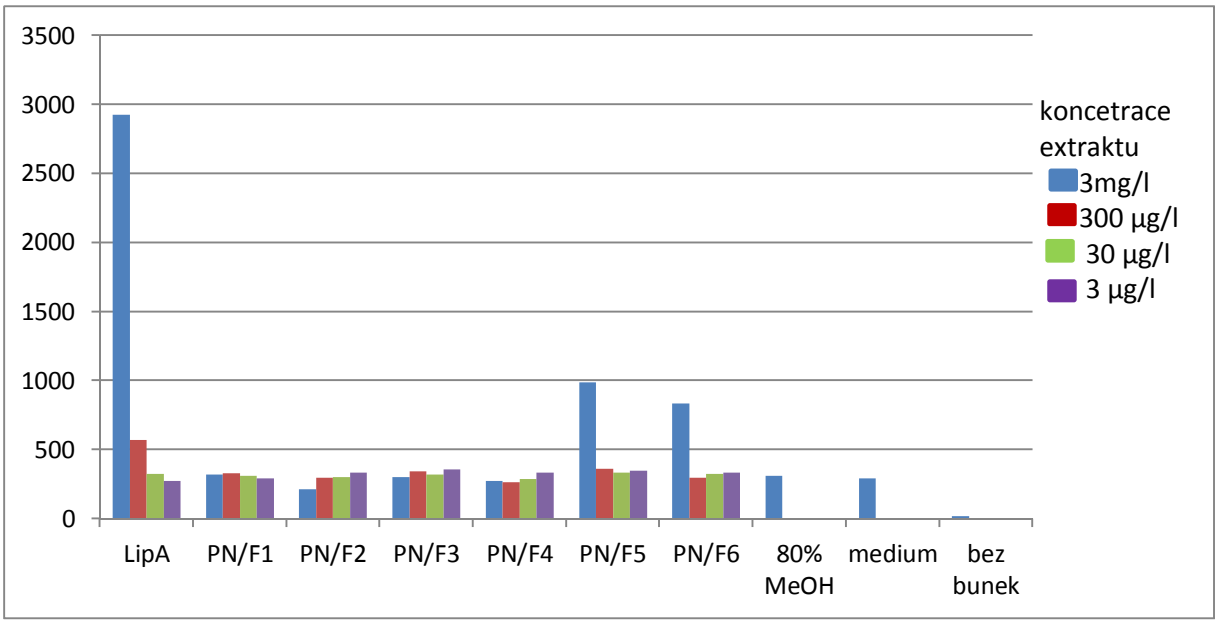
Poté co bylo z první fáze experimentu vybráno devět rostlinných extraktů, byla provedena nová extrakce stejného rostlinného materiálu. Nové extrakty byly poté frakciovány dle postupu popsaného v kapitole metody a testovány na buňkách stejným způsobem jako bylo provedeno v prvním kroku screeningu extraktů. Jako pozitivní kontrola a standard byla použita kyselina lipoová jako v předchozím kroku. Jako negativní kontrola byl použit 80 % metanol, protože v něm byly rozpuštěny extrakty, živočišné médium a jedna část 96 jamkové desky byla ponechána bez buněk. Pro experiment byly použity pouze frakce F1-F6, frakce F7 použita nebyla.



Graf č. 2 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu LA u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

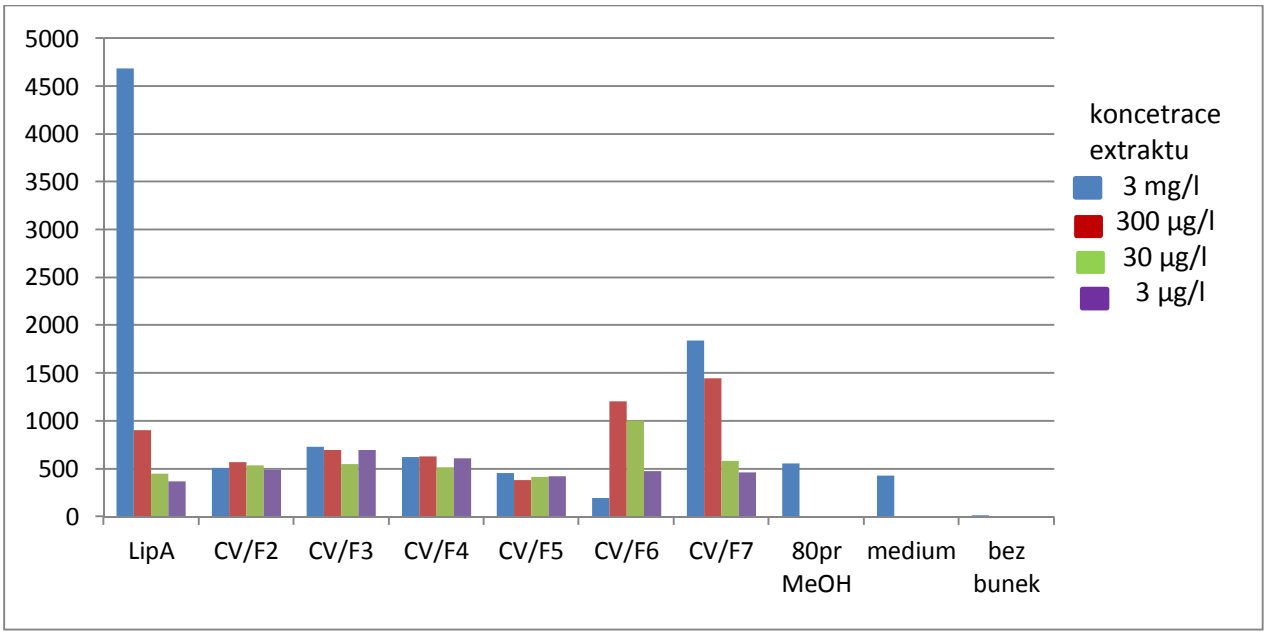
Tento graf znázorňuje aktivitu jednotlivých frakcí u extraktu LA.

Jednotlivé frakce jsou charakteristické různým podílem polárních látek. Jak je viditelné z grafu, vymývání aktivních látek nebylo postupné, ale nacházelo se pouze ve frakci F5. Pro experiment bylo důležité, aby byly aktivní látky vymývány postupně, což tento vzorek nesplňoval, proto byl z dalšího testování vyřazen.



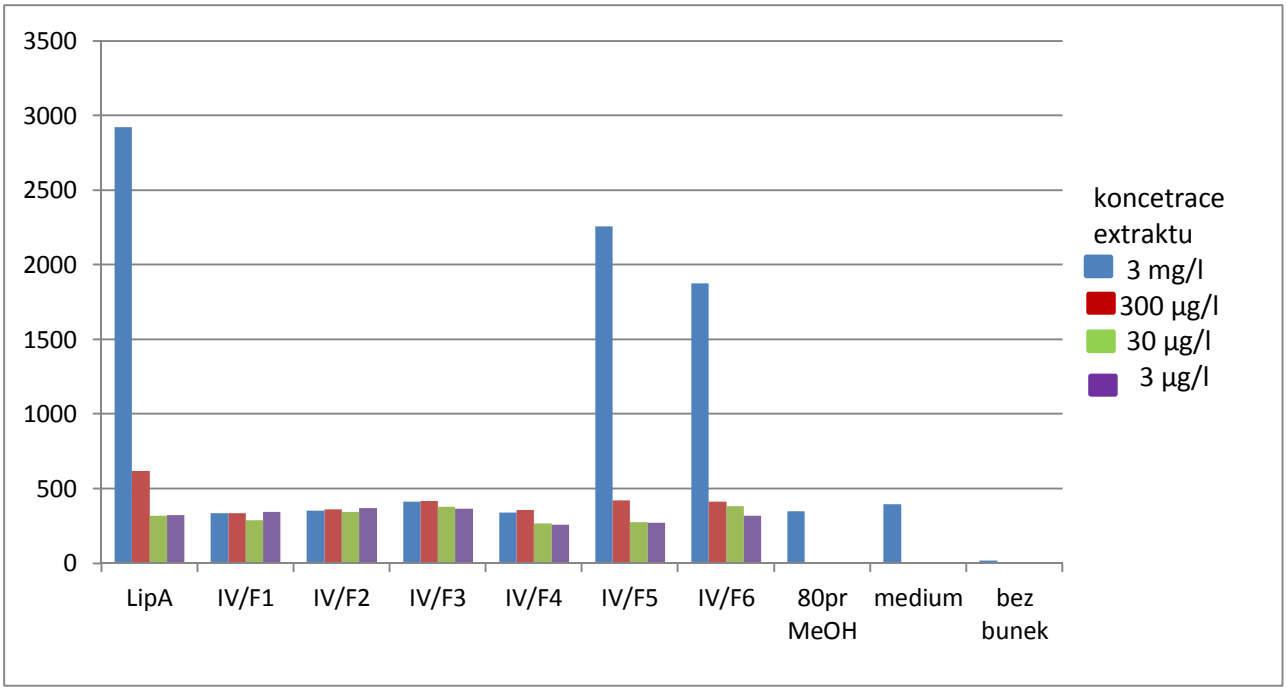
Graf č. 3 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu PN u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Tento graf vyjadřuje aktivitu luciferázy, která byla naměřena u extraktu PN. Jako pozitivní standard byla použita kyselina lipoová. Vzorek PN při screeningovém testování vykazoval vysokou aktivitu v závislosti na aktivitě standardu. Pokud odečteme od testovaných vzorků negativní kontroly a porovnáme aktivitu jednotlivých vzorků se standardem, zjistíme, že aktivita luciferázy, která odpovídá koncentraci aktivních látek ve frakci, byla postupně rozložena mezi jednotlivé frakce a žádná z frakcí nevykazuje vysokou koncentraci aktivních látek. Tento vzorek nebyl dále zkoumán.



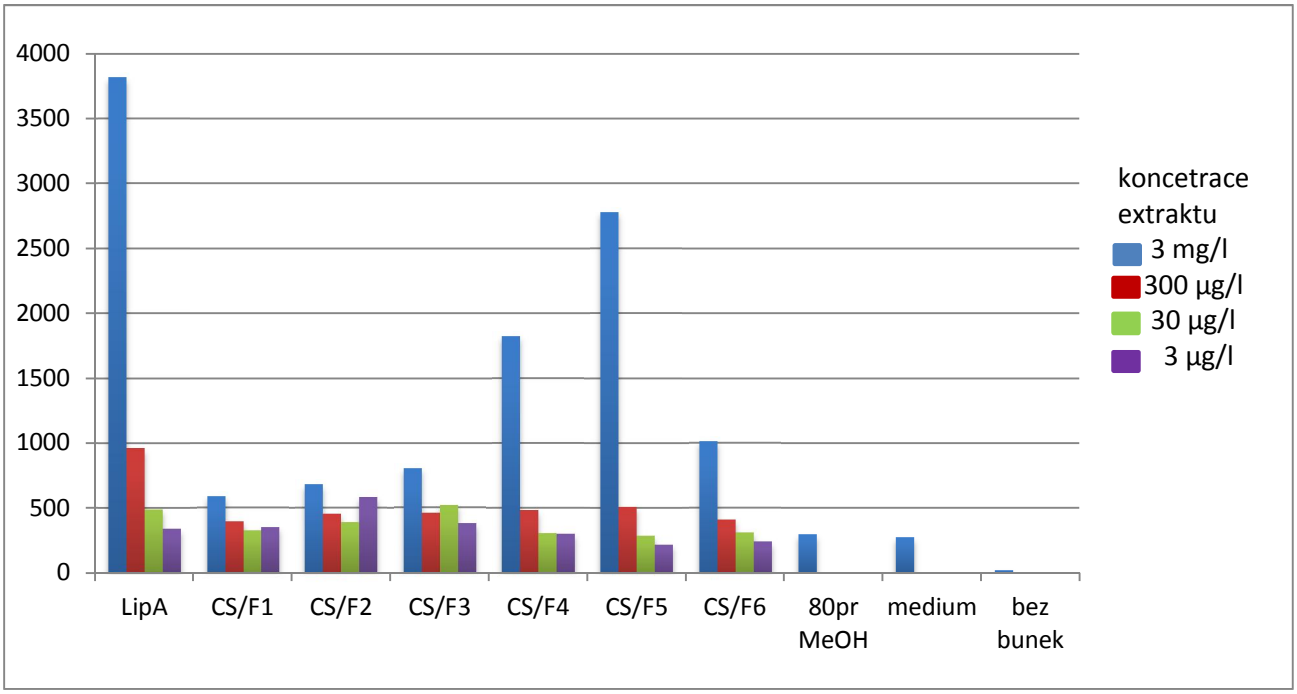
Graf č. 4 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu CV u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Tento graf znázorňuje luciferázovou aktivitu extraktu CV v závislosti na standardu. Z grafu je patrné, že jednotlivé aktivní látky, které podmiňují aktivitu luciferázy, která byla zjištěna při prvním kroku experimentu, se rozprostřeli po jednotlivých frakcích a jsou přítomny ve velmi malých koncentracích. Vzorek proto nebyl vhodný pro další zkoumání.



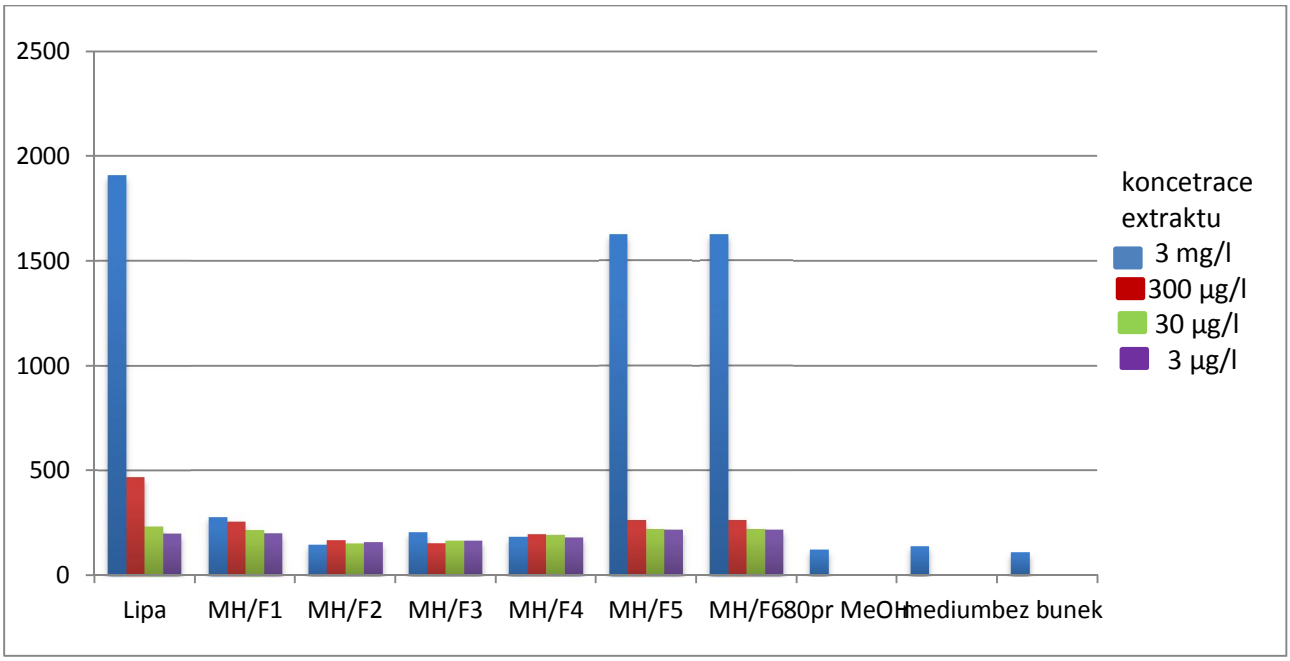
Graf č. 5 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu IV u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Tento graf znázorňuje změřenou aktivitu extraktu IV. Frakce F1, F2, F3, F4 nevykazovali žádnou aktivitu, což znamená, že v rostlině se nevyskytují polární látky, které by aktivovali dráhu Nrf2. Frakce F5 a F6 obsahují látky, které byli převážně nepolární. Protože se aktivní látky koncentrovali pouze ve dvou frakcích, nebyl vzorek IV vhodný pro další zkoumání.



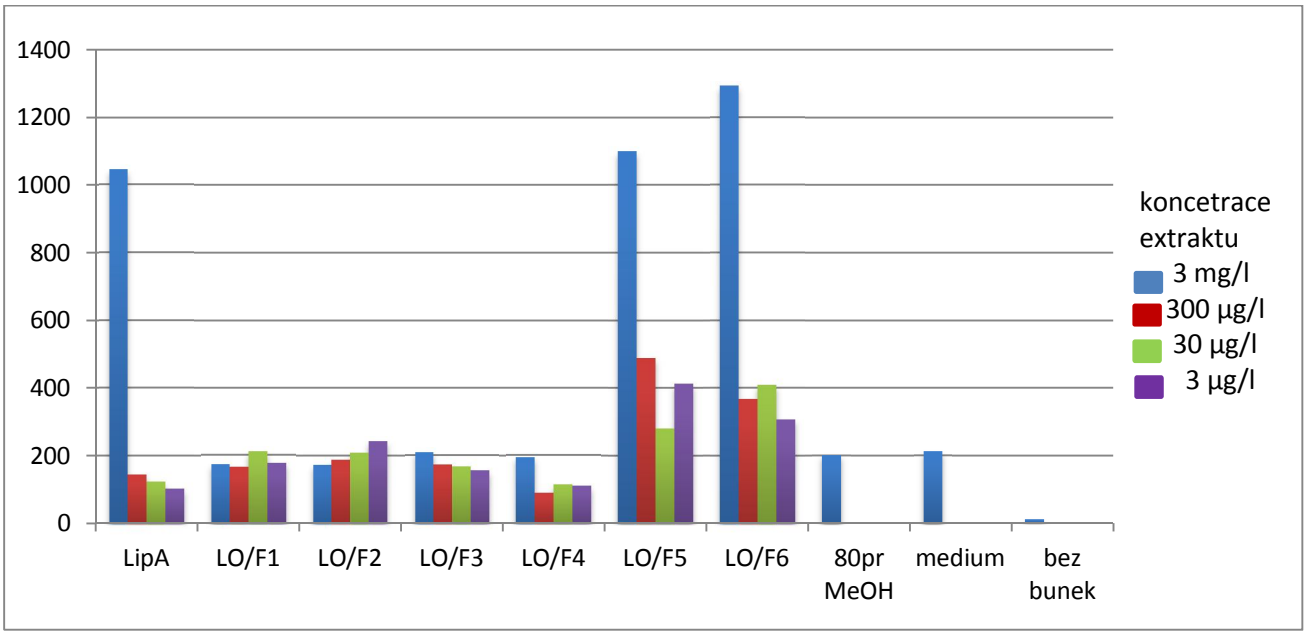
Graf č. 6 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu CS u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Graf č. 6. představuje aktivitu luciferázy u extraktu CS. Z grafu je viditelné, že aktivní látky, které podněcují konečnou aktivitu luciferázy, jsou zastoupeny ve všech frakcích. Jednotlivá koncentrace aktivních látek postupně stoupá tak jak stoupá zastoupení polárních látek ve frakcích na základě použitých roztoků metanolu. Nejvyšší aktivitu vykazují frakce F4 a F5, tedy předpokládáme, že v této frakci se vyskytují neutrální či mírně polární látky. Tento extrakt byl tedy v hodný pro další část experimentu.



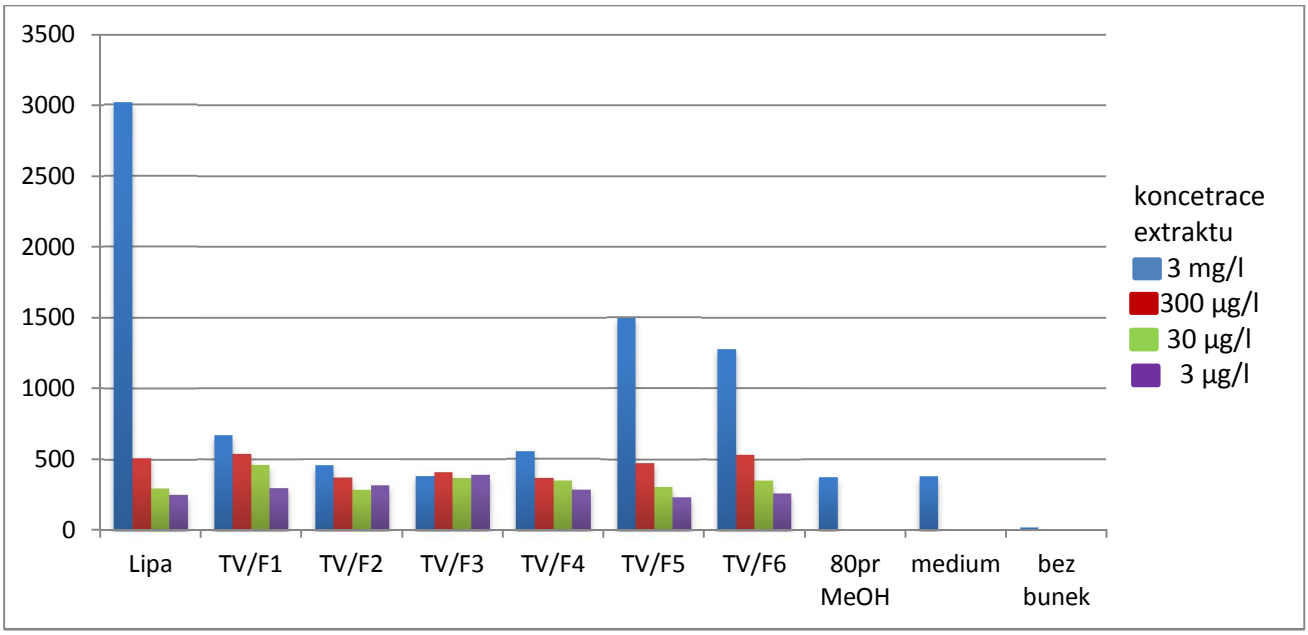
Graf č. 7 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu MH u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Graf č. 7. představuje aktivitu luciferázy změřenou u extraktu MH. Z grafu je patrné, že ve frakcích F1, F2, F3 a F4 se nevyskytovali žádné aktivní látky, které vy podmínili aktivitu luciferázy. Aktivní látky se sdružovali pouze ve frakcích F5 a F6, což znamená, že tyto frakce obsahovali nepolární látky. Z tohoto důvodu nebyl vzorek vhodný pro další měření.



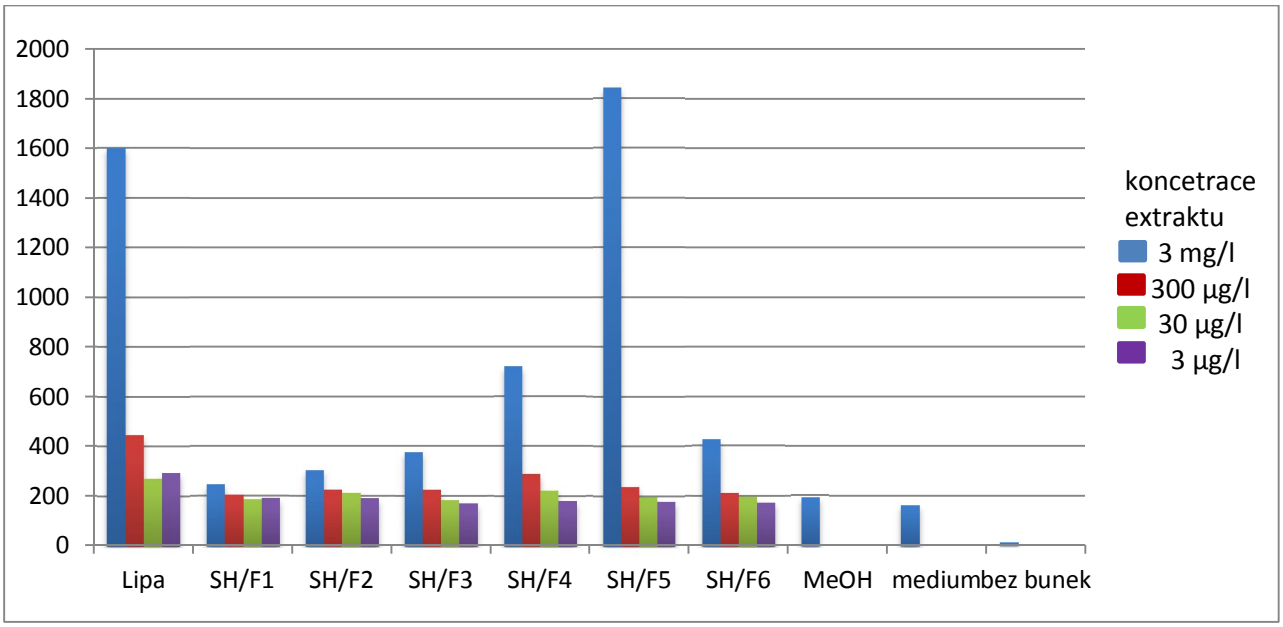
Graf č. 8 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu LO u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Graf č. 8. znázorňuje aktivitu luciferázy u extraktu LO v závislosti na aktivitě luciferázy u standardy. Frakce F1, F2, F3 a F4 nevykazují žádnou aktivitu, předpokládá se, že neobsahují aktivní látky. Frakce F5 a F6 vykazují dokonce vyšší aktivitu než standard, avšak jedná se frakce obsahující převážně velmi nepolární látky, což pro další část práce nebylo vhodné.



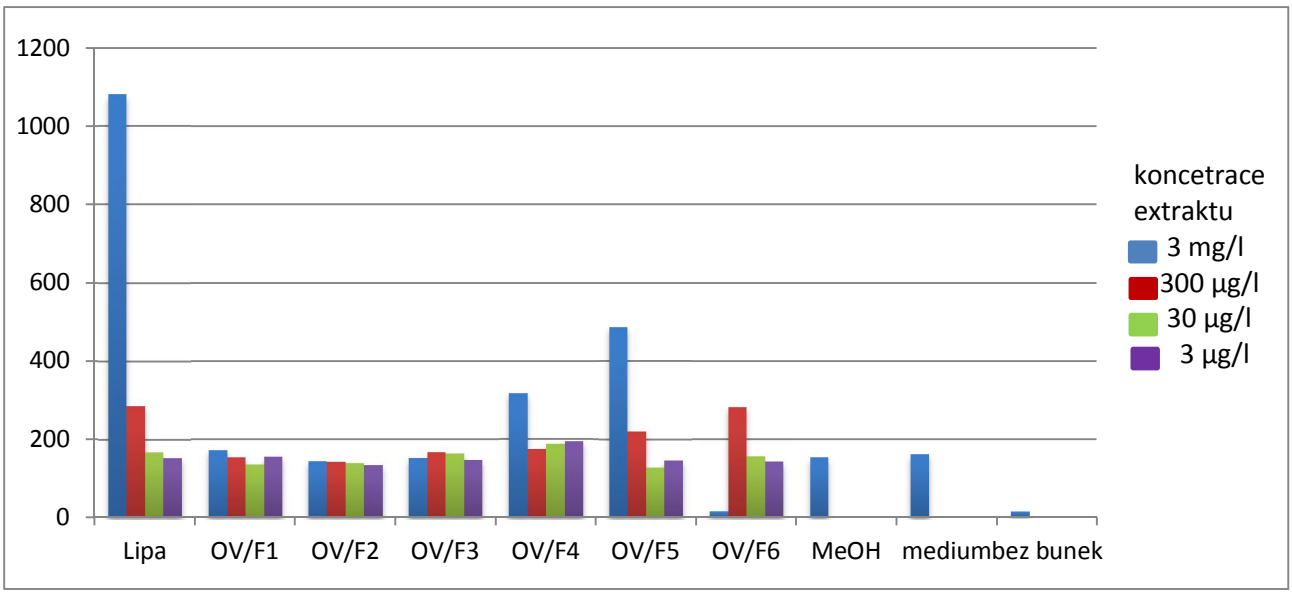
Graf č. 9 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu TV u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Z grafu č. 9., který znázorňuje aktivitu luciferázy je zřejmé, že původní aktivita vzorku, která byla změřena v prvním kroku experimentu, se rozdělila mezi několik frakcí, žádná z frakcí tedy nevykazuje vysoké hodnoty. Vzorek TV proto nebyl dále podroben analýze.



Graf č. 10 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu SH u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

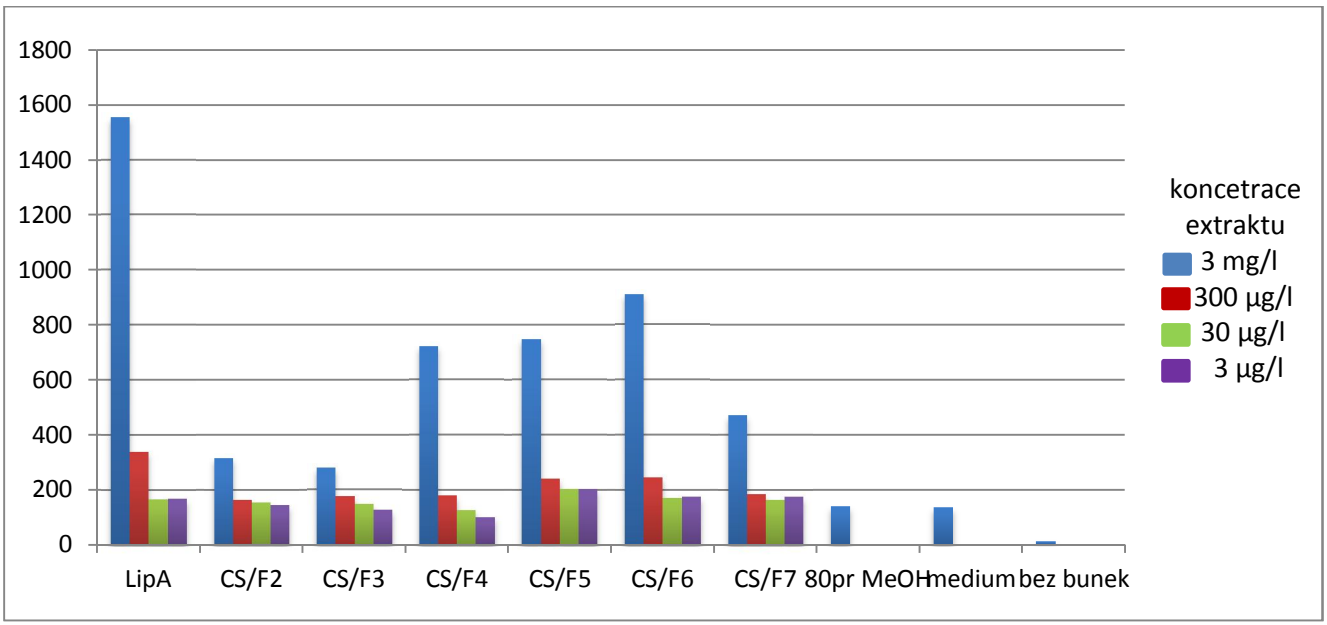
Graf č. 10. vyjadřuje aktivitu luciferázy extraktu SH v závislosti na aktivitě standardu. Aktivní látky, které podněcují výslednou hodnotu aktivitu luciferázy, byli dle předpokladu nejvíce koncentrovány ve frakci F5. Tato frakce dokonce vykazovala vyšší aktivitu luciferázy než je běžné u standardy. Druhou nejvyšší aktivitu prokazovala frakce F4. Ve výsledku to tedy znamená, že aktivní látky se nacházeli ve frakcích, kde se dle frakcionace nacházejí mírně polární látky, což bylo pro experiment pozitivní. Vzorek SH byl dále studován.



Graf č. 11 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu OV u frakcí F1, F2, F3,F4,F5 a F6 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

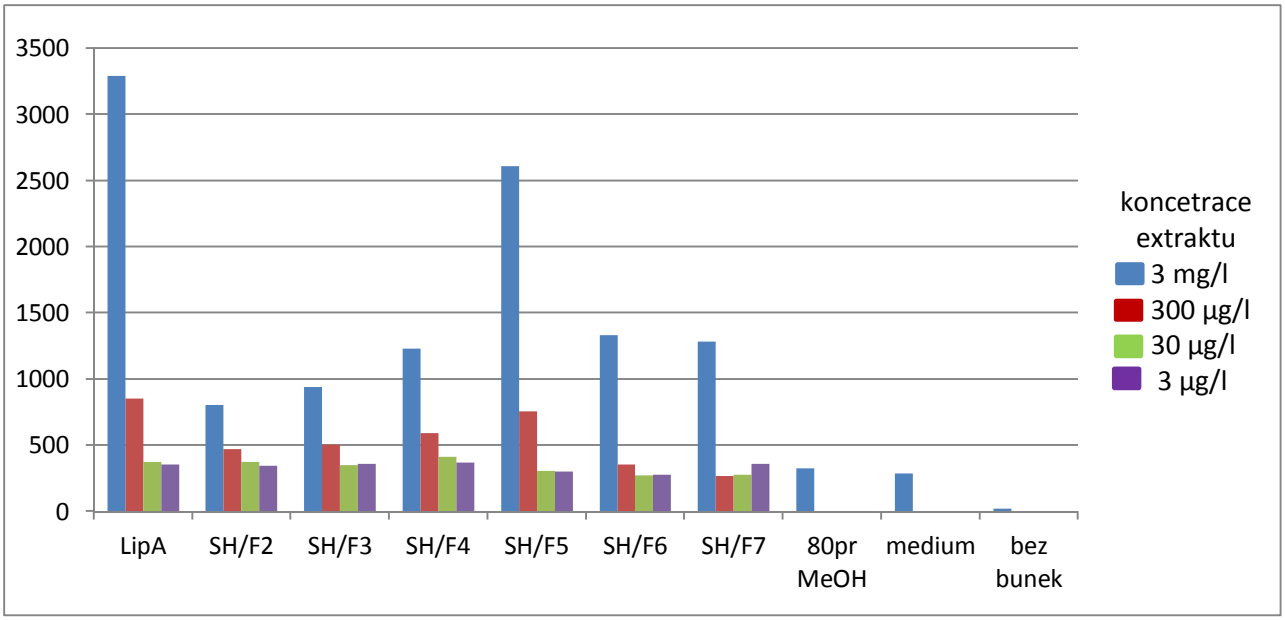
Graf č. 11. znázorňuje aktivitu luciferázy u extraktu OV v závislosti na aktivitě standardu. Z grafu je patrné, že původní vysoká aktivita byla rozdělena mezi jednotlivé frakce. Frakce F6 v nejvyšší koncentraci dokonce obsahoval určité látky, které byli toxické pro buňky. Vzorek OV byl testován na buňkách ještě jednou, kdy se potvrdilo, že frakce F6 je opravdu toxická pro buňky. Proto tento vzorek nebyl v hodný pro další testování.

Pro druhou frakcionaci byly vybrány pouze vzorky CS *(Crosus sativus)* a SH *(Satureja hortensis)*. Pro tuto část experimentu byly připraveny nové extrakty ze stejného rostlinného materiálu, které byli frakciovány pomocí druhé koncentrační řady, která je uvedena v kapitole metody. Testy na buňkách byly provedeny stejným způsobem jako v předchozích případech.



Graf č. 12 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu CS u frakcí F2, F3,F4,F5, F6 a F7 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Jak je patrné z grafu při druhé frakcionaci se aktivita luciferázy a tedy i aktivní látky obsažené v extraktu rozptýlily do čtyř frakcí F4, F5, F6 a F7. V těchto frakcích se s největší pravděpodobností objevují látky nepolární tak polární. Výsledky z druhého měření byly dále použity pro korelační analýzu a následnou necílenou identifikaci aktivních látek.



Graf č. 13 Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktu SH u frakcí F2, F3,F4,F5, F6 a F7 testovaných na buněčné linii EpRE-LUX.

Z grafu je zřejmé, že aktivita luciferázy a tedy aktivní látky se rozmístili mezi jednotlivé frakci, přičemž nejzajímavější byli frakce F4, F5 a F6, kde se vyskytují látky nepolární a mírně polární. Výsledky z druhého měření byly dále použity pro korelační analýzu a následnou necílenou identifikaci aktivních látek.

4.3. LC-MS analýza vybraných extraktů

Pro LC-MS analýzu byli vybrány dva vzorky, *Crocus setivus* a *Satureja hortensis*. Vzorky pro LC-MS byli připraveny z poslední extrakce, která byla použita i při druhé frakcionaci a tedy i při druhém měření frakcí na buněčné linii EpRE-LUX.

4.3.1. Korelační analýza

Korelační analýza se zabývá vzájemný vtahem dvou různých veličin, v tomto případě se jednalo o relativní aktivity luciferázy, která byla naměřena v první části experimentu a jednotlivými featurs, které byli získány z analýzy LC-MS.

V prvním kroku korelační analýzy byla vypočítána výsledná aktivita luciferázy u jednotlivých extraktů a jejich frakcí. Kdy napřed bylo od jednotlivých frakcí odečteno pozadí desky (negativní kontroly) a následně byla vypočítána aktivita jednotlivých frakcí vztažená ke kyselině lipoové. Tyto výpočty byly provedeny pro extrakty SH a CS. Výsledky se vztahují ke grafům číslo 12 a 13.

Tabulka č. 7 Výsledná aktivita frakcí extraktu SH vztažená ke kyselině lipoové

Název extraktu/frakce	SH/F2	SH/F3	SH/F4	SH/F5	SH/F6	SH/F7
Aktivita frakce vztažená ke kyselině lipoové	0,277	0,341	0,509	4,299	0,340	0,323

Tabulka č.8 Výsledná aktivita frakcí extraktu CS vztažená ke kyselině lipoové

Název extraktu/frakce	CS/F2	CS/F3	CS/F4	CS/F5	CS/F6	CS/F7
Aktivita frakce vztažená ke kyselině lipoové	0,120	0,155	0,409	0,493	0,542	0,230

V další části jsem se zabývala upravováním dat z měření LC-MS. V první kroku jsem sjednotila data z negativního a pozitivního módu do jednoho souboru. Dále jsem seřadila data z hmotnostního spektrometru dle retenčního času od nejvyšší po nejnižší. Poté jsem provedla korelaci podle Spaermana tak, že jsem provedla korelaci na sobě dvou nezávislých parametrů a to konkrétně mezi relativní aktivitou frakcí extraktu a features získaných z měření hmotnostním spektrometrem. Následně jsem data seřadila dle korelace od nejvyšší po nejnižší. Po zpracování dat jsem dostala seznam hodnot, které sem, ze kterých jsem vybrala prvních 50 hmot, které se dle korelace zdály nejvýznamnější.

4.3.2. Předběžná identifikace kandidátů

Podle seznamu jsem vyhledala pomocí retenčního času jednotlivé hmoty na chromatogramu a pomocí programu MassLynx, ver. 4.0 (Micromass, Manchester, UK) jsem se snažila k jednotlivým hmotám přiřadit nejpravděpodobnější elementární složení molekuly, která se odpovídá změřené hmotě.

Tabulka č. 9. znázorňuje pravděpodobné elementární složení vybraných hmot změřených negativním modem vzorku SH. Kromě elementárního složení představuje také hodnoty hmot, u kterých nebylo možné zjistit jejich elementární složení, protože se jednalo o fragmenty či izotopy již prověřených hmot. To že se jedná o izotopy či fragmenty bylo ověřeno pomocí retenčního času, který byl stejný či velmi podobný.

Tabulka č 9. Přiřazení elementárního složení k hmotám měřeným na LC-MS v negativním modu a jejich izotopy a fragmenty u vzorku SH

m/z	vzorec	RT (min)	fragmenty
598,302	C34 H36 N3 07	13,11	
582,309	C34 H36 N3 06	14,15	
523,22	C25 H31 O12	14,64	
795,362	C34 H47 N6 016	14,38	
595,281	C24 H44 N4 07	11,91	
343,241	C18 H31 O6	12,39	
717,191	C36 H29 016	12,41	353, 149, 817
645,251	C25 H39 N6 O8 P2 S	13,15	551,296
593,261	C26 H33 O14	13,29	
563,261	C28 H36 012	12,79	
271,081	C15 H11 05	14,95	
593,274	C32 H38 N2 05 P S	12,05	
174,975	C3 N2 O5 P	1,11	
219,121	C13 H15 O3	18,42	
489,211	C25 H19 O10	12,15	

Tabulka č. 10 znázorňuje pravděpodobné elementární složení vybraných hmot změřených pozitivním modem u vzorku SH. U pozitivního modu je vcelku běžné, že se zde vyskytují sodíkové, draselné či amonné adukty, které se objevují po korelaci velmi vysoko v seznamu. Adukty se vyznačují tím, že mají stejné elementární složení jako původní molekula, ale s přídavkem daného iontu. Z chromatogramu jsem je odvodila jeho bližší koumáním. Jak je vidět v tabulce k jednotlivým hmotám u kterých bylo zjištěno elementární složení je i připsáno, jestli se u dané molekuly objevuje jeden či více aduktů. Tím se původní seznam 50 potencionálních molekul zkrátil.

Tabulka č.10 Přiřazení elementárního složení k hmotám měřeným na LC-MS v pozitivním modu a jejich adukty a fragmenty u vzorku SH

m/z	vzorec	RT (min)	fragmenty	adukty
584,33	C34 H38 N3 O6	13,85		[M+Na] 607,31
273,11	C15 H13 05	14,75		
561,19	C22 H29 N2 O13 S	14,02	545,22	
			540,26	
579,31	C29 H39 012	11,62		
421,21	C19 H27 09	14,79		[M+Na] 444,19
				[M+K] 460,31
				[M+NH_3] 438,24
333,25	C20 H19 O4	13,41		
335,15	C20 H29 04	13,75		
587,27	C28 H37 O12	12,29	177,09	[M+K] 626,33
459,21	C12 H29 O9	13,88		[M+Na] 482,19
				[M+K] 514,28
475,19	C12H29 O9	13,89	257,15	
181,15	C11 H17 O2	16,53		
183,15	C13 H22 N S	16,78		
182,22	C12 H24 O2	9,18		
172,21	C10 H22 N O	18,15		

Tabulka č.11 znázorňuje pravděpodobné elementární složení vybraných hmot změřených negativním modem u vzorku CS. Do seznamu nejzajímavějších hmot dle korelace se dostaly pouze čtyři hmoty, u kterých bylo jištěno elementární složení. Zde jsem neidentifikovala žádné fragmenty či izotopy avšak se zde objevili izomery, které mají stejné elementární složení, ale jinou strukturu molekuly proto byli v hmotnostním spektrometru naměřeny dvakrát.

Tabulka č.11 Přiřazení elementárního složení k hmotám měřeným na LC-MS v negativním modu a jejich izotopy a fragmenty u vzorku CS

m/z	vzorec	RT
361,21	C17 H29 O8	14,31
859,38	C56 H49 N2 O3 P2	13,32
697,32	C30 H37 N10 O10	14,97
651,31	C32 H43 014	14,59

Tabulka č.12 znázorňuje pravděpodobné elementární složení vybraných hmot změřených pozitivním modem u vzorku CS. Jak již bylo zmíněno, u pozitivního módu je běžný výskyt sodíkových, draselných a amonných aduktů. U vzorku CS byl jejich výskyt početnější než u vzorku SH. Dále se zde objevili i izomery.

Tabulka č.12 Přiřazení elementárního složení k hmotám měřeným na LC-MS v pozitivním modu a jejich izotopy, adukty a izomery u vzorku CS

m/z	vzorec	RT (min)	adukty
635,33	C10 H38 N20 O4 P S2	15,73	[M+K] 658,31
473,27	C15 H31 N12 O2 P2	15,00	
327,24	C14 H31 O8	5,89	[M+Na] 350,22
			[M+NH3] 344,27
261,17	C8 H17 N6 04	4,48	
635,33	C32 H43 O13	17,45	
283,21	C12 H27	5,19	[M+Na] 306,19
			[M+K] 322,31
525,34	C22 H47 O12	7,68	[M+Na] 548,32
			[M+K] 564,43
			[M+NH3] 542,37
481,31	C20 H23O11	7,68	[M+Na] 509,29
			[M+K] 520,41
			[M+NH3] 498,35
372,28	C16 H35 O9	6,46	[M+Na] 395,26
			[M+K] 411,37
			[M+NH3] 389,31
608,44	C26 H55 O14	8,83	[M+Na] 631,42
			[M+K] 647,53
			[M+NH3] 625,47
547,39	C24 H51 O13	8,44	[M+Na] 570,37
			[M+K] 586,48
			[M+NH3] 564,42

Posledním krokem mé diplomové práce byla předběžná identifikace kandidátů, u kterých jsem zjistila elementární složení. Identifikaci jsem prováděla pomocí internetových databází a dostupné literatury.

Tabulka č. 13 vyjadřuje výsledné hodnoty, které byly zjištěny u vzorku SH. V tabulce jsou zaznamenány jak pozitivní tak negativní mod, přičemž z původních 50 kandidátů jsem po odstranění aduktů, izotopů, izomerů, fragmentů a po porovnání pozitivního a negativního modu, kdy se v

sezamu nacházely látky se stejným elementárním složením získala 11 potencionálních elementárních struktur, které jsem mohla podrobit identifikaci. V prvním sloupci je vyjádřena měřená hmota, ve druhém sloupci je zaznamenáno jaké adukty byli nalezeny, ve třetím sloupci je zaznamenám retenční čas získaný z dat měřením metodou LC-MS, čtvrtý sloupec znázorňuje elementární složení a poslední sloupec ukazuje předběžnou identifikaci zjištěných elementárních složení dle dostupné literatury a databází.

Tabulka č.13. Předběžná identifikace kandidátů na základě jejich elementárního složení, hmoty a retenčního času

Měřený MW		**Retenční čas**	**Elementární složení**	**Předběžná identifikace**
599,255	[M-H]	13,18	C34 H37 N3 O7	Neidentifikován
523,184	[M+Na] [M+K]	14,79	C25 H30 O12	Ligustroside
583,260	[M-H]	14,11	C34 H37 N3 O6	Neidentifikován
524,180	[M-H]	14,79	C25 H32 O12	Neidentifikován
399,167	[M+Na] [M+K]	15,07	C19 H26 O9	Neidentifikován
332,206	[M+H]	13,54	C20 H28 O4	Karnosová kyselina
564,229	[M-H]	12,5	C28 H35 O12	Neidentifikován
338,108	[M+H]	12,55	C16 H18 O8	Neidentifikován
272,060	[M-H]	14,95	C15 H12 O5	Naringenin
181,190	[M+H]	9,21	C12 H23 N	Neidentifikován
436,181	[M+Na] [M+K]	13,9	C22 H27 O9	Neidentifikován

Tabulka č. 14 vyjadřuje výsledné hodnoty, které byly zjištěny u vzorku CS. V tabulce jsou zaznamenány jak pozitivní tak negativní mod, přičemž z původních 50 kandidátů jsem po odstranění aduktů, izotopů, izomerů, fragmentů a po porovnání pozitivního a negativního modu, kdy se v sezamu nacházely látky se stejným elementárním složením získala 9 potencionálních elementárních struktur, které jsem mohla podrobit identifikaci. V prvním sloupci je vyjádřena měřená hmota, ve druhém sloupci je zaznamenáno jaké ionty byli nalezeny, ve třetím sloupci je zaznamenám retenční čas získaný z dat měřením metodou LC-MS, čtvrtý sloupec znázorňuje elementární složení a poslední sloupec ukazuje předběžnou identifikaci zjištěných elementárních složení dle dostupné literaturu a databází.

Tabulka č.14 Předběžná identifikace kandidátů na základě jejich elementárního složení, hmoty a retenčního času

Měřený MW		**Retenční čas**	**Elementární složení**	**Předběžná identifikace**
652,273	[M-H2O] [M+H]	15,67	C32 H44 O14	crocin
472,270	[M-hex-H2O +H]	14,88	C26 H32 O8	Neidentifikován
360,200	[M+H]	15,05	C18 H16 O8	Rozmarýnová kyselina
770,198	[M+H]	4,73	C33 H38 O21	Myricetin 3 rutinoside-7-rhamnoside
490,285	[M+H]	12,78	C34 H42 O10	Neidentifikován
622,162	[M+H]	8,91	C28 H30 O16	Neidentifikován
291,108	[M+H]	1,35	C11 H17 N O8	Neidentifikován
259,115	[M+H]	1,35	C11 H17 N O6	Neidentifikován
330,250	[M+Na] [M+K]	16,00	C18 H34 O5	Neidentifikován

5. Diskuze

Cílem mé diplomové práce byla identifikace látek aktivujících Nrf2 dráhy z rostlinných extraktů. Prvním úkolem byl výběr vhodných rostlinných vzorků. Již bylo několikrát prokázáno, že rostliny produkují antioxidační látky, protože stejně jako všechny živé organismy jsou vystavené oxidativnímu stresu volných radikálů. Přítomnost přímých antioxidantů, které vychytávají volné radikály lze měřit např. pomocí metody ORAC, která je založena na měření vychytávání peroxylového radikálu (Brewer, 2011). Část mé diplomové práce byla zaměřena na prokázání vlivu tzv. nepřímých antioxidantů, obsažených v rostlinách, na aktivaci antioxidační Nrf2 dráhy.

Prvním krokem byl screening 18 rostlin, u kterých byla zjištěna vysoká antioxidační kapacita. Rostlinný materiál byl převeden do formy extraktů, které byly poté testovány na živočišných buňkách, konkrétně na linii EpRE-LUX, která obsahuje plasmidový reportér, který se transkribuje společně s antioxidačními enzymy po aktivaci genového úseku ARE/EpRE, který je aktivovaný právě molekulou Nrf2. První testy prokázaly, že některé rostliny obsahují velké množství látek, které aktivují dráhu Nrf2. Avšak bylo prokázáno, že některé rostliny bohužel neobsahují mnoho látek aktivující Nrf2 dráhu U rostlinných extraktů *Levandula angustifolid* (květ), *Myristica fragrans, Rosmarinum officinalis* a *Ocimum basilicum* (stonek) byly změřeny velmi nízké aktivity luciferázy, což vysvětlujeme velmi nízkou hladinou látek, které aktivují Nrf2. Tyto vzorky musely být z experimentu vyloučeny, protože následná frakcionace by způsobila rozdělení již tak slabého signálu. Vzorky *Ocimum basilicum* (list), *Allicim sativum* a *Curcuma longa* byly z experimentu také vyřazeny, důvodem byla nulová aktivita luciferázy, která byla způsobena buněčnou smrti, uvolněním adherentních buněk do media a jejich následným vymytím. Buněčná smrt si vysvětluji přítomností toxických látek, které byly vyextrahovaná společně s aktivními látkami. Kontaminaci okolím jsem vyloučila, protože experiment byl opakován s novými buňkami i extrakty, se stejným výsledkem, tedy úhynem buněk. Zbylé extrakty vykazovaly dostatečně vysokou aktivitu luciferázy, proto byly extrakty podrobeny frakcionaci. Každý vzorek byl rozdělen do 6 různých frakcí, kdy bylo předpokládáno, že látky se budou vymývat postupně podle své polarity od polárních přes málo polární až po nepolární. Za předpokladu, že nejvyšší koncentrace aktivních látek by se měla nacházet ve frakcích 4 a 5.

Po změření aktivity luciferázy u frakciovaných vzorků byli výsledky různorodé. Vzorky *Lavandula angustifolid* (list)*, Piper nigrum, Cinnamomum verum, Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare* nevykazovaly aktivitu v jednotlivých frakcích, jakou jsme předpokládali.

Teoreticky je zde pravděpodobnost, že se původní aktivita vzorku rozdělila do jednotlivých frakcí a tím došlo ke ztrátě signálu. Vzorky byly pro další část experimentu vyloučeny, protože koncentrace aktivních látek velmi nízká a konečná identifikace aktivních látek by byla obtížná. U extraktů *Illicium verum, Majorana hortensis* a *Levisticum officinale* byla změřena vysoká aktivita luciferázy u frakcí 5 a 6, což znamená velkou koncentraci nepolárních látek. Vymývání látek také nebylo postupné. Vzorky se nehodily pro další experiment. Vzorky *Crocus sativus* a *Satureja hortensis* byly jediné, které odpovídaly našim hypotézám o potupném vymývání aktivních látek. Po změření aktivní luciferázy jsem zjistili že koncentrace látek se postupně zvyšovala až k frakci 5 a pro frakci 6 se opět snížila. Tedy aktivní látky jsou polární až mírně nepolární. Tyto vzorky byli znovu frakciovány jemnější frakcionací, kdy mezi jednotlivými frakcemi byli menší odstupy v koncentraci metanolu. Po změření aktivity luciferázy se aktivita rozdělila mezi frakce 4,5,6, jak bylo předpokládáno. Tyto frakce poté byly měřeny na LC/MS. Po získání výsledků z hmotnostního spektrometru byla provedena korelační analýza a následně vyhledány nejzajímavější hmoty v hmotnostním chromatogramu a bylo k nim přiřazeno pravděpodobné elementární složení molekuly.

Poslední část mé diplomové práce se skládala z předběžné identifikace látek aktivující Nrf2 dráhu. Fytochemické složení *Crocus sativus* bylo již několikrát studováno (Bagur a kol, 2018). Z nastudované literatury jsem předpokládala, že předběžně identifikuji krocin, picrokrocin a safranal. Avšak dle seznamu kandidátů seřazených podle korelačního koeficientu jsem byla schopna předběžně identifikovat pouze krocin a kyselinu rozmarýnovou. Je pravděpodobné, že krocin by mohl být aktivátorem Nrf2 dráhy, ale své tvrzení nemohu podložit. U *Satureja hortensis* či jiného druhu saturejek bylo již několikrát studováno jejich fytochemické složení (Tepe B. a Cilhiz M., 2015). Ve své diplomové práci jsem předběžně identifikovala ligustrosid, který jsem našla v databázi a určila podle elementárního složení a fragmentačního spektra. Dále jsem podle literaturu určila kyselinu karmosovou, která byla již identifikována v *S. cuneifolia*, ale ne v *Satureja hortensis.* Je pravděpodobné, že tyto látky mohou aktivovat Nrf2 dráhy. Poslední látkou, kterou jsem identifikovala, byl naringenin, který již byl identifikován v *Satureja hortensis* i u jiných typů saturejek. Naringenin již byl identifikován jako aktivátor Nrf2. Bylo zjištěno, že při vyšších koncentracích naringninu se v buňce objevuje vyšší hladina nevázaného proteinu Nrf2, který poté putuje do jádra (Chen, 2015). Také byly provedeny testy na zvířatech, které potvrdily, že podáváním vyšších koncentrací naringeninu se zvyšují hodnoty antioxidačních enzymů v krvi

(Alam a kol, 2014). Toto zjištění naznačuje, že právě naringenin by mohl být aktivním mechanismem aktivace Nrf2 dráhy z extraktu *Satureja hortensis*

Zbylé látky, u kterých jsem zjistila elementární vzorec, jsem neidentifikovala z důvodu, že tyto látky prozatím nebyly objeveny či nebyly publikovány nebo nebyly vloženy do žádné databáze.

Z výsledků měření extraktů na živočišných buňkách linie Epre-LUX a tedy měřením aktivity luciferázy jsem došla k závěrům, že rostliny, které mají antioxidační kapacitu, mohou aktivovat dráhu Nrf2. Avšak musíme také přihlédnout k tomu, že některé rostliny obsahují i toxické látky, které jsou pro buňky nevhodné. Výsledné dvě rostliny, *Satureja hortensis* a *Crocus sativus,* pravděpodobně obsahují látky, které mohou aktivovat Nrf2 dráhu, avšak dle seznamu pravděpodobných kandidátů nemohu určit s jistotou, zda některý z kandidátů je aktivní látkou. Dalším postupem by mohla být ještě jemnější frakcionace extraktu a tím izolovat menší množství látek v jednotlivých frakcích a následně změřit aktivitu luciferázy u všech frakcích a poté výsledné frakce změřit na hmotnostním spektrometru. Tím by se dosáhlo menšího množství dat a tím i větší pravděpodobnost identifikace látek aktivujících Nrf2 dráhu.

6. Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo pokusit se blíže chemicky specifikovat rostlinné metabolity aktivující Nrf2. První část mé práce se zabývala stanovením luciferázové aktivity po působení vybraných rostlinných extraktů na živočišné buňky (linie EpRE-LUX), kdy kontrolní látkou byla kyselina lipoová, u které je prokázána aktivace Nrf2 dráhy. Z původních osmnácti testovaných rostlin bylo vybráno deset, které alespoň částečně aktivovaly Nrf2, a nebyly po buňky toxické. Z těchto deseti extraktů byly na základě dostupných informaci vybrány dvě nejzajímavější, *Satureja hortensis* a *Crocus sativus*, u kterých nedošlo ke ztrátě aktivity po frakcionaci.

Druhá část mé diplomové práce se zabývala korelací výsledků z hmotnostního spektrometru a ze změřené aktivity luciferázy. Prvních 50 nejzajímavějších features bylo vyhledáno dle jejich retenčních časů v hmotnostním chromatogramu a byla k nim pomocí programu přiřazena elementární struktura. Po odstranění izotopů, fragmentů a aduktů bylo určeno pouze několik metabolitu, které jsem se pokusila předběžně identifikovat. Identifikace probíhala pomocí odborné literatury, článků a dostupných databází. Porovnáním elementárních vzorců detekovaných metabolitů s dostupnými databázemi bylo zjištěno, že většina metabolitu ve studovaných extraktech dosud nebyla identifikována.

Seznam použité literatury

Alam, M., Subhan, N., Rahman, M., Uddin, S., Reza, H., & Sarker, S., (2014) Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. Advances in Nutrition, 5, 404–417.

Asdaq, S., & Inamdar MN. (2010) Potential of Crocus sativus (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. Appl Biochem Biotechnol. 162, 358–372.

Attoub, S., Hassan, A., Vanhoecke, B., Iratni, R,, Takahashi, T., Gaben, A.M., Bracke, M., Awad, S., John, A., Kamalboor, H.A., Al Sultan, M.A., Arafat, K., Gespach, C., & Petroianu, G., (2011). Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. European journal of pharmacology, 651, 18-25.

Bonett, D., & Wright, T., (2000). Sample size requirements for estimating pearson, kendall and spearman correlations. Psychometrika, 65, 23–28

Brewer, M., (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Food and Chamical Toxicology, 77, 1541-4337.

Brown, M., Wedge, D., Goodacre, R., Kell,D., Baker, P., Kenny,L., Mamas, M., Neyses, L., & Dunn, W., (2011) Automated workflows for accurate mass-based putative metabolite identification in LC/MS-derived metabolomic datasets. Bioinformatics, 27, 1108–1112.

Carocho, M., & Ferreira, I., (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chamical Toxicology, 51, 15-25.

Fenn, J., (2002) Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. Journal of biomolekul technoloques, 13, 101-18.

Gijsbers, L., Eekelen, H.D., Nguyen, T.H., Haan, L.H., van der Burg, B., Aarts, J.M., Rietjens, I.M. & Bovy, A.G., (2012). Induction of electrophile-responsive element (EpRE)-mediated gene expression by tomato extracts in vitro. Food chemystry, 135, 1166-72.

Harris, E., (1992). Regulation of antioxidant enzymes. FASEB journal, 555,786-766

Hauke, J., & Kossowski, T., (2011). Comparison of values of pearson's and spearman's correlation coefficients on the same sets of data. Quaestiones geographicae, 30-45

Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R, Ziaee, T., & Danaee, A., (2005) Protective effect of aqueous saffron extract (Crocus sativus L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. Journal Pharmaci Pharmacologi Science 8,387–393.

http://www.muj-web.cz/vyuka/MS/kestazeni.htm

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

https://slideplayer.fr/slide/11721109/

Huber, C., & Oberacher, H., (2001) Analysis of nucleic acids by on-line liquid chromatography-mass spectrometry. Mass spektrometry, 20, 310-43

Chen, B., Lu, Y., Chen, Y., & Cheng, J., (2015). The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. Journal of Endocrinology, 225, 83-99.

Chen, R., Sun,G,. Wang J., Zhang, H., & Sun, X., (2015) Naringin protects against anoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells via the Nrf2 signaling pathway. Foof and function, 6, 1331-44.

Churáček J.: Analytická separace látek. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1990

Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., & Yamamoto, M., (2000). Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-inducible Genes in Macrophages. Journal of biological chemistry, 77, 305-8577.

Issaq, H., Conrads, T., Janini, G., & Veenstra, T., (2002) Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. Electrophoresis 23, 3048–3061

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh,Y., Ishii, T., Igarashi,K., Engel, J., & Yamamoto, M., (2018). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes & Development, 305-8577

Jaiswal, A., (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. Free Radical Biology and Medicine. 36, 1199-1207.

Kemertelidze, É. P., et al. (2004) Chemical composition and pharmacological activity of garden savory (Satureja hortensis L.) occurring in Georgia. Pharmaceutical Chemistry Journal. 319-322 .

Kensler, T., & Wakabayashi, N., (2010). Nrf2: friend or foe for chemoprevention. Carcinogenesis, 31, 90–99

Kensler, T., Wakabayashi, N., & Biswal, S., (2007) Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 47, 89-116

Kobayashi, A., Kang, M., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., & Yamamoto, M., (2004). Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. Molecular and Cellular Biology, 656, 7130-7139.

Kwak, M., Wakabayashi, N., Greenlaw, J., Yamamoto, M., & Kensler, T., (2003). Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. Molecular and Cellular Biology, 23, 8786–8794.

Lee-Hilz, Y., Boerboom, A., Westphal, A., Berkel, W., Aarts, J., & Rietjens I., (2006). Pro-Oxidant Activity of Flavonoids Induces EpRE-Mediated Gene Expression. Chemical Research in Toxicology, 19, 1499–1505.

Luengo E., Alvarez I., & Raso J. Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2013;17:79–84.

Mashmoul, M., Azlan, A., Khaza'ai, H., Yusof, B., & Noor, S., (2013) Saffron: A Natural Potent Antioxidant as a Promising Anti-Obesity Drug. Antioxidants, 2, 293–308.

McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., & Hayes, J., (2003). Keap1-dependent Proteasomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element-driven Gene Expression. Journal of biological chemistry, 278, 21592-21600.

Melnyk, J., Wang, S., & Marcone, M., (2010) Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Research International, 66, 76-98

Merrell, M., Jackson, J., Augustine, L., Fisher, C., Slitt, A., Maher, J., Moore, W., Zhang, Y., Klaassen, C., & Cherrington, N., (2008). The Nrf2 Activator Oltipraz Also Activates the Constitutive Androstane Receptor. Drug metabolism and Disposition, 36(8), 1716–1721.

Miriyala,S., Spasojevic, I., Tovmasyan, A., Salvemini, A., Vujaskovic, Z., Clair, F., & Haberle, I., (2012) Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. Appl Biochem Biotechnol. 162, 358–372.

Mohamed, A., Nguyen, C., & Mamitsuka, H., (2016). Current status and prospects of computational resources for natural product dereplication: a review. Briefings in Bioinformatics, 17, 309–321

Momatz, S., & Abdollahi, M. (2010) An Update on Pharmacology of Satureja Species, From Antioxidant, Antimicrobial, Antidiabetes and Anti-hyperlipidemic to Reproductive Stimulation. International Journal of Pharmacology. 6, s. 346 – 353.

Myzaka, M., & Roderick H. Dashwood, R., (2006). Chemoprotection by sulforaphane: Keep one eye beyond Keap1. Cancer Lett, 233, 208–218.

Nielsen, K., Mansson, M., & Rank., C (2011) Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS . Journal National Production, 74, 2338 – 48.

Rena, D., Villeneuvea, N., Jianga,T., Wua, T., Laua, A., Toppina, H., & Zhang, D., (2010) Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. Carcinogenesis, 5665, 766Í-9877

Saw, C., Yang, A., Cheng, D., Boyanapalli, S., Su, Z., Khor, T., Gao, S., Wang, J., Jiang, Z., & Kong, T., (2012). Pharmacodynamics of Ginsenosides: Antioxidant Activities, Activation of Nrf2, and Potential Synergistic Effects of Combinations. Chemical toxicology, 25, 1574–1580

Sekhar, K., Yan, X., & Freeman, M., (2002). Nrf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by KIAA0132, the human homolog to INrf2. Oncogene, 21, 6829–6834

Sheng, Y., Abreu, I., Cabelli, D., Maroney, M., Miller, A., Teixeira,M., & Valentine, J., (2014). Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. Chemical Reviews, 114, 3854–3918.

Shibata, T., Ohta, T., Tong, K., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., & Hirohashi, S., (2008). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. National Academy of Sciences, 105 (36), 13568-13573.

Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N., (2013). Potential applications of antioxidants. Food and Chamical Toxicology, 7, 828-835.

Singha, S., Khana A., & Guptab, A., (2011). Role of glutathione in cancer pathophysiology and therapeutic interventions. Journal of Experimental Therapeutics and Oncology, 122, 38474-655.

Soria A.C., & Villamiel M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. Trends Food Sci. Technol. 2010;21:323–331.

Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M., (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. Genes to Cells, 135, 1166-72.

Tawfike, A., Viegelmann, C., & Edrada-Ebel, R., (2013). Metabolomics and dereplication strategies in natural products . In: Metabolomics Tools for Natural Product Discovery . Humana Press, 227 – 44.

Tepe, B., & Cilkiz, M., (2014) A pharmacological and phytochemical overview on Satureja. Pharmaceutical Biology, 54, 375-412.

Tonga,Y., Zhang, B., Fana, Y., & Lin, N., (2015) Keap1–Nrf2 pathway: A promising target towards lung cancer prevention and therapeutics. Chronic Diseases and Translational Medicine, 175-186

Turpaev, K., (2013). Keap1-Nrf2 signaling pathway: Mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. Biochemistry, 78, 111–126

Vinaixa M., Samino, S., Saez, I., Duran, J., Guinovart , J., & Yanes, O., (2012). A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. Metabolites, 2, 775-795

Weller, M., (2012) A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. Sensors, 12, 9181-9209

Wetzel, S., Bon, R.S., Kumar, K., & Waldmann, H., Biology-oriented synthesis. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 10800–10826.

Xu, D., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou,Y., Zheng,J., Zhang, J., & Li, H., (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. Intermational JOurnal of Molecular Scieces, 18, 96

Zhang H.F., Yang X.H., & Wang Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. Trends Food Sci. Technol. 2011;22:672–688.

Zhang, D., (2008). Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. Journal Drug Metabolism Reviews, 38, 769-789.

Zhou, B., Xiao, J., Tulia, L., & Ressom, Z., (2012) LC-MS-based metabolomics. Molecular BioSystems, 65, 368-878.

Zill-e-Huma M.A.V., Maingonnat J.F., & Chemat F. Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. J. Chromatogr. A. 2009;1216:7700–7707.

Zwiener, H., Christian, K., Frimmel, L., & Fritz, H., (2004) LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment technology – a critical review : Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids. National Agricultural Library, 378, 862-874