

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Karolína Kovaříková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Vyhledávání rostlinných extraktů s Nrf2 aktivitou

Bakalářská práce

Karolína Kovaříková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.

Údaje na CD:

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Karolína Kovaříková

Název práce: Vyhledávání rostlinných extraktů s Nrf2 aktivitou

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt: Tato bakalářská práce se zabývala vyhledáním rostlinných extraktů, které aktivují dráhu transkripčního faktoru Nrf2 a tím vykazují protirakovinnou aktivitu. Testování probíhalo na buněčných liniích EpRE-LUX, s luciferázovým reportérem odvozené od myšního elektrofilního responzivního elementu, a HepG2-GFP, odvozené od lidského hepatocelulárního karcinomu.

Teoretická část této práce se zabývala charakterizací antioxidantního systému a transkripčního faktoru Nrf2, který se nachází v buněčné cytoplazmě v inaktivním komplexu s proteinem Keap 1. Disociací proteinu Keap 1, způsobenou biologicky aktivními látkami, se stává Nrf2 aktivním a tím spouští regulaci genů kódujících antioxidantní stresové proteiny a antioxidantní enzymy druhé fáze.

V experimentální části byla provedena extrakce rostlinného materiálu, tedy kůry a dřeně granátového jablka, sušených plodů kustovnice čínské a suchého prášku rostlin camu camu a moringy olejodárné. Těchto pět extraktů bylo testováno na buněčné linii EpRE-LUX pro stanovení luciferázové aktivity. Z výsledků měření byl vyhodnocen jeden extrakt jako aktivní, a to z rostliny moringy olejodárné. Tento aktivní extrakt byl dále frakcionován na osm frakcí na reverzní fázi C18, dále na šest frakcí iontoměničovou chromatografií, konkrétně na tři frakce na katexu a na tři frakce na anexu. Extrakty těchto frakcí byly následovně testovány na obou buněčných liniích pro stanovení luciferázové a fluorescenční aktivity. Aktivní frakce byly podrobeny necílené analýze LC-MS. Výsledkem byla detekce tří majoritních metabolitů, které byly předběžně identifikovány pomocí MS/MS spekter a literatury jako deriváty quercetinu a luteolinu – konkrétně quercetin-3-O-hexosid, quercetin-3-O-(6''-malonylhexosid) a luteolin-7-O-(6''-malonyl)glukosid.

Klíčová slova: antioxidantní systém, frakcionace, Keap 1, LC-MS, Nrf2

Počet stran: 57

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Karolína Kovaříková

Title: Screening of plant extracts with Nrf2 activity

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of cell biology and genetics

Supervisor: Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: This bachelor thesis dealt with the screening of plant extracts that activate the pathway of transcription factor Nrf2 and thus show anti-cancer properties. Cellular testing was done on EpRE-LUX cell line, with a luciferase reporter gene, derived from a murine electrophilic responsive element, and HepG2-GFP cell line, derived from human hepatocellular carcinoma.

The theoretical part of this thesis dealt with the characterization of an antioxidant system and a transcription factor Nrf2 which is in the cytoplasm in an inactive complex with its repressor protein Keap 1. The dissociation of Keap 1 protein, which can be caused by biologically active substances, makes the Nrf2 active. Activated Nrf2 starts the regulation of genes that code antioxidant stress proteins and antioxidant second phase enzymes.

The experimental part of this thesis started by the extraction of plant material – a bark and pulp of the fruit of *Punica granatum* L., dried fruit of *Lycium chinense*, and powder of *Myrciaria dubia* and *Moringa oleifera*. These five extracts were tested on EpRE-LUX cell line to measure luciferase activity. Results showed one active extract, from *Moringa oleifera*. This active extract was fractionated to eight fractions on reverse phase C18 and to six fractions by ion-exchange chromatography, specifically to three cation exchanger fractions and three anion exchanger fractions. Extracts of these fractions were tested on both cell lines. Those which showed both luciferase and fluorescent activity underwent LC-MS analysis. The result of this analysis was the detection of three major metabolites which were preliminarily identified by MS/MS spectra and literature as quercetin and luteolin derivatives. Those derivatives were quercetin-3-O-hexoside, quercetin-3-O-(6''-malonylhexoside) and luteolin-7-O-(6''-malonyl)glucoside.

Keywords: antioxidant system, fractionation, Keap 1, LC-MS, Nrf2

Number of pages: 57

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Jiřího Grúze, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývala vyhledáním rostlinných extraktů, které aktivují dráhu transkripčního faktoru Nrf2 a tím vykazují protirakovinnou aktivitu. Testování probíhalo na buněčných liniích EpRE-LUX, s luciferázovým reportérem odvozené od myšního elektrofilního responzivního elementu, a HepG2-GFP, odvozené od lidského hepatocelulárního karcinomu.

Teoretická část této práce se zabývala charakterizací antioxidantního systému a transkripčního faktoru Nrf2, který se nachází v buněčné cytoplazmě v inaktivním komplexu s proteinem Keap 1. Disociací proteinu Keap 1, způsobenou biologicky aktivními látkami, se stává Nrf2 aktivním a tím spouští regulaci genů kódujících antioxidantní stresové proteiny a antioxidantní enzymy druhé fáze.

V experimentální části byla provedena extrakce rostlinného materiálu, tedy kůry a dřevě granátového jablka, sušených plodů kustovnice čínské a suchého prášku rostlin camu camu a moringy olejodárné. Těchto pět extraktů bylo testováno na obou buněčných liniích pro stanovení luciferázové a fluorescenční aktivity. Z výsledků měření byl vyhodnocen jeden extrakt jako aktivní, a to z rostliny moringy olejodárné. Tento aktivní extrakt byl dále frakcionován na osm frakcí na reverzní fázi C18, dále na šest frakcí iontoměničovou chromatografií, konkrétně na tři frakce na katexu a na tři frakce na anexu. Extrakty těchto frakcí byly následně testovány na obou buněčných liniích pro stanovení luciferázové a fluorescenční aktivity. Aktivní frakce byly podrobeny necílené analýze LC-MS. Výsledkem byla detekce tří majoritních metabolitů, které byly předběžně identifikovány pomocí MS/MS spekter a literatury jako deriváty quercetinu a luteolinu – konkrétně quercetin-3-O-hexosid, quercetin-3-O-(6''-malonylhexosid) a luteolin-7-O-(6''-malonyl)glukosid.

SUMMARY

This bachelor thesis dealt with the screening of plant extracts that activate the pathway of transcription factor Nrf2 and thus show anti-cancer properties. Cellular testing was done on EpRE-LUX cell line, with a luciferase reporter gene, derived from a murine electrophilic responsive element, and HepG2-GFP cell line, derived from human hepatocellular carcinoma.

The theoretical part of this thesis dealt with the characterization of an antioxidant system and a transcription factor Nrf2 which is in the cytoplasm in an inactive complex with its repressor protein Keap 1. The dissociation of Keap 1 protein, which can be caused by biologically active substances, makes the Nrf2 active. Activated Nrf2 starts the regulation of genes that code antioxidant stress proteins and antioxidant second phase enzymes.

The experimental part of this thesis started by the extraction of plant material – a bark and pulp of the fruit of *Punica granatum* L., dried fruit of *Lycium chinense*, and powder of *Myrciaria dubia* and *Moringa oleifera*. These five extracts were tested on both cell lines to measure luciferase and fluorescent activity. Results showed one active extract, from *Moringa oleifera*. This active extract was fractionated to eight fractions on reverse phase C18 and to six fractions by ion-exchange chromatography, specifically to three cation exchanger fractions and three anion exchanger fractions. Extracts of these fractions were tested on both cell lines. Those which showed luciferase and fluorescent activity underwent LC-MS analysis. The result of this analysis was the detection of three major metabolites which were preliminarily identified by MS/MS spectra and literature as quercetin and luteolin derivatives – quercetin-3-O-hexoside, quercetin-3-O-(6''-malonylhexoside) and luteolin-7-O-(6''-malonyl)glucoside.

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za veškeré rady a informace, které mi při vedení práce předal. Dále děkuji Mgr. Lucii Slobodianové za provedení laboratořemi a za pomoc při experimentech a Mgr. Martinu Vavrušovi za pomoc se zpracováním výsledků UHPLC-MS. Všem zároveň děkuji za jejich přátelský přístup a čas, který mi při zpracování této práce věnovali.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	VÝZNAM ANTIOXIDAČNÍHO SYSTÉMU, ENZYMY, NÍZKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY	3
3.2	TRANSKRIPČNÍ FAKTOR Nrf2	4
3.2.1	MECHANISMUS AKTIVACE	5
3.2.2	AKTIVOVANÉ ENZYMY	7
3.2.3	ZNÁMÉ AKTIVÁTORY (INHIBITORY) Nrf2-ARE signalizace	8
3.2.4	EpRE-LUX SYSTÉM	10
3.2.5	HepG2-GFP.....	11
3.3	FRAKCIONACE ŘÍZENÁ BIOLOGICKOU AKTIVITOU	12
3.4	HPLC (UHPLC)	12
3.5	LC-MS METABOLOMIKA	14
3.5.1	TYPY IONIZACE.....	14
3.5.2	TYPY HMOTNOSTNÍCH ANALYZÁTORŮ.....	14
3.5.3	TYPY DETEKTORŮ.....	15
3.6	ROSTLINNÉ ZDROJE	15
3.6.1	MARHANÍK OBECNÝ.....	15
3.6.2	MORINGA OLEJODÁRNÁ.....	16
3.6.3	MYRCIARIA DUBIA.....	17
3.6.4	KUSTOVNICE ČÍNSKÁ.....	18
4	MATERIÁL A METODY	19
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	19
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOK.....	19
4.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	21
4.4	POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY	22
5	VÝSLEDKY	28
6	DISKUZE	38
7	ZÁVĚR	40
8	LITERATURA	41

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ARE	Antioxidant response element (antioxidační responzivní element)
ATP	Adenosintrifosfát
CAT	Kataláza
DCTA	Kyselina 1,2–diaminocyklohexan –N-N-N-N-tetraoctová
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EMEM	Eagle´s Minimum Essential Medium
EpRE	Electrophile responsive element (elektrofilní responzivní element)
EpRE-LUX	Induction of electrophile element – luciferase reporter gene
ESI	Ionizace elektrosprejem
GCL	Glutamát cystein ligáza
GPx	Glutathionperoxidáza
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transferáza
HepG2-GFP	Hepatocelular carcinoma – green fluorescent protein
HO-1	Hem oxygenáza 1
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LipA	Lipoic acid (kyselina lipoová)
NQO1	NAD(P)H: chinon oxidoreduktáza-1
Nrf2	Nuclear factor erythorid 2
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
ROS	Reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RNS	Reactive nitrid species (reaktivní formy dusíku)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SOD	Superoxiddismutáza
Tris	Trisaminomethan
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Distribuce složek antioxidačního systému v buňce lidského organismu.
- Obrázek 2: Struktura lidského transkripčního faktoru Nrf2 s homologními doménami Neh1–Neh7.
- Obrázek 3: Struktura lidského proteinu Keap1 s doménami BTB, IVR a Kelch.
- Obrázek 4: Mechanismus aktivace transkripčního faktoru Nrf2 A) stabilizací pomocí degradace proteinu Keap1, B) fosforylací Nrf2 protein kinázami.
- Obrázek 5: Reakční schéma působení antioxidačních enzymů superoxid dismutázy, katalázy a glutathion peroxidázy.
- Obrázek 6: Redukce chinonu pomocí enzymu NAD(P)H: chinon oxidoreduktázy 1 (NQO1) na hydrochinon za tvorby jeho stabilní či nestabilní formy.
- Obrázek 7: Aktivace transkripčního faktoru Nrf2 rostlinnými metabolity indukci antioxidačních a detoxifikačních enzymů blokujících poškození DNA.
- Obrázek 8: Chemická struktura vybraných látek aktivujících Nrf2-ARE signalizaci.
- Obrázek 9: Schéma základního uspořádání kapalinového chromatografu.
- Obrázek 10: Schéma hmotnostního spektrometru.
- Obrázek 11: Vzhled granátového jablka, plodu marhaníku obecného (*Punica granatum* L.).
- Obrázek 12: Chemické struktury vybraných aktivních látek granátového jablka.
- Obrázek 13: Moringa olejodárná – vzhled stromu (vlevo), listů (vpravo nahoře) a semen (vpravo dole).
- Obrázek 14: Chemická struktura moringinu.
- Obrázek 15: Rostlina *Myrciaria dubia*, jinak zvaná jako camu camu, a její plody.
- Obrázek 16: Rostlina kustovnice čínská (*Lyceum chinense*) a její plody.
- Obrázek 17: Rozložení na 96 jamkové destičce při buněčném testování.
- Obrázek 18: Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktů testovaných na buněčné linii EpRE-LUX vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n = 3).

- Obrázek 19: Grafické vyjádření luciferázové aktivity frakcí moringy olejodárné z reverzní fáze C18 na buněčné linii EpRE-LUX vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 3$).
- Obrázek 20: Grafické vyjádření luciferázové aktivity frakcí moringy olejodárné z iontoměnočové chromatografie na buněčné linii EpRE-LUX vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 3$).
- Obrázek 21: Grafické vyjádření fluorescenční aktivity frakcí moringy olejodárné z reverzní fáze C18 na buněčné linii HepG2-GFP vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 3$).
- Obrázek 22: Grafické vyjádření fluorescenční aktivity frakcí moringy olejodárné z iontoměničové chromatografie na buněčné linii HepG2-GFP vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 3$).
- Obrázek 23: UHPLC-MS chromatogram frakce K1 moringy olejodárné v pozitivním módu, zobrazení Total Ion Current (TIC).
- Obrázek 24: UHPLC-MS chromatogram frakce K1 moringy olejodárné v negativním módu, zobrazení Total Ion Current (TIC).
- Obrázek 25: MS/MS spektrum prekurzorového iontu (m/z 463) v retenčním čase 9,04 min detekovaného ve frakci K1 moringy olejodárné v negativním módu.
- Obrázek 26: MS/MS spektrum prekurzorového iontu (m/z 549) v retenčním čase 9,48 min detekovaného ve frakci K1 moringy olejodárné v negativním módu.
- Obrázek 27: MS/MS spektrum prekurzorového iontu (m/z 533) v retenčním čase 10,67 min detekovaného ve frakci K1 moringy olejodárné v negativním módu.
- Obrázek 28: UHPLC-MS chromatogram frakce K1 moringy olejodárné v pozitivním módu. Extracted ion chromatogram (EIC) zobrazuje m/z 312, který odpovídá pseudomolekulárnímu iontu moringinu $[M+H]^+$.

SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1: Volné radikálové formy kyslíku a dusíku.
- Tabulka 2: Srovnání myššího GST-Ya a lidského NQO1 EpRE elementu se sekvencemi EpRE core a konsenzuálními sekvencemi.
- Tabulka 3: Ředění metanolu pro přípravu 4 ml roztoku od každé koncentrace.
- Tabulka 4: Složení lyzačního pufru pro přípravu 10 ml roztoku.
- Tabulka 5: Složení Flash Mixu pro přípravu 10 ml roztoku.
- Tabulka 6: Složení kaspázového pufru pro přípravu 50 ml roztoku.
- Tabulka 7: Gradient složení mobilních fází A (acetonitril) a B ($5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina mravenčí).
- Tabulka 8: Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru při detekci.
- Tabulka 9: Majoritní metabolity detekované ve frakci K1 moringy olejodárné a jejich předběžná identifikace.

1 ÚVOD

Transkripční faktory jsou látky proteinové povahy, které v organismu řídí aktivitu genů. Některé transkripční faktory regulují expresi genů, které kódují antioxidantní látky – například enzymy nebo stresové proteiny. Jedním z těchto transkripčních faktorů je i Nrf2 nacházející se v cytoplazmě buňky, kde je v inaktivním komplexu s represorovým proteinem Keap1.

Aktivace transkripčního faktoru Nrf2 je způsobena disociací od proteinu Keap1, kterou vyvolá oxidační či elektrofilní stres. Aktivovaný Nrf2 je translokován do buněčného jádra, kde se váže na antioxidantní responzivní elementy (ARE) nebo elektrofilní responzivní elementy (EpRE), jež se nacházejí na genech kódujících antioxidantní a detoxifikační enzymy. Tyto obranné mechanismy chrání organismus před zánětlivými poškozeními tkání, zabraňují poškození DNA a mohou potlačit i proliferaci maligních buněk.

V rámci bakalářské práce se budu zabývat testováním čtyř rostlin, které by mohly indukovat aktivaci transkripčního faktoru Nrf2. Rostlinné extrakty budu testovat na dvou buněčných liniích sledováním luciferázové a fluorescenční aktivity. Po identifikaci aktivního extraktu rostliny budu provádět necílenou LC-MS analýzu pro identifikaci konkrétních metabolitů obsažených v rostlině.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem literární části této práce byla charakterizace antioxidačního systému a jeho funkcí, charakterizace transkripčního faktoru Nrf2 a rostlinných materiálů, jimiž byla testována indukce aktivity tohoto transkripčního faktoru na dvou buněčných liniích, a to EpRE-LUX a HepG2-GFP.

Cílem experimentální části byla příprava materiálu, kultivace buněčných linií, testování aktivity dráhy transkripčního faktoru Nrf2 a chemická charakterizace aktivních extraktů pomocí LC-MS.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 VÝZNAM ANTIOXIDAČNÍHO SYSTÉMU, ENZYMY, NÍZKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY

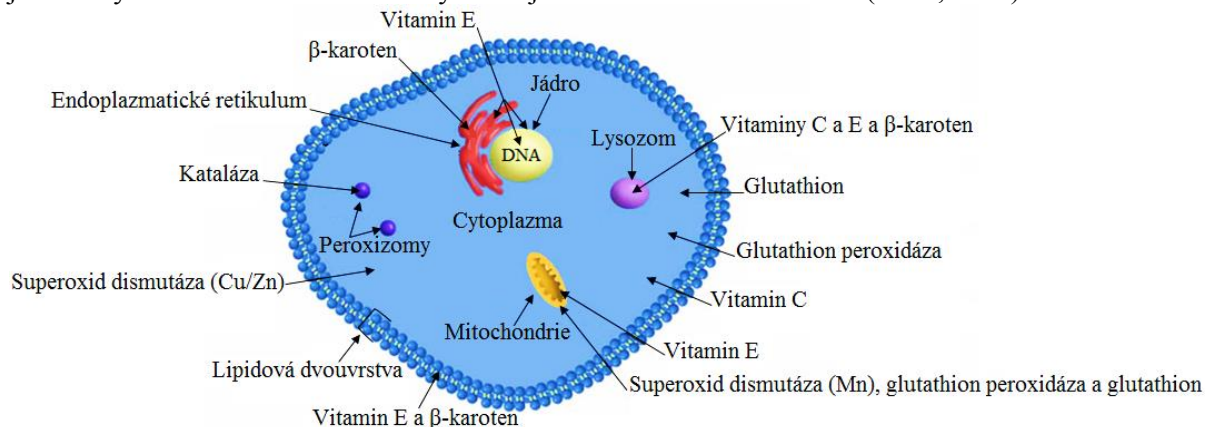
Antioxidační systém je jedním z obranných mechanismů organismu zahrnující skupinu látek, antioxidantů, které mají schopnost reagovat s volnými radikály a neutralizovat jejich účinky, čímž chrání buňky před poškozením (Hajhashemi *et al.*, 2010).

Jako volné radikály jsou označovány atomy či molekuly schopné samostatné existence, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. V organismu se tvoří dvěma možnými cestami, jednak exogenně, například vlivem ionizujícího záření, jednak endogenně při metabolických procesech. Mohou se vyskytovat ve dvou formách, a to jako reaktivní formy kyslíku, ROS, nebo reaktivní formy dusíku, RNS. Tyto formy jsou uvedeny v Tabulce 1 (Acworth *et Oxon*, 2003). Pokud v organismu vznikne nerovnováha mezi volnými radikály kyslíku a antioxidační obranou, dochází k oxidačnímu stresu. Ten pak dereguluje řadu buněčných funkcí a vede k patologickým stavům organismu, kterými mohou být například stárnutí, autoimunitní onemocnění, karcinogeneze a mnohá další (Sindhi *et al.*, 2013).

Tabulka 1: Volné radikálové formy kyslíku a dusíku

Reaktivní formy kyslíku		Reaktivní formy dusíku	
Název radikálu	Vzorec radikálu	Název radikálu	Vzorec radikálu
Hydroperoxyl	$\text{HO}_2\cdot$	Oxid dusnatý	$\text{NO}\cdot$
Hydroxyl	$\text{HO}\cdot$	Oxid dusičitý	$\text{NO}_2\cdot$
Peroxyl	$\text{ROO}\cdot$	Peroxynitrit	$\text{ONOO}\cdot$
Superoxid	$\text{O}_2\cdot$		

Antioxidační systém lze rozdělit na antioxidační enzymy a antioxidační substráty, jež lze dále dělit na membránové (lipofilní) a nemembránové (hydrofilní). Mezi nejdůležitější antioxidační enzymy patří superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (GPx) a kataláza (CAT). Mezi lipofilní substráty jsou řazeny tokoferoly a karotenoidy, k hydrofilním substrátům je řazena například kyselina askorbová, glutathion (GSH), transferin a feritin. Distribuce jednotlivých složek antioxidačního systému je znázorněna na Obrázku 1 (Zima, 2003).



Obrázek 1: Distribuce složek antioxidačního systému v buňce lidského organismu (upraveno podle <https://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems.aspx>).

Nejvýznamnějším antioxidačním enzymem je superoxid dismutáza (EC 1.15.1.1), která katalyzuje dismutaci vysoce reaktivních superoxidových aniontů na kyslík a méně reaktivní peroxid vodíku. Peroxid vodíku je rozložen pomocí enzymu kataláza (EC 1.11.1.6) za tvorby vody a kyslíku. Glutathion peroxidáza (EC 1.11.1.9) za přítomnosti glutathionu katalyzuje redukci hydroperoxidů, dnes již označovaných jako superoxydy (Matés *et al.*, 1999).

Glutathion je jedním z hydrofilních substrátů, který se v buňkách vyskytuje ve dvou volných formách, buď v redukované (GSH), nebo oxidované (GSSG), a poměrem těchto forem lze indikovat oxidační stres v buňce (Pizzorno, 2014). Dalším z významných hydrofilních substrátů je kyselina askorbová neboli vitamin C. Její antioxidační aktivita spočívá ve schopnosti darovat elektrony, a tím chránit důležité biomolekuly před oxidačním poškozením (Carr *et Maggini*, 2017). Vysokomolekulárním hydrofilním antioxidantem je transferin, který snižuje koncentraci volných iontů železa transportem do proliferujících buněk, a feritin, což je protein zásobní, který volné ionty železa v cytosolu pohlcuje (Oberle *et al.*, 1998; Chauhan *et al.*, 2004).

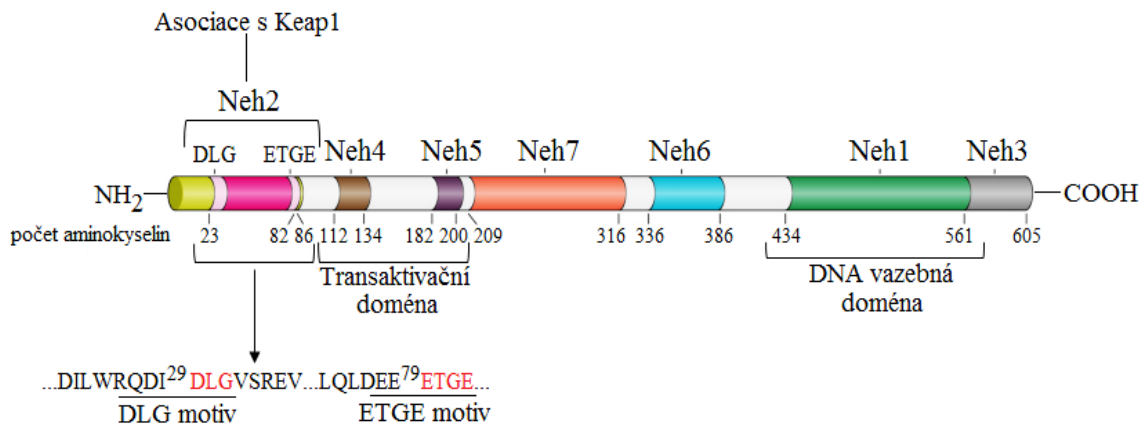
Významnými lipofilními substráty jsou karotenoidy zahrnující například β -karoten a lykopen. Mají schopnost zhášet singletový kyslík a vychytávat další reaktivní formy kyslíku (Fiedor *et Burda*, 2014). V neposlední řadě tvoří rozsáhlou skupinu antioxidačně aktivních látek tokoferoly (vitamin E), které vychytávají peroxylové radikály. Pro lidský organismus je nepreferovanější formou α -tokoferol (Traber *et Atkinson*, 2007).

3.2 TRANSKRIPČNÍ FAKTOR Nrf2

Transkripční faktory jsou proteiny, které kontrolují aktivitu genů tím, že spouštějí či regulují jejich transkripci (Cooper, 2009). Jedním z nich je i transkripční faktor Nrf2, z anglického názvu nuclear-factor-erythroid-2-related factor 2, který reguluje geny kódující antioxidační stresové proteiny a antioxidační enzymy druhé fáze, což jsou enzymy metabolizující xenobiotika buď konjugací molekul, nebo degradací reaktivních center. Tyto proteiny a enzymy se tvoří v organismu jako odpověď na oxidační stres (Prester *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 2004).

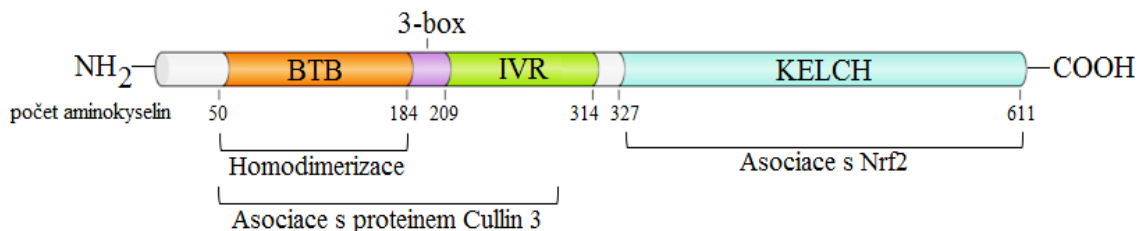
Nrf2 patří do transkripčních faktorů se strukturním motivem cap 'n' collar leucinového zipu (CNC bZIP) a je kódován genem *NFE2L2*. V lidském organismu nabývá délky 605 aminokyselin a obsahuje sedm vysoce konzervativních oblastí známých jako Nrf2-ECH homologní (Neh) domény, jejichž distribuce je znázorněna na Obrázku 2. Neh1 obsahuje CNC bZIP doménu, která zprostředkovává heterodimerizaci s proteinem Maf (homolog onkogenu muskuloaponeurotického fibrosarkomu). Neh2 doména obsahuje dva degrony, což jsou části proteinu důležité při regulaci rychlosti degradace proteinu. Tyto dva degrony jsou obecně známé jako DLG a ETGE motivy a jsou specificky vázány díky proteinu Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Další dva degrony byly popsány v doméně Neh6. Tyto motivy však nejsou rozpoznávány proteinem Keap1, ale jsou cíleny pro degradaci E3 ubikvitin ligázou β -TrCP. U domén Neh3–Neh5 se předpokládá, že fungují ve zprostředkované aktivaci vazbou

na rozličné komponenty transkripčního aparátu. Naopak interakcemi domény Neh7 s DNA vazebnou doménou retinoidního X receptoru α (RXRA) je aktivita Nrf2 potlačována (Canning *et al.*, 2015).



Obrázek 2: Struktura lidského transkripčního faktoru Nrf2 s homologními doménami Neh1–Neh7 (upraveno podle Mitsuishi *et al.*, 2012; Canning *et al.*, 2015).

Transkripční faktor Nrf2 je za fyziologických podmínek organismu lokalizován v buněčné cytoplazmě v inaktivním komplexu s represorovým proteinem Keap1 (Surh *et al.*, 2008). Keap1 patří do rodiny BTB-Kelch proteinů a je kódován *Keap1* genem. Struktura tohoto proteinu je zaznamenána na Obrázku 3. N-terminální část proteinu obsahuje BTB doménu, která získala pojmenování podle proteinů *Drosophily*, a to Broad complex, Tramtrack a Bric à brac. Zprostředkovává homodimerizaci Keap1 a přispívá k interakcím s proteinem Cullin 3 (Cul3). Hlubší interakce s Cul3 jsou zprostředkovávány motivem 3-box, který je konzervativním C-terminálním prodloužením BTB domény a zároveň ji připojuje k doméně IVR, z anglického central intervening region. Na C-konci leží Kelch doména, jež je potřebná pro zachycení substrátu. Zvlášť se může vázat na ETGE nebo DLG motiv transkripčního faktoru Nrf2 (Canning *et al.*, 2015).



Obrázek 3: Struktura lidského proteinu Keap1 s doménami BTB, IVR a Kelch (upraveno podle Mitsuishi *et al.*, 2012; Canning *et al.*, 2015).

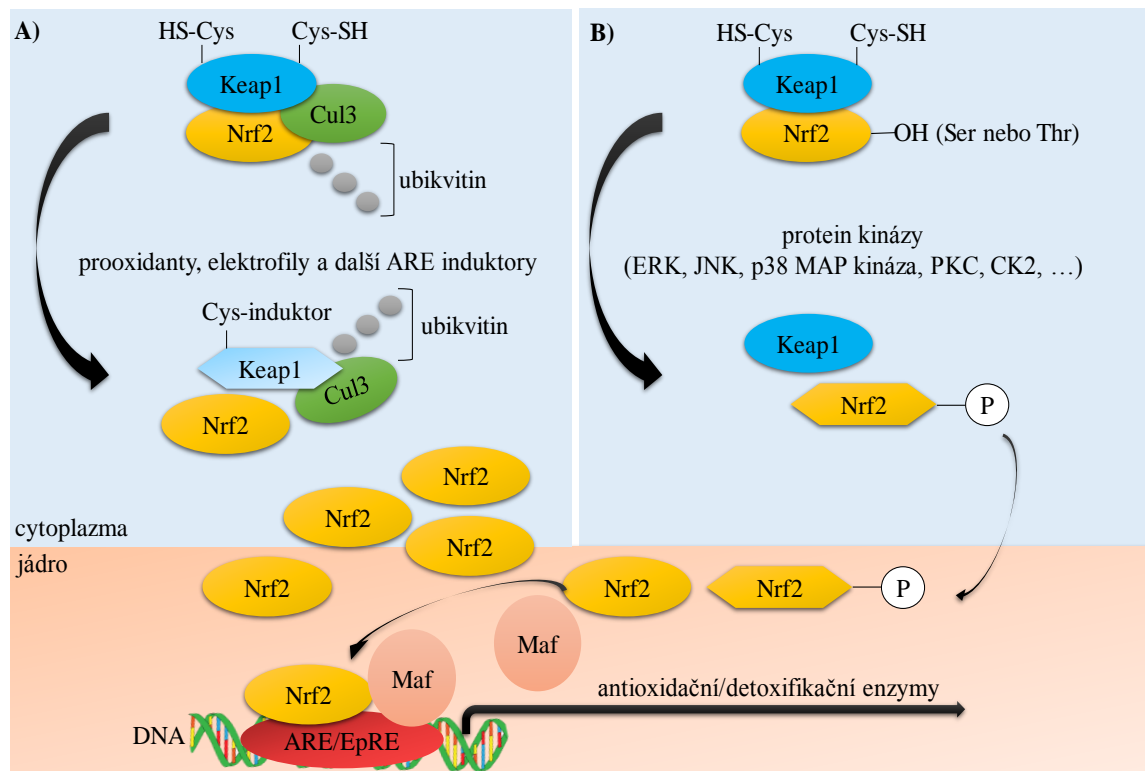
3.2.1 MECHANISMUS AKTIVACE

Inaktivní komplex Nrf2 s proteinem Keap1, který je zakotvený v aktinovém cytoskeletu buňky, způsobuje ubikvitinaci Nrf2 následovanou proteazomální degradací. Keap1 zde slouží

jako substrátový adaptorový protein pro Cul3-dependentní E3 ubikvitin ligázový komplex, který tvoří asociaci s Cul3a ring-box proteinem 1 (Rbx1). Tento komplex je zacílen na lyzinové zbytky N-konce Neh2 domény transkripčního faktoru Nrf2. Aktivace Nrf2 může probíhat dvěma různými mechanismy, a to buď stabilizací prostřednictvím Keap1 cystein-thiolové modifikace, nebo fosforylací Nrf2 upstream kinázami (Surh *et al.*, 2008; Canning *et al.*, 2015).

Ke stabilizaci Nrf2 dochází při oxidačním či elektrofilním stresu, kdy je Keap1 inaktivován modifikací cysteinových zbytků, což zapříčiní změnu jeho konformace, a tím ztrátu adaptorové aktivity. Takto inaktivovaný Keap1 je polyubikvitinován proteinem Cul3 a degradován proteazomem. Degradace Keap1 zajistí stabilizaci Nrf2 a jeho translokaci do buněčného jádra, kde se akumuluje, heterodimerizuje s dalšími transkripčními faktory, jako jsou malé Maf proteiny, a váže se na 5'-upstream *cis*-acting regulační sekvenci, označovanou jako antioxidační responzivní elementy (ARE) či elektrofilní responzivní elementy (EpRE). Tyto elementy se nacházejí v promotorových oblastech genů kódujících antioxidační či detoxifikační enzymy.

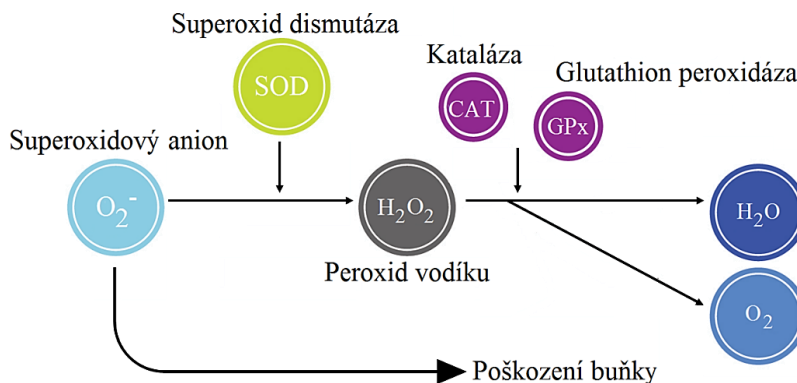
Kromě volných radikálů kyslíku či elektrofilů mohou disociaci Nrf2 od Keap1 způsobit i aktivované protein kinázy, a to fosforylací Nrf2. Příkladem těchto kináz jsou protein kináza C (PKC), c-Jun N-terminální kináza (JNK), extracelulárním signálem regulovaná kináza (ERK), kasein kináza 2 (CK2) či p38 MAP kináza. Grafické znázornění obou mechanismů aktivace Nrf2 je na Obrázku 4 (Surh *et al.*, 2008).



Obrázek 4: Mechanismus aktivace transkripčního faktoru Nrf2 A) stabilizací pomocí degradace proteinu Keap1, B) fosforylací Nrf2 protein kinázami (upraveno podle Surh *et al.*, 2008).

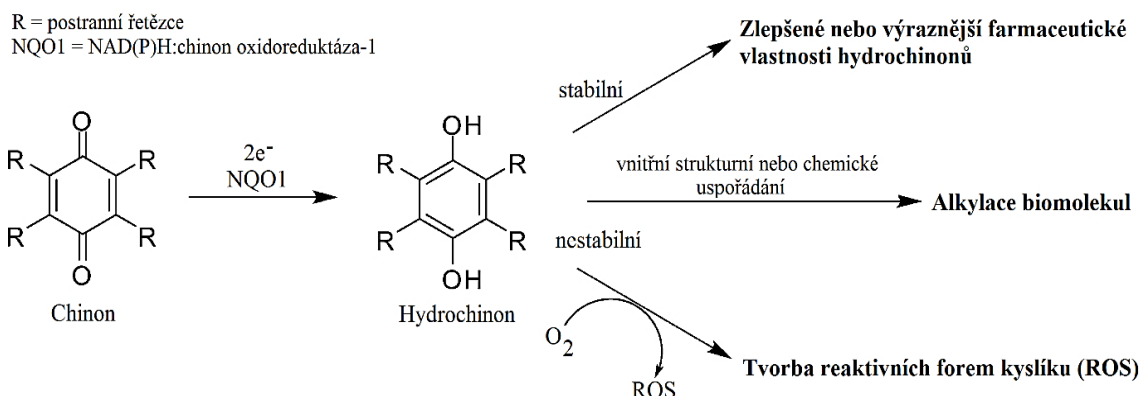
3.2.2 AKTIVOVANÉ ENZYMY

Transkripční faktor Nrf2 hraje klíčovou roli v indukci genů, které kódují cytoprotektivní a stres responzivní enzymy a příbuzné proteiny. Nejvýznamnějšími enzymy jsou superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza, jejichž působení je znázorněno na Obrázku 5. Další aktivované enzymy zahrnují NAD(P)H: chinon oxidoreduktázu-1 (NQO1), hem oxygenázu 1 (HO-1), glutathion S-transferázu (GST) a glutamát cystein ligázu (GCL) (Surh *et al.*, 2008).



Obrázek 5: Reakční schéma působení antioxidačních enzymů superoxid dismutázy, katalázy a glutathion peroxidázy (upraveno podle <http://glisodin.zeitguysdev.com/science/>)

NQO1 (EC 1.6.99.2) se nachází v cytosolu a je obligátní dvouelektronovou reduktázou využívající nikotinamidadenin dinukleotid (NADH) nebo nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (NADPH) jako redukující kofaktor. Redukuje velké množství substrátů, přičemž nejvýznamnější je redukce chinonu na hydrochinon. Reakce probíhá v jednom dvouelektronovém kroku, jehož výhoda spočívá v tom, že netvoří toxický radikálový meziprodukt semichinon. Vzniklý hydrochinon je stabilní a může být konjugován nebo vyloučen. Hydrochinon však nemusí být stabilní vždy, což se projevuje jeho reakcí s kyslíkem za tvorby toxického semichinonu a ROS, jak je znázorněno na Obrázku 6 (Ross *et al.*, 2000).



Obrázek 6: Redukce chinonu pomocí enzymu NAD(P)H: chinon oxidoreduktázy 1 (NQO1) na hydrochinon za tvorby jeho stabilní či nestabilní formy (upraveno podle Wellington, 2015).

Hem oxygenáza 1 (EC 1.14.99.3) chrání organismus proti oxidačnímu stresu katalýzou přeměny prooxidantu hemu na biliverdin, který je dále redukován na antioxidant bilirubin. HO-1 je jednou ze dvou izoform hem oxygenáz a její induktory zahrnují širokou škálu chemických činidel či fyzikálních faktorů (Prester *et al.*, 1995).

Jako superoxid dismutáza je označována skupina metaloenzymů, které jsou klíčovými buněčnými antioxidanty. Tyto proteiny katalyzují dismutaci superoxidových radikálů na molekulový kyslík a peroxid vodíku. V závislosti na přítomnosti kofaktorů se superoxid dismutázy u savců dělí na cytoplazmatickou s mědí a zinkem (Cu/Zn SOD, SOD1), mitochondriální s manganem (Mn SOD, SOD2) a extracelulární s mědí a zinkem (Cu/Zn SOD, SOD3). Všechny tyto isoformy obsahují katalytický iont kovu, kterým může být buď měďnatý kation (Cu^{2+}) nebo manganitý kationt (Mn^{3+}). Zinečnatý kationt (Zn^{2+}) zajišťuje funkci stability (Fukai *et Ushio-Fukai*, 2011; Younus, 2018).

Významnou složkou antioxidační ochrany organismu je glutathion. První krok biosyntézy katalyzuje enzym glutamát cystein ligáza (EC 6.3.2.2). Konjugací GSH je zajištěna detoxifikace elektrofilů enzymem glutathion *S*-transferázou (EC 2.5.1.18), která reaguje adicí GSH na elektrofilu s různými chemickými strukturami. Nejvýznamnějším enzymem využívajícím GSH je glutathion peroxidáza (Strange *et al.*, 2001; Dickinson *et al.*, 2004).

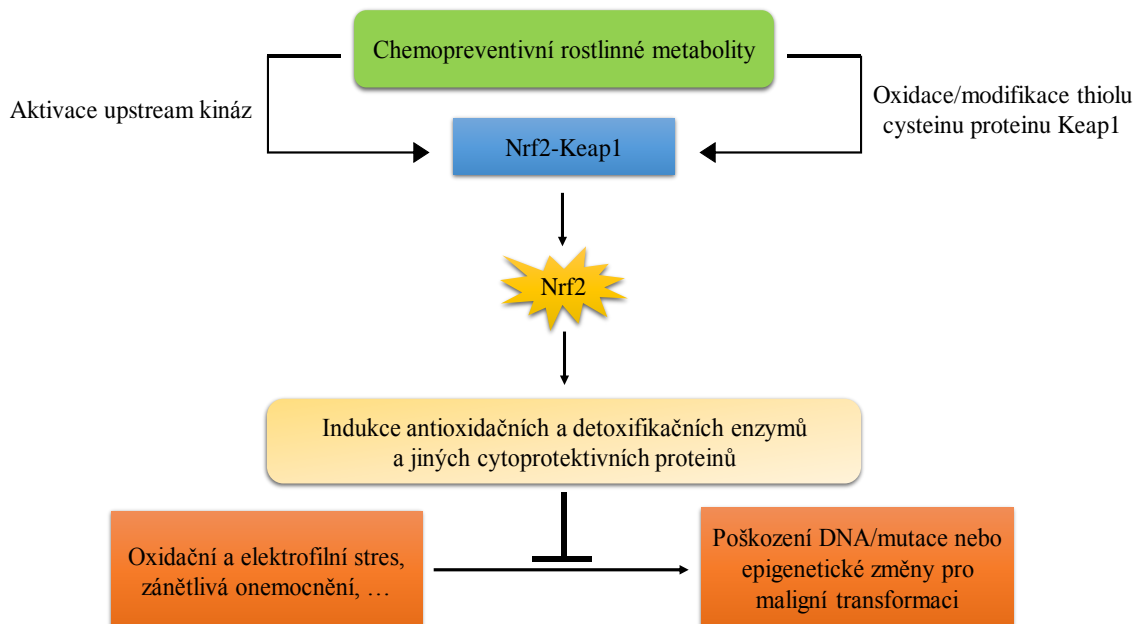
Glutathion peroxidáza je složena ze čtyř podjednotek obsahujících selenocysteinový zbytek, který je nezbytný pro funkci tohoto enzymu. GPx katalyzuje redukcí hydroperoxidů použitím GSH, jehož důležitou částí jsou konsenzuální sekvence pro vazbu elektrofilního responsivního elementu EpRE. Má důležité izoenzymy, které se liší výskytem. Prvním typem je cytosolická a mitochondriální glutathion peroxidáza (cGPx, GPx1), která redukuje hydroperoxydy mastných kyselin a peroxid vodíku na úkor GSH. GPx1 se nachází ve většině tkání, stejně jako fosfolipid-hydroperoxidová glutathion peroxidáza (PHGPx, GPx4) lokalizovaná v cytosolu i buněčné membráně. GPx4 redukuje fosfolipidové hydroperoxydy a hydroperoxydy mastných kyselin a cholesterolu. Dalšími typy jsou cytosolická glutathion peroxidáza 2 (GPx2, GPx-G1) a glutathion peroxidáza 3 (GPx3, GPx-P), které se vyskytují v malém množství, s výjimkou gastrointestinálního traktu a ledvin (Matés *et al.*, 1999; Franco *et Cidlowski*, 2009).

Kataláza je tetramerním enzymem složeným ze čtyř stejných podjednotek. Chrání buňky před peroxidem vodíku, který je v nich generován, za tvorby vody a molekulového kyslíku. Není sice nezbytná pro všechny typy buněk v organismu, ale hraje důležitou roli při získávání tolerance k oxidačnímu stresu s adaptivní buněčnou odpovědí (Matés *et al.*, 1999).

3.2.3 ZNÁMÉ AKTIVÁTORY (INHIBITORY) Nrf2-ARE SIGNALIZACE

Mezi aktivátory Nrf2-ARE signalizace patří biologicky aktivní látky obsažené v rostlinách, které mají chemopreventivní charakter. Tyto rostlinné metabolity aktivují Nrf2 signalizaci indukcí fosforylace Nrf2 aktivací upstream protein kináz nebo prostřednictvím

interakce s thioley cysteinu proteinu Keap1. Následná indukce cytoprotektivních enzymů může potlačit oxidační stres a zánětlivá poškození tkání, čímž znemožní poškození DNA nebo supresi proliferace iniciovaných buněk a maligní transformace. Schéma této aktivace je na Obrázku 7 (Surh *et al.*, 2008).

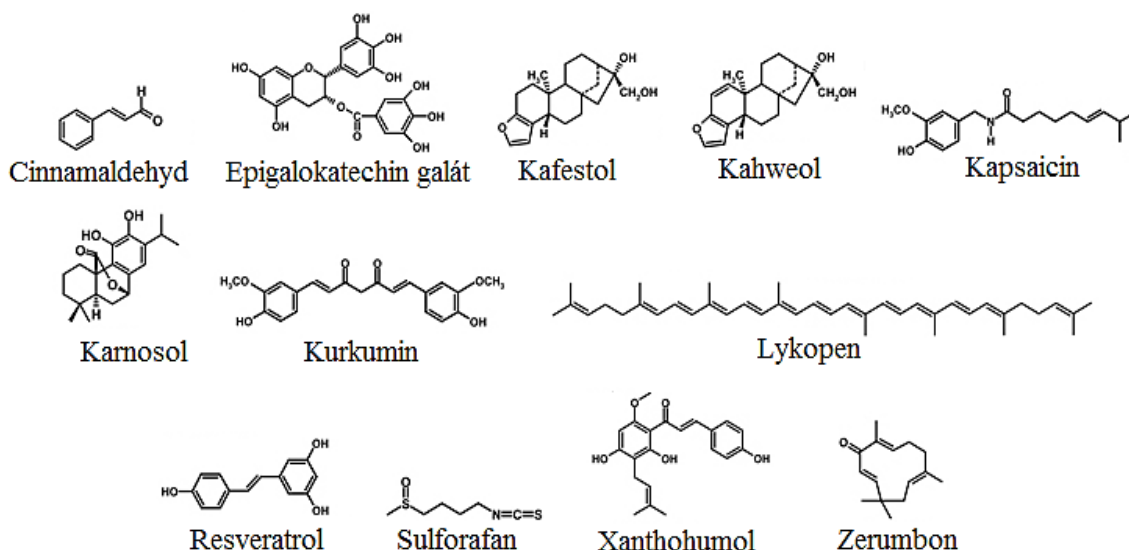


Obrázek 7: Aktivace transkripčního faktoru Nrf2 rostlinnými metabolity indukcí antioxidantních a detoxifikačních enzymů blokujících poškození DNA (upraveno podle Surh *et al.*, 2008).

Rostlinných metabolitů aktivujících Nrf2-ARE signalizaci je mnoho. Jedná se například o aldehydy, alkaloidy, isoprenoidy, isothiokyanáty a polyfenoly zahrnující flavonoidy. Mezi aldehydy se řadí cinnamaldehyd nacházející se ve skořici a do alkaloidů spadá kapsaicin pálivých paprik. Skupina izoprenoidů zahrnuje lykopen rajčat, kafestol a kahweol kávovníku, karnosol rozmarýny a zerumbon tropického zázvoru. Isothiokyanáty zastupuje sulforafan brokolice a další košťálové zeleniny. Do polyfenolů se řadí resveratrol obsažený v hroznovém víně, epigalokatechin galát zeleného čaje jako hlavní, a zároveň nejúčinnější aktivátor Nrf2 signalizace, a flavonoidy kurkumin obsažený v kurkumě a xanthohumol obsažený v chmelu. Struktura těchto látek je na Obrázku 8 (Surh *et al.*, 2008).

Role transkripčního faktoru Nrf2 nemusí být vždy ochranná. Jeho trvalá aktivace přispívá k rozvoji různých typů rakoviny a rezistence na chemoterapii a radioterapii. Zvýšená exprese byla zaznamenána u řady malignit včetně rakoviny jater, plic, prsou, močového měchýře, vaječníků, pankreatu a endometria. Z tohoto důvodu byly studovány inhibitory signalizace Nrf2-ARE, které senzibilizují rakovinné buňky na chemoterapeutika. Mezi tyto inhibitory patří například flavonoidy luteolin, apigenin, chrysin a wogonin či vitaminy a jejich deriváty jako jsou kyselina askorbová či kyselina retinová. Dalším inhibitem je brustatol obsažený v rostlině

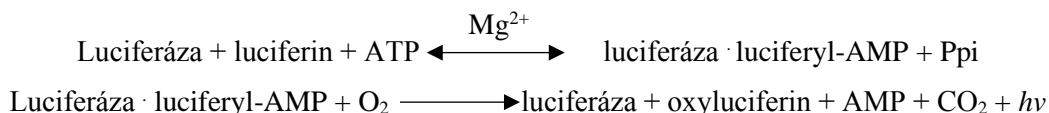
*Brucea javanica*s, cryptotanshinon obsažený v čínské bylině *Salvia miltiorrhizas* nebo triptolid obsažený v rostlině *Tripterygium wilfordii* *celastraceae*. Dále se zde řadí mykotoxin ochratoxin A a trigonellin získaný z kávového extraktu (Zhu *et al.*, 2016).



Obrázek 8: Chemická struktura vybraných látek aktivujících Nrf2-ARE signalizaci (upraveno podle Surh *et al.*, 2008).

3.2.4 EpRE-LUX SYSTÉM

Elektrofilní responzivní element je transkripčním zesilovačem zapojeným do regulace exprese genů s protirakovinným chemoprotektivním charakterem. Pro studium této genové exprese byly vyvinuty dvě stabilně transfekované reportérové buněčné linie, EpRE(hNQO1)-LUX a EpRE(mGST-Ya)-LUX, využívající luciferázové exprese jako reportéru EpRE-zprostředkované aktivace genové transkripce. Luciferáza je enzym, který katalyzuje produkci světla bioluminiscenčních organismů. Významné využití má při vložení do savčích expresních vektorů, kdy je po zavedení do organismu přechodně exprimována. Nejčastěji se jedná o luciferázu světlušky a luciferázu rodu *Renilla*, přičemž obě tyto luciferázy byly použity i při vývoji EpRE-LUX buněčných linií. Samotný enzym bioluminiscenci vyvolá pouze za přítomnosti několika substrátů. Významným substrátem je luciferin, který oxiduje na produkty oxyluciferin a energii ve formě světla. Příklad bioluminiscence světlušky je uveden v následující reakci (de Wet *et al.*, 1987):



K vývoji EpRE-LUX byly použity buněčné linie HepG2 (buněčná linie lidského hepatoblastomu) a Hepa-1c1c7 (buněčná linie myšního hepatomu). Nové linie byly sestaveny na základě EpRE sekvencí lidského enzymu NAD(P)H:chinon oxidoreduktázy pro EpRE(hNQO1)-LUX a myší glutathion *S*-transferázy Ya pro EpRE(mGST-Ya)-LUX.

Pro EpRE je důležitá tzv. core sekvence nukleotidů, RTGAC_nnnGC, na kterou navazují další nukleotidy, díky nimž byly definovány konsenzuální EpRE sekvence Wassermanem a Fahlem. Buněčné linie se v core sekvenci od sebe navzájem liší, a to tak, že regulační oblast lidské NQO1 obsahuje pouze jednu EpRE core sekvenci a regulační oblast myši GST-Ya má i druhou, core podobnou sekvenci. Dále se tyto dvě linie liší nukleotidy lemujícími core sekvence, které ovlivňují úroveň aktivace transkripce. Tyto sekvence jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Srovnání myšního GST-Ya a lidského NQO1 EpRE elementu se sekvencemi EpRE core a konsenzuálními sekvencemi.

EpRE element	Nukleotidová sekvence			
Core	RTGAC_nnnGC			
Konsenzus			TMA	nn RTGAYnnnGCR www
GST-Ya, myš	GTAGCT	TGG	AAATGACATTGC	TAA TGGT GACAAAGCAACTT TA
NQO1, lidská		AG	TCA	CAGTGACTCAGCAGAATC

Legenda: tučné: charakteristické sekvenční znaky; orámované: tzv. TMA box; M: A nebo C; R: A nebo G; Y: C nebo T; w: A nebo T; n: jakýkoliv nukleotid.

Při vývoji EpRE-LUX systému nejdříve probíhala konstrukce EpRE-kontrolovaných luciferázových reportérových plazmidů za použití vektoru pSP72. Do dvou oblastí, *EcoRI* a *BamHI*, mnohočetného klonovacího místa tohoto vektoru byl klonován oligonukleotid obsahující TATA box a iniciační element (Inr). Následovalo štěpení enzymy *HindIII* a *BglII* za vzniku fragmentu obsahujícího TATA/Inr sekvenci, který byl následně subklonován do pGL3-basic plazmidu s reportérovým luciferázovým genem bez promotoru (*Luc+*). Následně byly do plazmidu vloženy oligonukleotidy s EpRE zesilovačem regulačního regionu lidského enzymu NQO1 a myšního enzymu GST-Ya za vzniku reportérových konstruktů pTI(hNQO1-EpRE)Luc+ a pTI(mGST-Ya-EpRE)Luc+, kterými byly kotransfekovány buňky linií HepG2 a Hepa-1c1c7, spolu s vektorem pSV2-*neo*, díky kterému získaly rezistenci k antibiotiku geneticinu (G418). Klonální buněčné linie stabilně transfekované pTI(hNQO1-EpRE)Luc+ nebo pTI(mGST-Ya-EpRE)Luc+ byly označeny EpRE(hNQO1)-LUX nebo EpRE(mGST-Ya)-LUX (Boerboom *et al.*, 2006).

3.2.5 HepG2-GFP

Lidská buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu (HepG2) je rozsáhle využívána jako experimentální model pro toxikologický a farmakologický výzkum. Pro vývoj rychlých a jednoduchých cytotoxických testů byly HepG2 buňky obohaceny o „vylepšený“ zelený fluorescenční protein (enhanced green fluorescent protein, EGFP). Nová buněčná linie, označená HepG2-EGFP, tak dokáže exprimovat EGFP, který emituje fluorescenci. Při konstrukci této buněčné linie byl do buněk elektroporací transfekován plazmid pEGFP-N1 který byl mimo

jiné selektivním markerem pro rezistenci k antibiotiku G418. Úspěšně transfekované buňky byly selektovány pro měření fluorescence, a ty s nejlepšími výsledky, tedy s největší naměřenou fluorescencí, byly vybrány pro základ nové buněčné linie HepG2-GFP (Cemazar *et al.*, 2009).

3.3 FRAKCIONACE ŘÍZENÁ BIOLOGICKOU AKTIVITOU

Frakcionace, tedy dělení na frakce, je proces, jímž dochází k rozdělení analytů do skupin na základě fyzikálních (velikost a rozpustnost) a chemických (vaznost a reaktivita) vlastností. Rozdělení na jednotlivé frakce je dosaženo vlastnostmi mobilní fáze, například koncentrací solí či pH, a dále typem sorbentů, například reverzní či normální fází (Issaq *et al.*, 2002).

Velmi využívanou technikou je extrakce pevnou fází, SPE (z anglického solid phase extraction), která selektivně zachycuje požadované složky na tuhém sorbentu v extrakční kolonce díky mezimolekulovým interakcím, a to buď nepolárním, polárním nebo iontovým. Selektivita sorbentu je určena rozdílnou afinitou pevné fáze k analyzované látce a interferujícími sloučeninám ve vzorku. Sorbenty SPE kolonek obsahují nejčastěji částice silikagelu, které jsou chemicky modifikované navázáním skupin různých vlastností. Na základě vlastností sorbentu jsou uplatňovány různé interakce, z nichž nejběžnější jsou van der Waalsovy síly u nepolárních interakcí, vodíkové vazby a interakce dipól-dipól u polárních interakcí a dále kation-aniontové interakce. Nepolární fáze se vyznačují hydrofobními vlastnostmi, extrahují nepolární a středně polární sloučeniny a příkladem je oktadecyl (C18). Polární fáze jsou selektivní pro sloučeniny polární a příkladem je silanol (silica). Iontově výměnné fáze lze rozlišit na anex pro výměnu aniontů a katex pro výměnu kationtů. Příkladem je trimethylamoniumpropyl (SAX) pro anex a benzensulfonová kyselina (SCX) pro katex.

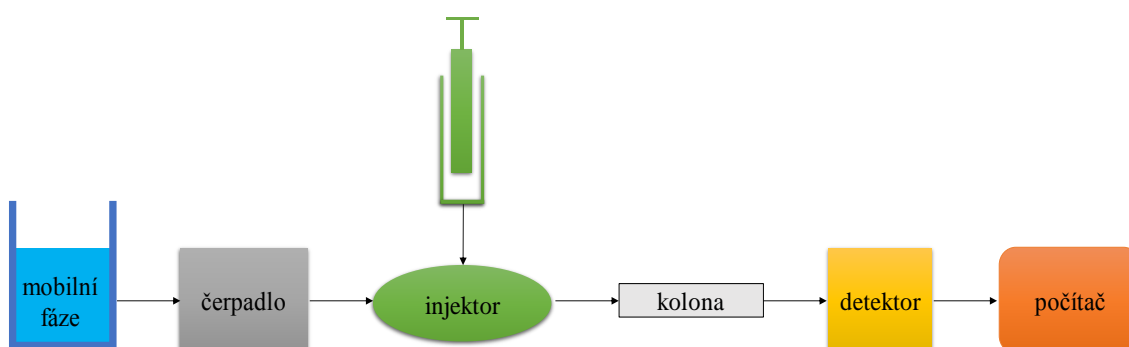
Při frakcionaci je nutno extrakční kolonky nejdříve solvatovat, tedy smáčet fáze vázané na silikagelu pro zadržení analytu. Na takto připravené kolonky je aplikován kapalný vzorek, čímž na sorbentu dojde k zachycení látky. Průběžným promýváním jsou odstraňovány nežádoucí příměsi. Požadované látky jsou nakonec získány elučním rozpouštědlem. Průtok kapalin přes kolonku je urychlován vakuem, tlakem či centrifugací (Klouda, 2003).

3.4 HPLC (UHPLC)

Kapalinová chromatografie (LC, z anglického liquid chromatography) je analytická metoda používaná pro separaci, identifikaci, kvantifikaci a purifikaci složek směsí. Využití nachází pro analýzu polárních, semipolárních a nepolárních látek (Coskun, 2016). O separaci rozhodují interakce mezi kapalnou mobilní fází a fází stacionární. Mechanismy separace mohou být adsorpce, rozdělování na základě rozpustnosti, iontová výměna či molekulově síťový efekt. Dle uspořádání stacionární fáze je kapalinová chromatografie dělena na papírovou, tenkovrstvou a kolonovou. Právě kolonová chromatografie dala vznik HPLC, tedy vysokoúčinné kapalinové chromatografii (z anglického high performance liquid chromatography) a UHPLC, tedy ultra

vysokoučinné kapalinové chromatografii (z anglického ultra high performance liquid chromatography), které v současnosti patří mezi nejpoužívanější (Klouda, 2003).

Kapalinový chromatograf má několik základních částí, jimiž jsou zásobník mobilní fáze, čerpadlo, injektor, kolona se stacionární fází a detektor. Schéma přístroje je znázorněno na Obrázku 9. Mobilní fáze je inertní vůči vzorku a slouží k jeho transportu do systému. Nejčastěji jsou používána rozpouštědla nebo kombinace pufrů. Do průtoku mobilní fáze zajištěného čerpadlem je pomocí injektorů vstříknut vzorek. Ten spolu s mobilní fází proudí do kolony, která je umístěna v prostředí s konstantní teplotou. Výsledek separace zaznamenává detektor, ze kterého jsou sbírána data speciálním softwarem. Nejpoužívanější detektory jsou fotometrické, které měří absorpenci eluátu, refraktometrické, jež měří rozdíl indexu lomu eluátu a čisté mobilní fáze, a dále fluorescenční, které měří fluorescenci eluátu (Arora *et Bhanot*, 2014).



Obrázek 9: Schéma základního uspořádání kapalinového chromatografu (upraveno podle Arora *et Bhanot*, 2014).

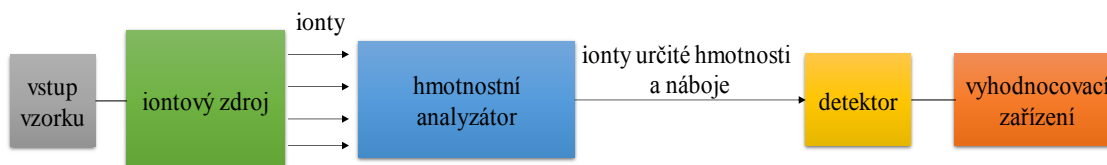
Pro separaci látek je u HPLC nejdůležitější částí stacionární fáze. Na základě různých typů analýz a mechanismů separace existují i různé typy stacionárních fází. I mobilní fáze však musí splňovat určité vlastnosti. Bývá složena z vody, organického rozpouštědla nebo pufrů a mohou v ní být obsaženy i modifikátory. Na základě interakcí vzorku, mobilní a stacionární fáze se rozlišují dva typy HPLC, a to reverzní a normální.

Při reverzní HPLC separaci jsou jako stacionární fáze použity nepolární alkylové uhlovodíky jako C8 (oktan) nebo C18 (oktadekan). Mobilní fáze je polární a nejčastěji jí bývá voda s polárními rozpouštědly jako metanol, acetonitril či tetrahydrofuran, v závislosti na typu separace. Eluční profil je od polárních látek, přes látky méně polární až po ty nepolární. Normální HPLC separace je vlastně opakem reverzní. Stacionární fáze je polární a tvoří ji buď pouze silikagel nebo jsou na něj vázané organické sloučeniny. Nepolární mobilní fázi tvoří například hexan, heptan nebo izooktan, ale i jiné sloučeniny s malým množstvím polárních modifikátorů jako metanol, etanol či izopropanol. Eluční profil začíná látkami nepolárními a končí u látek polárních (Arora *et Bhanot*, 2014).

3.5 LC-MS METABOLOMIKA

Metabolomika se zabývá analýzou metabolitů s nízkou molekulovou hmotností (do 1 800 Da), které definují metabolický stav biologických systémů. Metabolomická analýza je kategorizována na cílenou a necílenou. Necílená analýza bývá prvním krokem metabolomické studie, jelikož jsou měřeny všechny metabolity biologického systému. Touto analýzou jsou vyhledány metabolity potenciální, jež jsou předmětem studie. Tyto metabolity jsou poté cílenou analýzou identifikovány a kvantifikovány. U cílené analýzy jsou již známy chemické vlastnosti sledovaných sloučenin a lze ji tedy navrhnout dle potřeb.

Proces typické metabolomické studie využívá LC-MS platformy, tedy spojení kapalinové chromatografie, která je popsána výše, a hmotnostní spektrometrie (Zhou *et al.*, 2012). Hmotnostní spektrometr disponuje třemi hlavními částmi, jimiž jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Schéma přístroje je na Obrázku 10. Iontový zdroj konvertuje molekuly ze vzorku na ionty, které jsou vtaženy pomocí napětí do hmotnostního analyzátoru. Ten ionty separuje v plynné fázi podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) za vysokého vakua (10^{-5} Pa), a tyto signály následně zachycuje detektor, který je předá vyhodnocovacímu zařízení (Manz *et al.*, 2004).



Obrázek 10: Schéma hmotnostního spektrometru (upraveno podle Klouda, 2003).

3.5.1 TYPY IONIZACE

Využití různých ionizačních technik je důležité z hlediska toho, že jednotlivé látky se liší svými vlastnostmi, například těkavostí, polaritou či molekulovou hmotností. Tyto techniky lze dle množství vnitřní energie po ionizaci rozdělit na měkké, při kterých nedochází ke vzniku fragmentů, a tvrdé, při nichž má molekula velký přebytek vnitřní energie a k fragmentaci dochází. K měkkým ionizačním technikám řadíme chemickou ionizaci, CI (z anglického chemical ionisation), ionizaci elektrosprejem, ESI (z anglického electrospray ionisation), a ionizaci laserem za účasti matrice, MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionisation). K tvrdým ionizačním technikám se řadí elektronová ionizace, EI (z anglického electron ionisation) a bombardování rychlými atomy, FAB (z anglického fast atom bombardment) (Manz *et al.*, 2004).

3.5.2 TYPY HMOTNOSTNÍCH ANALYZÁTORŮ

Separace iontů lze dosáhnout různými fyzikálními principy, například zakřivením dráhy letu iontů (magnetické a elektrostatické analyzátor), různou stabilitou oscilací iontů (kvadrupól a iontová past), různou dobou rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu) nebo různou absorpcí

energie při pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová rezonance).

Kvadrupólový analyzátor, Q (z anglického quadrupole), je složen ze čtyř kovových tyčových elektrod, na které je aplikováno stejnosměrný a střídavý proud. V daném poli mohou kvadrupólem až k detektoru procházet pouze rezonanční ionty jednoho určitého poměru m/z , ostatní ionty nerezonují a jsou zastaveny v kvadrupólu.

Analyzátor doby letu, TOF (z anglického time of flight), umožňuje vysoké rozlišení a přesné stanovení hmotnosti. Ionty jsou urychlovány laserovým pulzem v elektrickém poli. Poté vstupují do letové trubice, která již žádné elektrické pole nemá, a ionty se v ní pohybují různou rychlostí, v závislosti na jejich poměru m/z , dokud nenarazí na detektor na jejím konci (Manz *et al.*, 2004).

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací, FT-ICR (z anglického Fourier transform ion cyclotron resonance), je nejpokročilejší hmotnostní analýzou díky vysoké přesnosti a rozlišovací schopnosti. Využívá cyklotronovou frekvenci v pevném magnetickém poli pro stanovení poměru m/z . Uplatňuje se zejména u metabolomických studií složitých směsí (Ghaste *et al.*, 2016).

3.5.3 TYPY DETEKTORŮ

Pomocí detektorů jsou proudy dopadajících iontů převedeny na proud elektronů. Příkladem je Faradayova miska (z anglického Faraday cup), kterou tvoří konverzní elektroda (dynoda) miskovitého tvaru, ze které je po dopadu iontu vyražen elektron, jež dopadne na anodu a vzniká elektrický proud. Dalším příkladem jsou elektronové násobiče, které obsahují i další elektrody, jež zesilují elektronový proud 10^4 – 10^8 krát. Tento typ detektoru je velmi citlivý, jeho životnost je však poměrně malá. Posledním příkladem je detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem, kde vyražený elektron dopadá na fosforescenční stínítko a vyráží foton, jež je zachycen fotonásobičem (Klouta, 2003).

3.6 ROSTLINNÉ ZDROJE

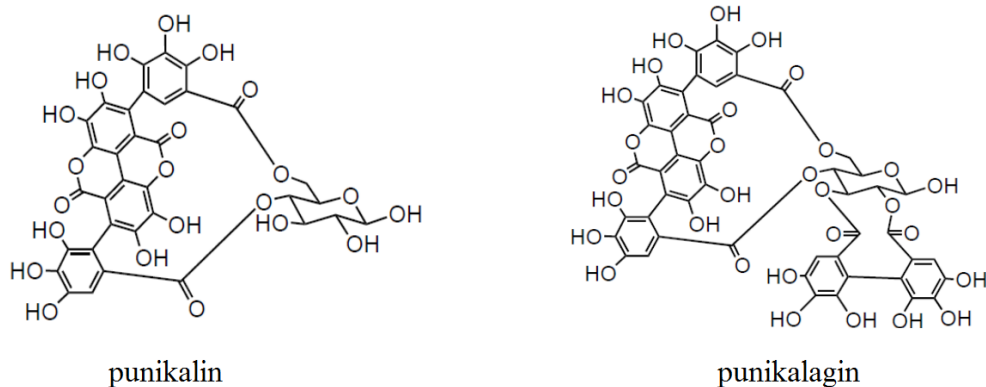
3.6.1 MARHANÍK OBECNÝ

Punica granatum L., česky marhaník obecný, je rostlina patřící do čeledi *Punicaceae* (marhaníkovité). Dorůstá do výšky až devíti metrů, její listy jsou úzké a dlouhé a květy mají jasně červenou, oranžovou nebo růžovou barvu. Plod je vyobrazen na Obrázku 11 a je jím granátové jablko oblého hexagonálního tvaru. Různé části rostliny mají rozličné chemické složení a vykazují pozitivní účinky na zdraví. Jedná se o prevenci či doplněk k léčbě různých rizikových faktorů onemocnění jako vysoký krevní tlak, vysoká hladina cholesterolu, hyperglykémie a záněty či oxidační stres.



Obrázek 11: Vzhled granátového jablka, plodu marhaníku obecného (*Punica granatum* L.) (převzato z <https://www.csbe.org/pomegranate-punica-granatum>).

Hlavními komponenty s preventivním účinkem proti různým typům rakoviny jsou polyfenoly obsažené hlavně ve šťávě a kůře, které působí snížením oxidačního stresu a volných radikálů a brání peroxidaci lipidů. Nejvýznamnějšími polyfenoly jsou taniny a flavonoidy. Příkladem taninů je punikalagin, punikalin a ellagotanin, který může být štěpen na kyselinu ellagovou. Flavonoidy granátového jablka zahrnují anthokyaniny, které způsobují jeho typické zbarvení, flavan-3-oly a flavonoly. Vybrané aktivní látky jsou na Obrázku 12. V semenech granátového jablka je obsažen hlavně olej. Z velké části jej tvoří kyselina puniková, která společně s polyfenoly fermentované šťávy může inhibovat proliferaci buněk karcinomu prostaty (Zarfeshany *et al.*, 2014).



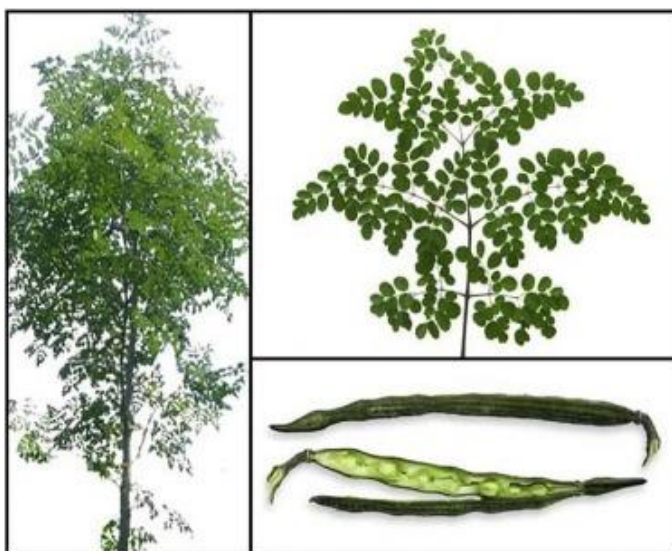
Obrázek 12: Chemické struktury vybraných aktivních látek granátového jablka (upraveno podle Mena *et al.*, 2012).

3.6.2 MORINGA OLEJODÁRNÁ

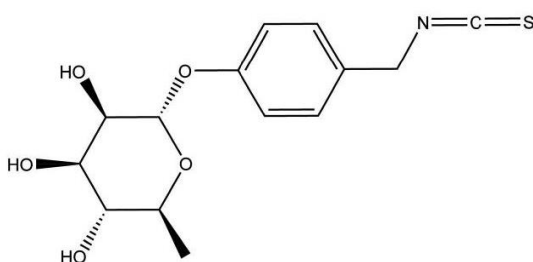
Moringa oleifera L., patřící do čeledi *Moringaceae* (moringovité), je strom dosahující výšky 5–10 m, který dobře roste ve vlhkých tropech nebo horkých a suchých místech; vyobrazen je na Obrázku 13. Původní výskyt má v subhimalájském regionu severozápadní Indie, dnes je však rozšířena i do Afriky, Arábie či Ameriky. Mnoho zemí ji používá ve své kuchyni jako běžnou zeleninu, avšak v tradiční medicíně má kromě výživové hodnoty i několik léčivých účinků. Tyto účinky mohou být například protizánětlivé, protinádorové a antioxidační

(Razis *et al.*, 2014). Antioxidační roli zde sehrávají flavonoidy, kyselina askorbová, karotenoidy a fenoly.

Moringa je bohatá na sloučeniny obsahující jednoduché cukry a rhamnózu, které spadají do poměrně jedinečné skupiny modifikovaných glukosinolátů. Tyto látky vykazují chemopreventivní aktivitu indukci apoptózy (Razis *et al.*, 2014). V rostlině jsou přítomny i isothiokyanáty sulforafan a moringin. Sulforafan je považován za ideální chemopreventivní činidlo a mimo jiné dokáže aktivovat Nrf2-dependentní dráhu. Moringin, jehož struktura je na Obrázku 14, se v tradiční medicíně vyznačuje svými protizánětlivými a protinádorovými vlastnostmi, navíc dokáže indukovat apoptózu maligních buněk. Další významné látky s antioxidační aktivitou se nachází v listech a jedná se o kyselinu askorbovou, flavonoidy, fenolické látky a karotenoidy (Anwar *et al.*, 2007; Michl *et al.*, 2016).



Obrázek 13: Moringa olejodárná – vzhled stromu (vlevo), listů (vpravo nahoře) a semen (vpravo dole) (převzato z Tiloke *et al.*, 2018).



Obrázek 14: Chemická struktura moringinu (převzato z Michl *et al.*, 2016).

3.6.3 MYRCIARIA DUBIA

Myrciaria dubia, rostlina z čeledi *Myrtaceae* (myrtovité), jinak známá také jako camu camu, je nízký keř dosahující výšky 1–3 m rostoucí v bažinatých či zatopených oblastech. Plody

vyobrazené na Obrázku 15 jsou kulaté a jejich dužina, která obklopuje čtyři semena, obsahuje velké množství kyselin. Z tohoto důvodu jsou plody konzumovány ve formě džusů či prášku. Jak dužina, tak semena i slupka obsahují látky s antioxidační aktivitou. Mezi bioaktivní látky obsažené v camu camu patří polyfenoly jako flavonoidy, fenolické kyseliny, taniny, stilbeny a lignany (Langley *et al.*, 2015).

Při studiu antioxidační kapacity bylo zjištěno, že největší příspěvek mají látky obsahující kyselinu askorbovou, méně již přispívaly fenolické látky. Přítomnost polyfenolů jako jsou ellagotaniny, kyselina ellagová nebo flavan-3-ol vykazují podobnost s granátovým jablkem (Chirinos *et al.*, 2010).



Obrázek 15: Rostlina *Myrciaria dubia*, jinak zvaná jako camu camu, a její plody (převzato z <https://www.acai.eu/items/camu-camu.aspx>).

3.6.4 KUSTOVNICE ČÍNSKÁ

Lycium chinense, česky kustovnice čínská, jinak zvaná goji, je rostlina z čeledi *Solanaceae* (lilkovité). Dorůstá maximálně do tří metrů, plody mají jasnou červenou barvu, elipsoidní tvar a jsou 1–2 cm velké (Donno *et al.*, 2015).

Plody kustovnice jsou v tradiční medicíně využívány jako tonikum s hypotenzní, hypoglykemickou a antipyretickou aktivitou. Nejznámější je však pro své antihepatotoxické, protinádorové a antioxidační vlastnosti (Chin *et al.*, 2003). Významnými látkami podílejícími se na těchto vlastnostech jsou betain, cerebrosidy, některé glykolipidy a polysacharidy, a také rutin a kyselina chlorogenová. Konkrétnější studie aktivních látek obsažených v kustovnici zatím stále probíhají (Donno *et al.*, 2015).



Obrázek 16: Rostlina kustovnice čínská (*Lycium chinense*) a její plody (převzato z <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2017/3145946/fig1/>).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Při buněčném testování byla použita adherentní buněčné linie EpRE-LUX odvozená od myšího elektrofilního responzivního elementu a HepG2-GFP odvozená od lidského hepatocelulárního karcinomu.

Buněčná linie EpRE-LUX byla kultivovaná v plastových kultivačních lahvích v kultivačním médiu EMEM obohaceném z 1 % směsí antibiotik penicilinem a streptomycinem, z 1 % glutaminem a z 10 % fetálním sérem. Jednou týdně bylo k buňkám přidáno antibiotikum geneticin G-418 (50 mg·ml⁻¹). Kultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂.

Buněčná linie HepG2-GFP byla kultivována v plastových kultivačních lahvích v kultivačním médiu RPMI 1640 obohaceném z 1 % směsí antibiotik penicilinem a streptomycinem, z 1 % glutaminem a z 15 % fetálním sérem. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂.

Rostlinný materiál použitý pro tvorbu extraktů a testování na buněčných liniích:

- Camu camu (*Myrciaria dubia*), BIO prášek (Zdravý den)
- Granátové jablko (*Punica granatum*), čerstvý plod
- Kustovnice čínská (*Lycium chinense*), sušené plody
- Moringa olejodárná (*Moringa oleifera*), BIO prášek z listů (Zdravý den)

4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOKY

Použité chemikálie:

- 1,4-dithiotreitol (DTT) (Duchefa)
- 3-(3 cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonát (CHAPS) (Sigma-Aldrich)
- 4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES) (Sigma-Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)
- Dimetylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Sigma-Aldrich)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA) (Sigma-Aldrich)
- Geneticin (G-418) (Sigma-Aldrich)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich)
- Hydrát disodné soli adenosin 5'-trifosfátu (Sigma-Aldrich)

- Hydrogenuhlíčitán sodný (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid amonný (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)
- Chlorid draselný (Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich)
- Kyselina lipoová (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich)
- Luciferin, $M_w = 280,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich)
- Metanol (extrakční) (VWR International)
- Metanol ($\geq 99,9\%$) (LiChrosolv)
- Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) s vysokým obsahem glukózy (Sigma-Aldrich)
- Monohdrát kyseliny trans-1,2-diaminocyklohexan-N,N,N',N'-tetraoctové 98 % (DCTA) (Sigma-Aldrich)
- N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin $\geq 99\%$ (Tricin)(Sigma-Aldrich)
- Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)
- Pentahdrát uhličitanu hořečnatého (Sigma-Aldrich)
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma-Aldrich)
- Tekutý dusík (Linde)
- Trypsin (Sigma-Aldrich)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich)

Použité roztoky a jejich příprava:

- **9,4 mmol·l⁻¹ luciferin:** 5 mg luciferinu smíchat s 1,8975 ml DMSO.
- **10x PBS pufr:** 80 g NaCl; 2 g KCl; 2 g KH₂PO₄ a 23,1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O rozpustit v 1 l destilované vody a sterilizovat v autoklávu.
- **Flash Mix (pH 7,8):** 35,8 mg tricinu; 5,2 mg (MgCO₃)₄ · Mg(OH)₂ · 5 H₂O; 13,48 mg MgSO₄ · 7 H₂O a 27,6 mg ATP rozpustit v 10 ml destilované vody. Poté přidat 10 μl luciferinu, promíchat a upravit pH na 7,8 pomocí NaOH.
- **Kaspázový pufr (pH 7,4):** 10 mmol·l⁻¹ KCl; 5 mmol·l⁻¹ HEPES (pH 7,4); 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 1 mmol·l⁻¹ EGTA a 0,2% CHAPS smíchat s trochou destilované vody. Poté objem doplnit do 50 ml a upravit pH na 7,4 pomocí pevného NaOH.
- **Kultivační médium EMEM:** smíchat 440 ml základního média EMEM (high glucose), 50 ml fetálního séra, 5 ml směsi antibiotik (penicilin, streptomycin) a 5 ml glutaminu.

- **Kultivační médium EMEM s 1 % glutaminu:** 80 ml základního média EMEM smíchat s 0,8 ml glutaminu.
- **Kultivační médium RPMI-1640:** smíchat 500 ml základního média RPMI-1640; 90 ml fetálního séra; 6 ml 200 mmol·l⁻¹ L-glutaminu a 6 ml směsi antibiotik (penicilin-streptomycin).
- **Lyzační pufr (pH 7,8):** 12,1 mg Tris; 3,08 mg DTT a 7,3 mg DCTA rozpustit v 10 ml destilované vody a upravit pH na 7,8 pomocí HCl.
- **Trypsin:** 25 ml trypsinu rozpustit v 25 ml EDTA.
- **Základní EMEM médium:** připravenou sypkou směs M0643 (Sigma-Aldrich) rozpustit v 1 l destilované vody; přidat 2,2 g NaHCO₃ a rozpustit na magnetické míchačce. Poté přefiltrovat přes sterilní filtr.

4.3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ

- Analytické váhy Pioneer PA214C (Ohaus)
- Aspirační systém BVC control (Vacuubrand)
- CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo)
- Dusíková odparka TurboVap LV (Caliper LifeScience)
- Hlubokomrazicí box New Brunswick Innova (New Brunswick Scientific)
- Hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si (Waters)
- Inkubátor třepací PHMP (GRANT)
- Kávový mlýnek KM1310S (Tarrington House)
- Kulový oscilační mlýnek Verder MM 400 (Retsch)
- Laminární sterilní box Gelaire (Flow Laboratories)
- Lyofilizátor FreeZone 2,5 Liter (LABCONCO)
- Magnetická míchačka s ohřevem MSH-30D (Witeg)
- Mikrocentrifuga Centrifuge 5424 (Eppendorf)
- Mikrocentrifuga Micro Star 17 (VWR International)
- Mraznička podstolová F100 1101AA (Snaige)
- Multifunkční reader INFINITE M200 PRO (Tecan)
- pH-metr pHenomenal pH 1000 L (VWR)
- Pipetor Accu-Jet (Pro Brand)
- Sestava kapalinové chromatografie:
 - Detektor s diodovým polem Acquity Ultra Performance LC (Waters)
 - Kwartérní organizér rozpouštědla Acquity UPLC H Class (Waters)
 - Organizér vzorků FTN Acquity UPLC (Waters)
 - Reverzní kolona Acquity UPLC BEH C18 1,7μm (Waters)
- Světelný mikroskop TMS (Nikon)

- Systém na úpravu vody Simplicity 185 (Millipore)
- Třepačka Vortex V-1 plus (Biosan)
- Ultrazvuková lázeň USC100T (VWR International)
- UV lampa do systému na úpravu vody SIMPAK 1 (Millipore)
- UV sterilizátor CL-1000 (UVP)

Další standardní laboratorní příslušenství: automatická osmikanálová pipeta (Eppendorf), automatické jednonálové pipety (Hirschmann Labogerate), bílá 96 jamková mikrotitrační destička, Bürkerova komůrka, extrakční kolonky C18 Spe-ed SPE 500 mg (Applied Separations), extrakční kolonky MAX 150 mg (Oasis), extrakční kolonky MCX 150 mg (Oasis), kádinky, odměrné válce, parafilm, plastové 96 jamkové mikrotitrační destičky (TPP), plastové kultivační lahve na objem 15 ml (TPP), plastové mikrozkušavky (Eppendorf), plastové Petriho misky (TPP), plastové stojánky, plastové špičky (Eppendorf), plastové zkumavky s víčkem, skleněné dělené pipety, skleněné homogenizační kuličky, skleněné Pasteurovy pipety, skleněné zkumavky 12 x 75 mm (Fisherbrand), stříkačka, třecí miska s tloučkem

4.4 POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY KULTIVACE BUNĚK

Adherentní buněčná linie EpRE-LUX odvozená od myšího elektrofilního responzivního elementu a HepG2-GFP odvozená od lidského hepatocelulárního karcinomu byly kultivovány v kultivačních lahvích o objemu 15 ml (TPP) při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého. Jednou týdně bylo k buňkám přidáno 40 µl antibiotika geneticinu (G-418).

Buněčná kultura byla nejprve rozmrazena pod teplou vodou. Následně k ní bylo přidáno 5 ml kultivačního média, suspenze byla promíchána a odstředěna při 1 000 rpm po dobu 5 min. Po odstředění bylo médium odsáto a vyměněno za 5 ml čerstvého kultivačního média. Suspenze byla důkladně promíchána, přenesena do kultivační lahve a inkubována 48 hod. Poté vždy proběhla výměna starého média za nové, tzv. pasážování buněk:

1. Odsát veškeré staré kultivační médium z kultivační lahve s buňkami.
2. Poté k buňkám do kultivační lahve přidat 5 ml 1x PBS. Buňky pufrem promýt jemným nakláněním kultivační lahve a poté pufr odsát.
3. K promytým buňkám do kultivační lahve přidat 2 ml trypsinu pro uvolnění ze dna kultivační lahve. Buňky trypsinem promýt jemným nakláněním lahve a poté inkubovat 2–3 min při 37 °C v inkubátoru. Po inkubaci zkontrolovat pod světelným mikroskopem, zda byly buňky uvolněny.
4. Po uvolnění buněk trypsin zneutralizovat přidáním 8 ml čerstvého kultivačního média a suspenzi promíchat. Po promíchání v kultivační lahvi ponechat pouze určitý podíl

buněk (dle potřeby 10–40 %). Ten doplnit čerstvým kultivačním médiem do celkového objemu 15 ml (zbylou buněčnou suspenzi použít pro buněčné testování).

5. Kultivační lahev s buňkami s čerstvým médiem inkubovat při 37 °C v inkubátoru 48–72 hod, poté pasážování opakovat.

EXTRAKCE

1. Rostlinu nejprve rozdělit na jednotlivé části (dřeň, semena). Oddělenou rostlinnou část vložit do kádinky a po dobu 1 hod vymrazit v hlubokomrazícím boxu na –80 °C.
2. Po vymrazení kádinku s rostlinnou částí utěsnit parafilmem, který následně proděravět špendlíkem. Takto utěsněnou kádinku se vzorkem vložit do lyofilizátoru a přes noc lyofilizovat.
3. Po ukončení lyofilizace suchý rostlinný materiál zhomogenizovat (mlýnek, třecí miska) a po homogenizaci navážit 30 mg od každého vzorku.
4. Navážený vzorek extrahovat se skleněnými nebo kovovými kuličkami v 1 ml metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí na kulovém mlýnku po dobu 5 min při frekvenci 27 Hz.
5. Po extrakci plastovou mikrozkušavku se vzorkem vložit na 10 min do ultrazvukové lázně a následně odstředit na 15 000 rpm po dobu 10 min.
6. Po odstředění vzniklý supernatant odebrat do čisté plastové mikrozkušavky a odpařit v dusíkové odparce.
7. Odparek rozpustit ve 150 µl DMSO (tím je dosaženo koncentrace 200 mg·ml⁻¹).
8. Takto připravené extrakty uchovávat v hlubokomrazícím boxu při –80 °C.

FRAKCIONACE

Pro SPE (solid phase extraction) frakcionaci byly vzorky připraveny extrakcí 30 mg suché váhy v 1 ml metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí, odpařeny pod dusíkem a rozpuštěny v 1 ml rozpouštědla potřebného pro daný typ frakcionace.

Frakcionace na reverzní fázi (C18; 500 mg):

1. Vymýt nečistoty aplikací 10 ml metanolu na extrakční kolonku.
2. Po promytí extrakční kolonku kondicionovat 2 ml metanolu a následně ekvilibrovat 2 ml redestiované vody.
3. Na extrakční kolonku nanést 2x 1 ml vzorku v 0,1% kyselině mravenčí ve vodě.
4. Po aplikaci vzorku promýt kolonku 2 ml 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a jímat do zkumavky. Tímto krokem je získána frakce C0.
5. Postupně eluovat další frakce přidáváním metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí, vše jímat do zkumavek. Ředění metanolu je uvedeno v Tabulce 3.
 - a. Přidat 3 ml 10% metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí pro získání frakce C1.
 - b. Přidat 3 ml 20% metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí pro získání frakce C2.

- c. Přidat 3 ml 30% metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí pro získání frakce C3.
- d. Přidat 3 ml 50% metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí pro získání frakce C5.
- e. Přidat 3 ml 60% metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí pro získání frakce C6.
- f. Přidat 3 ml 70% metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí pro získání frakce C7.
- g. Přidat 3 ml 100% metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí pro získání frakce C10.

Tabulka 3: Ředění metanolu pro přípravu 4 ml roztoku od každé koncentrace.

Koncentrace roztoku	Objem metanolu [ml]	Objem 0,1% HCOOH [ml]
10 %	0,4	3,6
20 %	0,8	3,2
30 %	1,2	2,8
50 %	2,0	2,0
60 %	2,4	1,6
70 %	2,8	1,2
100 %	4,0	0,0

Frakcionace na ANEXU (MAX; 150 mg):

1. Vymýt nečistoty aplikací 10 ml metanolu na extrakční kolonku.
2. Po promytí extrakční kolonku kondicionovat 6 ml metanolu a následně ekvilibrovat 6 ml redestiované vody a 6 ml 5% hydroxidu amonného ve vodě.
3. Na extrakční kolonku nanést 1 ml vzorku v 5% hydroxidu amonném ve vodě.
4. Po aplikaci vzorku promýt kolonku 5 ml 5% hydroxidu amonného ve vodě a jimat do zkumavky. Tímto krokem je získána frakce A0.
5. Postupně eluovat další frakce přidáváním metanolu, vše jimat do zkumavek:
 - a. Přidat 4 ml metanolu pro získání frakce A1.
 - b. Přidat 4 ml metanolu s 2% kyselinou mravenčí v metanolu pro získání frakce A2.

Frakcionace na KATEXU (MCX; 150 mg):

1. Vymýt nečistoty aplikací 10 ml metanolu na extrakční kolonku.
2. Po promytí extrakční kolonku kondicionovat 6 ml metanolu a následně ekvilibrovat 6 ml redestiované vody a 6 ml 2% kyseliny mravenčí ve vodě.
3. Na extrakční kolonku nanést 1 ml vzorku v 2% kyselině mravenčí ve vodě.
4. Po aplikaci vzorku promýt kolonku 5 ml 2% kyseliny mravenčí ve vodě a jimat do zkumavky. Tímto krokem je získána frakce K0.
5. Postupně eluovat další frakce přidáváním metanolu, vše jimat do zkumavek:
 - a. Přidat 4 ml metanolu pro získání frakce K1.
 - b. Přidat 4 ml metanolu s 5% hydroxidem amonným v metanolu pro získání frakce K2.

Po frakcionaci vzorky odpařit na dusíkové odparce a rozpustit ve 100 μ l DMSO pro buněčné testování nebo ve 100 μ l 80% metanolu pro buněčné testování a necílenou analýzu.

STANOVENÍ AKTIVACE Nrf2

Buněčné testování linií EpRE-LUX a HepG2-GFP probíhalo formou třídenního experimentu. První den probíhalo vysazování buněk do mikrotitrační destičky, druhý den byly k buňkám přidány testované látky a třetí den probíhalo měření luciferázové aktivity pro buněčnou linii EpRE-LUX a fluorescence pro buněčnou linii HepG2-GFP. První dva dny probíhal experiment ve sterilních podmínkách, třetí den již v nesterilních.

První den (sterilně):

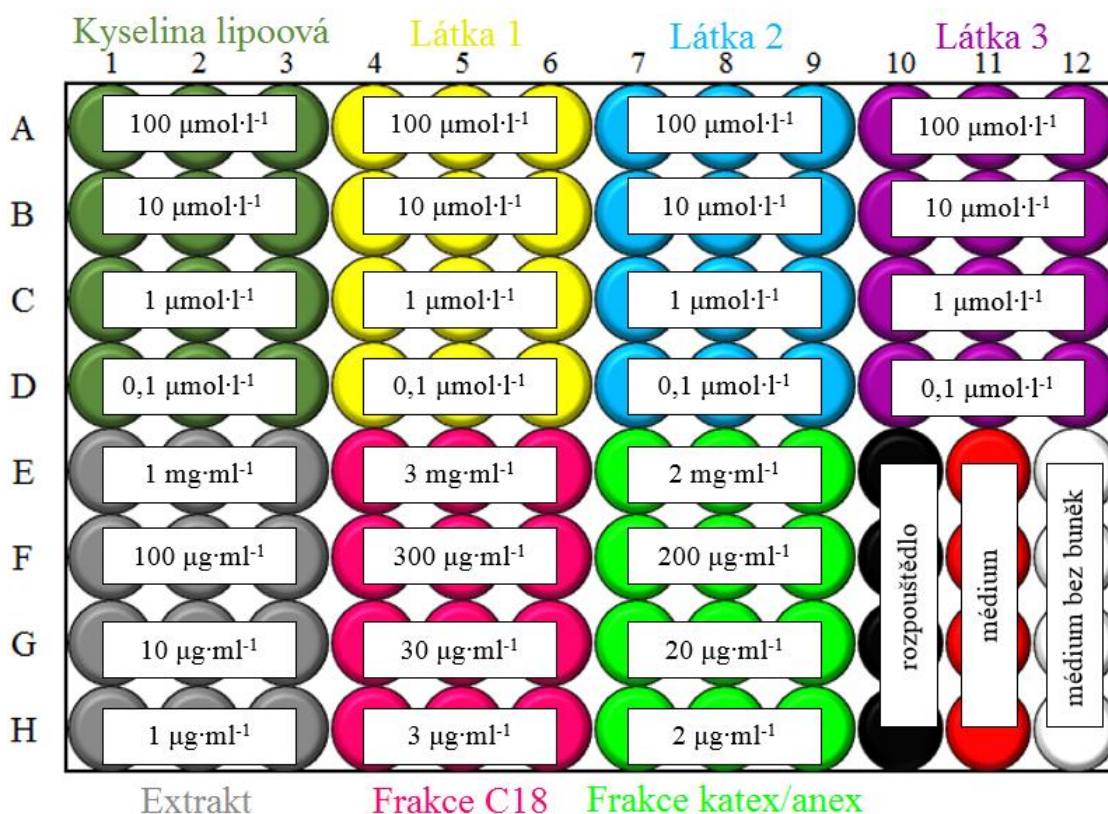
1. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky vysadit buňky tak, aby objem suspenze v jedné jamce činil 150 μ l a počet buněk v jedné jamce činil 20 000. Do jamek E12, F12, G12 a H12 mikrotitrační destičky buňky nevysazovat; toto slouží jako jedna z kontrol experimentu.
 - a. Do Bürkerovy komůrky aplikovat 10 μ l dobře promíchané buněčné suspenze, která zbyla z pasážování buněk.
 - b. Pod světelným mikroskopem spočítat počet buněk v pěti polích Bürkerovy komůrky a z toho poté vypočítat průměrný počet buněk v jednom poli.
 - c. Vypočítat ředění buněčné suspenze, tedy objem buněčné suspenze a objem kultivačního média, tak, aby ve 150 μ l bylo obsaženo 20 000 buněk.
 - d. Do plastové Petriho misky přidat vypočítaný objem buněčné suspenze a vypočítaný objem kultivačního média a pipetou dobře promíchat. Poté aplikovat 150 μ l suspenze do jamek mikrotitrační destičky, kromě čtyř jamek, které zůstávají bez buněk.
2. Po vysazení mikrotitrační destičku s buňkami inkubovat 24 hod při 37 °C v inkubátoru.

Druhý den (sterilně):

1. Pasteurovou pipetou odsát staré médium ze všech jamek mikrotitrační destičky. Mikrotitrační destičku lehce naklonit tak, aby bylo možné staré kultivační médium odstát ze stěny jamek, aby nedošlo k poškození buněk.
2. Do každé jamky k buňkám přidat určitou koncentraci testovaných extraktů a látek tak, aby celkový objem v jedné jamce činil 150 μ l. Jednotlivé koncentrace a jejich rozložení na mikrotitrační destičce je vyobrazeno na Obrázku 17.
 - a. Od každého extraktu a látky připravit čtyři koncentrace, extrakty a látky ředit v čistém kultivačním médiu s 1% obsahem glutaminu.
 - b. Naředěné extrakty a látky přidat k buňkám tak, aby byla každá koncentrace zastoupena ve třech opakováních.

c. Do jamek mikrotitrační destičky aplikovat i kontrolní roztoky, tedy kultivační médium s rozpouštědlem, ve kterém byly rozpuštěny extrakty (koncentrace rozpouštědla je stejná jako nejvyšší koncentrace extraktu), dále čisté kultivační médium přidané k buňkám a čisté kultivační médium přidané do jamek, kde žádné buňky vysazeny nebyly.

3. Po aplikování všech vzorků k buňkám inkubovat 24 hod při 37 °C v inkubátoru.



Obrázek 17: Rozložení na 96 jamkové destičce při buněčném testování.

Třetí den (nesterilně):

1. Ze všech jamek v mikrotitrační destičce odsát staré médium s testovanými extrakty, látkami a kontrolami.
2. Po odsátí do každé jamky přidat 100 μl 1x PBS pufru, poté vložit mikrotitrační destičku na 2 min do třepacího inkubátoru vyhřátého na 37 °C. Po inkubaci pufr odsát.
3. Následně do každé jamky přidat 50 μl čerstvého lyzačního pufru, jehož složení je uvedeno v Tabulce 4. Po přidání vložit mikrotitrační destičku na 15 min do lednice a poté alespoň na 2 hod do hlubokomrazícího boxu na -80 °C.
4. Po zmrazení vložit mikrotitrační destičku do třepacího inkubátoru vyhřátého na 37 °C přibližně na 10 min, dokud nebude obsah jamek v mikrotitrační destičce úplně rozmrzlý. Po rozmrznutí světelným mikroskopem zkontrolovat, zda jsou buňky dostatečně zlyzované.

5. Poté obsah každé jamky mikrotitrační destičky přepipetovat do bílé 96 jamkové mikrotitrační destičky. Tento krok neprovádět u buněčné linie HepG2-GFP.
6. Do každé jamky následně přidat 100 μ l Flash Mixu pro buněčnou linii EpRE-LUX, jehož složení je uvedeno v Tabulce 5, nebo kaspázového pufru pro buněčnou linii HepG2-GFP, jehož složení je uvedeno v Tabulce 6. Poté začít okamžitě měřit luminiscenci u EpRE-LUX linie na multifunkčním readeru v časech 0 min, 2 min, 5 min a 15 min a zaznamenat výsledky měření. U buněčné linie HepG2-GFP provést jedno měření fluorescence.

Tabulka 4: Složení lyzačního pufru pro přípravu 10 ml roztoku.

Složení lyzačního pufru	na 10 ml
10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris	12,10 mg
2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT	3,08 mg
2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DCTA	7,30 mg

Tabulka 5: Složení Flash Mixu pro přípravu 10 ml roztoku.

Složení Flash Mixu	na 10 ml
20,000 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ tricin	35,80 mg
1,070 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,20 mg
2,670 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13,48 mg
5,000 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ATP	27,60 mg
0,094 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ luciferin	10,00 μ l ze zásobního roztoku (9,40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v DMSO)

Tabulka 6: Složení kaspázového pufru pro přípravu 50 ml roztoku.

Složení kaspázového pufru	na 50 ml
1,0 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl	500 μ l
0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES (pH 7,4)	500 μ l
0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA	100 μ l
0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA	100 μ l
0,2% CHAPS	0,1 g

UHPLC-MS/MS

1. Extrakty nechat separovat na reverzní fázi s rozměrem kolony 150 x 2,1 mm.
2. Nastavit parametry přístroje:
 - a. Teplotu kolony nastavit na 30 °C.
 - b. Teplotu vzorků nastavit na 4 °C.
 - c. Jako nástřikový objem vzorku zvolit 5 μ l.
3. Pro separaci použít mobilní fáze $\geq 99,9\%$ acetonitril (A) a 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny mravenčí v deionizované vodě (B). Gradient složení mobilních fází je zaznamenán v Tabulce 7.

Tabulka 7: Gradient složení mobilních fází A (acetonitril) a B (5mmol·l⁻¹ kyselina mravenčí)

Čas (min)	Průtok (ml·min ⁻¹)	Obsah A (%)	Obsah B (%)
0,0	0,25	5	95
0,1	0,25	5	95
1,0	0,25	10	90
12,0	0,25	35	65
17,0	0,25	70	30
17,5	0,25	100	0
19,0	0,25	100	0
19,5	0,25	5	95
22,0	0,25	5	95

4. Detekci separovaných analytů provést na hmotnostním spektrometru s iontovým zdrojem ESI a analyzátory kvadrupólem a TOF v tandemovém uspořádání (QqTOF). Měření provádět v pozitivním i negativním módu.
5. Jako zmlžující plyn a plyn na vstupní šěrbině použít dusík, jako lockspray použít leucin-enkefalin (5 ng·μl⁻¹). Další parametry nastavení hmotnostního spektrometru jsou vypsány v Tabulce 8.
6. Sběr dat provádět v DDA (Data Dependent Acquisition) režimu a kolizní energii při MS/MS 20 eV.

Tabulka 8: Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru při detekci.

Parametr	Nastavení
Rozsah měřených hmotností	50–1500 Da
Kapilární napětí	2 kV
Teplota iontového zdroje	120 °C
Cone voltage	15 V
Desolvatační teplota	500 °C
Průtok cone gas	30 l·hod ⁻¹
Průtok desolvatačního plynu	600 l·hod ⁻¹

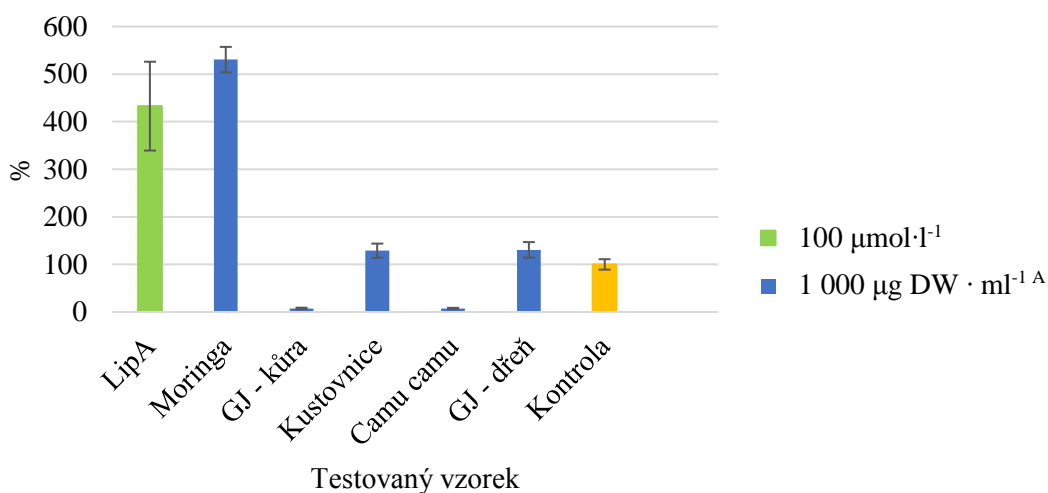
Data z měření byla zaznamenávána ve formátu centroid a celková doba analýzy jednoho vzorku byla 22 min.

5 VÝSLEDKY

V rámci mé bakalářské práce jsem se zabývala buněčným testováním, kterým jsem zjišťovala aktivaci dráhy transkripčního faktoru Nrf2 rostlinnými extrakty. Experiment jsem prováděla na dvou buněčných liniích a testovala jsem čtyři rostliny – marhaník obecný (*Punica granatum* L.), moringu olejodárnou (*Moringa oleifera*), kustovnici čínskou (*Lyceum chinense*) a camu camu (*Myrciaria dubia*). Z těchto rostlin jsem následně připravila pět extraktů;

dva z plodu marhaníku obecného (z dřene a z kůry granátového jablka) a po jednom extraktu z ostatních rostlin. Tyto extrakty jsem nejprve testovala na buněčné linii EpRE-LUX.

Při testování jsem jako pozitivní kontrolu použila kyselinu lipoovou, která dráhu Nrf2 aktivuje, a jako negativní kontrolu DMSO (0,5 %), jelikož v něm byly rozpuštěny extrakty. Výsledky měření jsem vyjádřila v procentech negativní kontroly. Z luciferázové aktivity, která je vyobrazena na Obrázku 18, lze určit, že neaktivnějším extraktem byl extrakt z moringy olejodárné, který vykazoval více jak pětkrát vyšší hodnoty ve srovnání s negativní kontrolou. Tento extrakt vykazoval ještě přibližně o 22 % vyšší aktivitu než samotná kyselina lipoová. Hodnoty aktivity extraktů kustovnice čínské a dřene granátového jablka byly ve srovnání s negativní kontrolou sice vyšší, ale pouze o 28 % u extraktu kustovnice čínské a o 30 % u extraktu dřene granátového jablka. Extrakty camu camu a kůry granátového jablka vykazovaly toxické účinky.



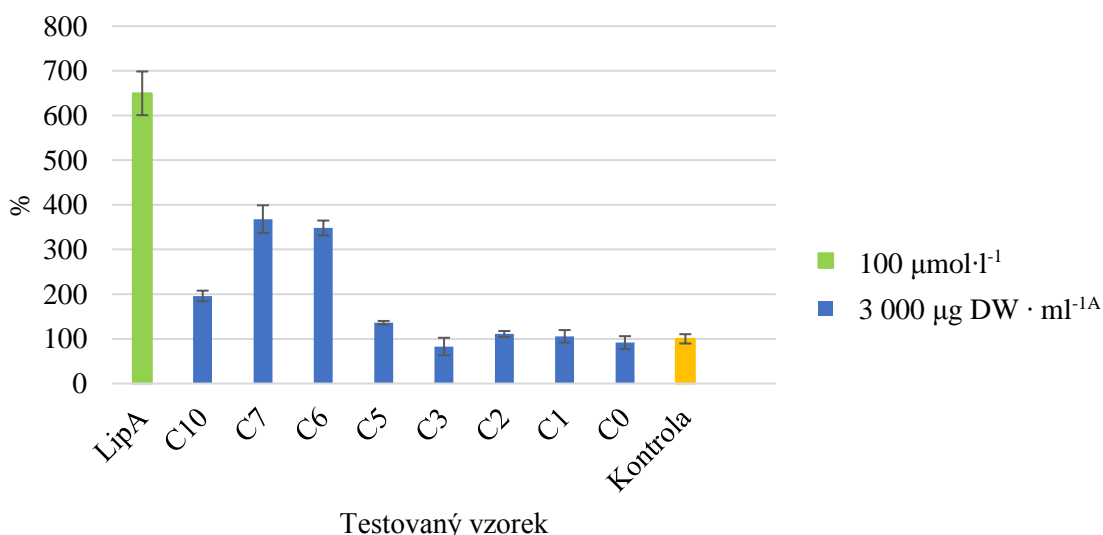
Obrázek 18: Grafické vyjádření luciferázové aktivity extraktů testovaných na buněčné linii EpRE-LUX vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n = 3).

^A DW= hmotnost suchého rostlinného materiálu

Z těchto výsledků jsem vyhodnotila extrakt moringy olejodárné jako nejzajímavější, a proto jsem jej použila pro frakcionaci, abych se pokusila stanovit, jaké aktivní látky byly v extraktu obsaženy. Rostlinu jsem frakcionovala na osm frakcí na reverzní fázi C18 a na šest frakcí pomocí iontoměničové chromatografie – tak vznikly tři frakce z katexu a tři frakce z anexu. Na reverzní fázi C18 docházelo k postupnému vymývání látek obsažených ve vzorcích dle polarita, a to tak, že s rostoucí koncentrací metanolu klesala polarita eluovaných látek, tedy frakce C0 obsahovala látky s nejvyšší polaritou a frakce C10 s nejnižší polaritou. U frakcionace na katexu docházelo separaci látek bazického charakteru, na anexu pak k separaci látek kyselého

charakteru. Ze všech získaných frakcí jsem připravila extrakty, které jsem testovala na obou buněčných liniích, EpRE-LUX i HepG2-GFP.

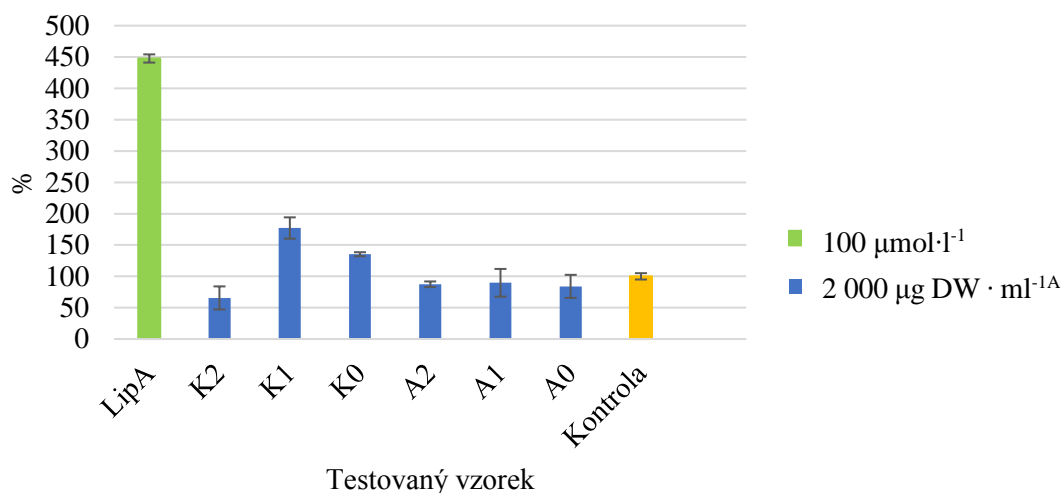
Při testování jsem připravovala pouze tři koncentrace u jednotlivých frakcí. Jako pozitivní kontrola byla použita kyselina lipoová, jako negativní kontrola byl použit metanol (0,4%), jelikož v něm byly rozpuštěny frakce. Z výsledků měření, zaznamenaných na Obrázku 19, je patrné, že nejvyšší aktivitu vykazovaly frakce C7 a C6 z reverzní fáze C18, jejichž naměřené hodnoty byly více než třikrát vyšší ve srovnání s negativní kontrolou. Při srovnání s aktivitou kyseliny lipoové dosahovala frakce C7 56% aktivity a frakce C6 53% aktivity. Vyšší jak 100% aktivitu v porovnání s negativní kontrolou dále vykazovaly frakce C10, C5, C2 a C1. Frakce C10 měla aktivitu vyšší o 95 %, frakce C5 o 36 %, frakce C2 o 10 % a frakce C1 o 5 %. Nejnižší naměřené hodnoty pak měly frakce C3 a C0, jejichž hodnoty byly ve srovnání s negativní kontrolou nižší než 100 %.



Obrázek 19: Grafické vyjádření luciferázové aktivity frakcí moringy olejodárné z reverzní fáze C18 na buněčné linii EpRE-LUX vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n = 3).

^A DW = hmotnost suchého rostlinného materiálu

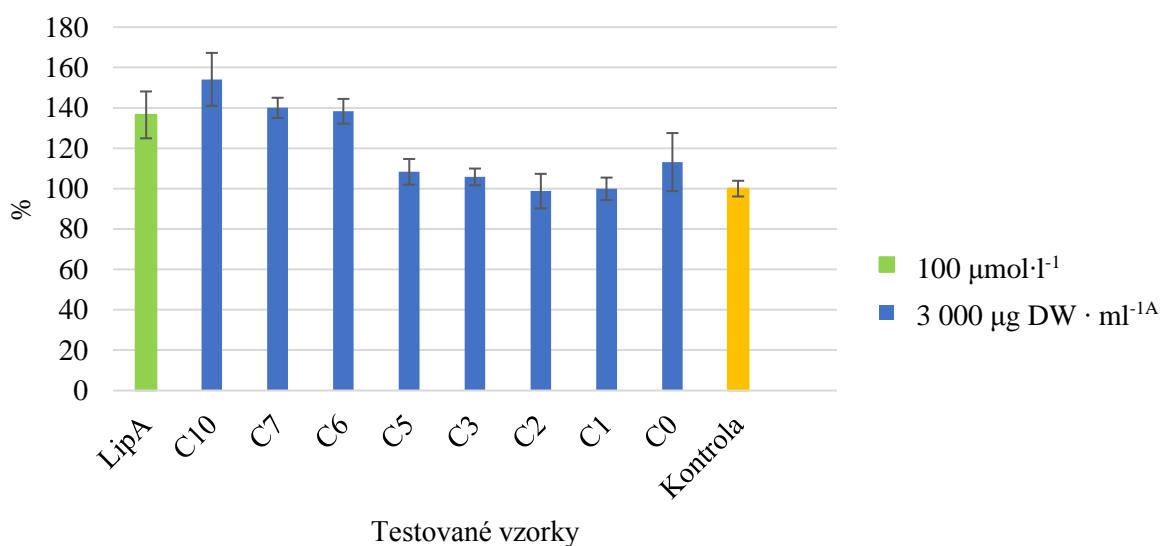
Výsledky aktivity frakcí z iontoměničové chromatografie, zaznamenané na Obrázku 20, ukázaly, že dvě frakce z katexu, K1 a K0, vykazovaly jako jediné vyšší aktivitu než 100 % ve srovnání s negativní kontrolou. Frakce K1 měla aktivitu vyšší o 77 % a frakce K0 o 35 %. Ze všech testovaných frakcí z reverzní fáze C18 a iontoměničové chromatografie na buněčné linii EpRE-LUX tedy měly nejvyšší aktivitu frakce C7 z reverzní fáze C18 a frakce K1 z katexu.



Obrázek 20: Grafické vyjádření luciferázové aktivity frakcí moringy olejodárné z iontoměnočové chromatografie na buněčné linii EpRE-LUX vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n = 3).

^A DW = hmotnost suchého rostlinného materiálu

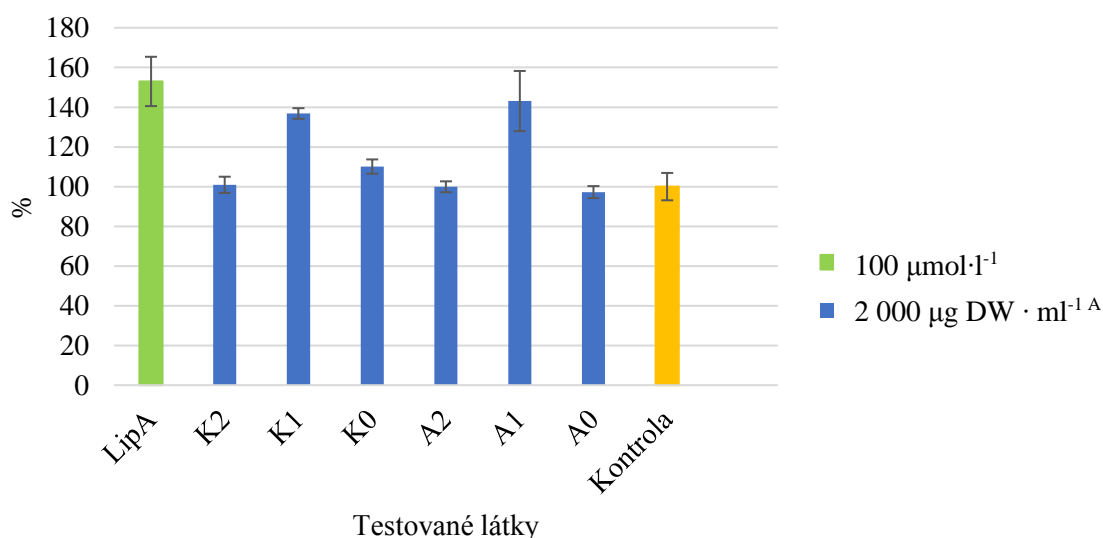
Měření fluorescenční aktivity na buněčné linii HepG2-GFP přineslo odlišné výsledky. Výsledky aktivity frakcí z reverzní fáze C18, zobrazené na Obrázku 21, ukazovaly, že nejvyšších aktivit dosáhly frakce C10, C7 a C6. Tyto frakce vykazovaly ještě vyšší aktivitu než kyselina lipová – frakce C10 měla o 13 % vyšší aktivitu, frakce C7 o 3 % a frakce C6 o 1 %. Pouze o 13 % vyšší aktivitu ve srovnání s negativní kontrolou vykazovala frakce C0, o 8 % frakce C5 a o 5 % frakce C3. Nižších hodnot než negativní kontrola dosahovaly frakce C2 a C1.



Obrázek 21: Grafické vyjádření fluorescenční aktivity frakcí moringy olejodárné z reverzní fáze C18 na buněčné linii HepG2-GFP vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n = 3).

^A DW = hmotnost suchého rostlinného materiálu

U naměřených hodnot fluorescenční aktivity frakcí z iontoměničové chromatografie, zobrazené na Obrázku 22, je patrné, že nejvyšší aktivity dosahovaly frakce z katexu K1 a anexu A1. Frakce K1 měla o 36 % vyšší aktivitu než negativní kontrola, frakce A1 o 43 %. Pouze o 10 % vyšší aktivitu než negativní kontrola měla frakce K0 a o 1 % frakce K2. Frakce A2 a A0 dosahovaly ve srovnání s negativní kontrolou nižších hodnot. Ze všech testovaných frakcí na buněčné linii HepG2-GFP tedy byly neaktivnější frakcemi frakce C10, C7, C6, K1 a A1.



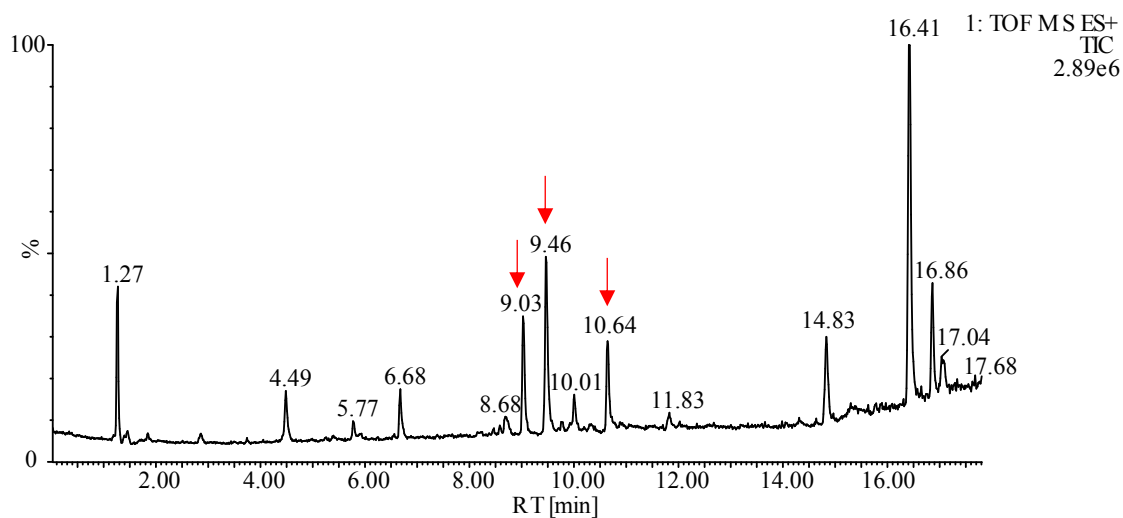
Obrázek 22: Grafické vyjádření fluorescenční aktivity frakcí moringy olejodárné z iontoměničové chromatografie na buněčné linii HepG2-GFP vztažené k neošetřené kontrole (100 %). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n = 3).

^A DW = hmotnost suchého rostlinného materiálu

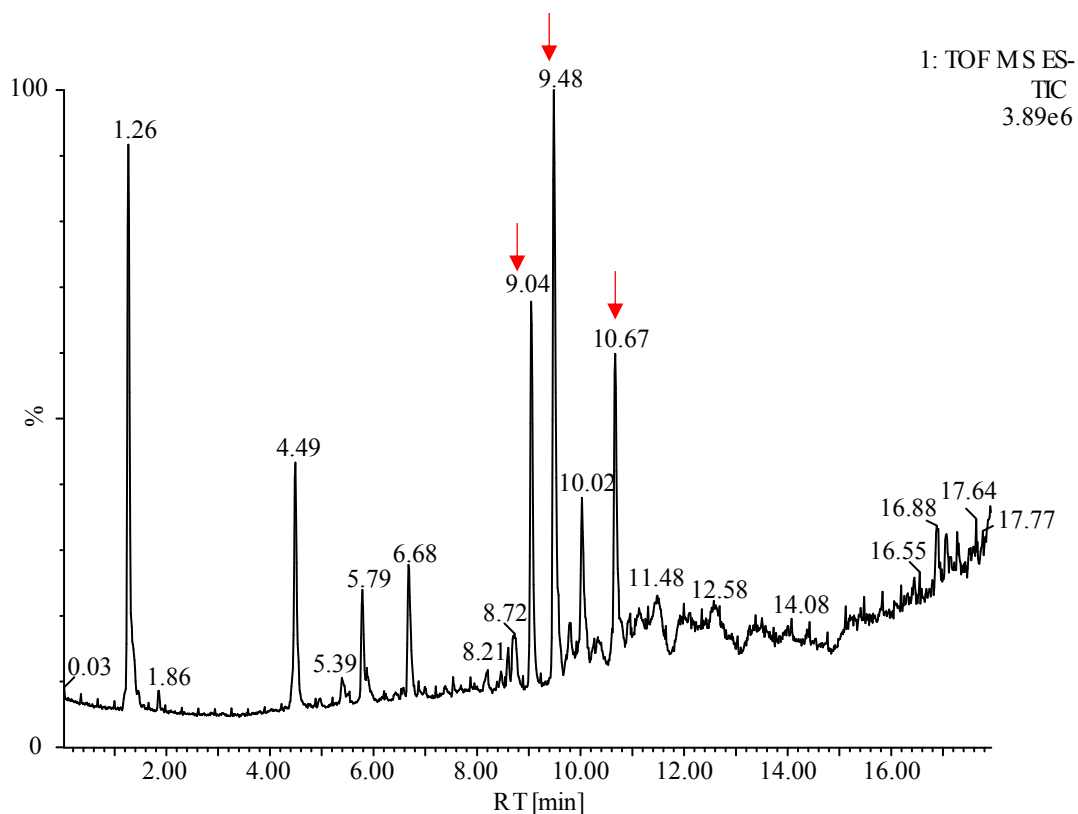
Při srovnání výsledků obou buněčných linií byla nejvyšší aktivita prokázána u nepolárních látek, se zvyšující se polaritou aktivita klesala. I přes rozdílné výsledky měření u obou buněčných linií byla shoda u aktivace dráhy transkripčního faktoru Nrf2 frakcemi C7 a K1. Pro UHPLC-MS analýzu jsem se rozhodla použít frakci z iontoměničové chromatografie, frakci K1. Tuto frakci jsem analyzovala systémem UHPLC-MS v koncentraci 0,3 µg DW · µl⁻¹ při ionizaci v pozitivním (ES+) i negativním (ES-) módu. Výsledný chromatogram, který byl měřen v pozitivním je uveden na Obrázku 23, a chromatogram, který byl měřen v negativním módu je uveden na Obrázku 24. Z obou chromatogramů je patrné, že frakce K1 obsahovala tři majoritní látky, jejichž píky jsou v chromatogramech označeny červenou šipkou. Jedná se o látky s retenčními časy 9,03 min (ES+) a 9,04 (ES-) pro první látku, dále 9,46 min (ES+) a 9,48 min (ES-) pro druhou látku a retenční časy 10,64 min (ES+) a 10,67 min (ES-) pro třetí látku.

První pík v levé části chromatogramu s retenčními časy 1,27 min (ES+) a 1,26 min (ES-) znázorňuje nástřik vzorku a píky v pravé části chromatogramu s retenčními časy

od 14,83 min (ES+) a od 14,08 min (ES-) byly pouze kontaminační látky vymyté z SPE kolonek, nejednalo se tedy o metabolity moringy olejodárné.



Obrázek 23: UHPLC-MS chromatogram frakce K1 moringy olejodárné v pozitivním módu, zobrazení Total Ion Current (TIC).



Obrázek 24: UHPLC-MS chromatogram frakce K1 moringy olejodárné v negativním módu, zobrazení Total Ion Current (TIC).

Po detekci tří majoritních metabolitů, uvedených v chromatogramech výše, jsem se pokusila identifikovat konkrétní látky. Při identifikaci jsem srovnávala MS/MS spektra a elementární složení metabolitů s online databází (Metlin), dále jsem srovnávala naměřené hodnoty m/z a detekovala jsem fragmenty jednotlivých metabolitů. Po této předběžné identifikaci jsem výsledky srovnala odbornou literaturou.

Výsledkem byla předběžná identifikace quercetin-3-O-hexosidu (m/z 463,0879) odpovídající píku v retenčním čase 9,04 min; dále quercetin-3-(6''-malonylhexosidu) (m/z 549,0879) odpovídající píku v retenčním čase 9,48 min a posledním metabolitem byl předběžně identifikován luteolin-7-O-(6''-malonyl)glukosid (m/z 533,0930) odpovídající píku v retenčním čase 10,67 min. Tyto tři majoritní metabolity jsou společně s jejich fragmenty vypsány v Tabulce 9.

Tabulka 9: Majoritní metabolity detekované ve frakci K1 moringy olejodárné a jejich předběžná identifikace.

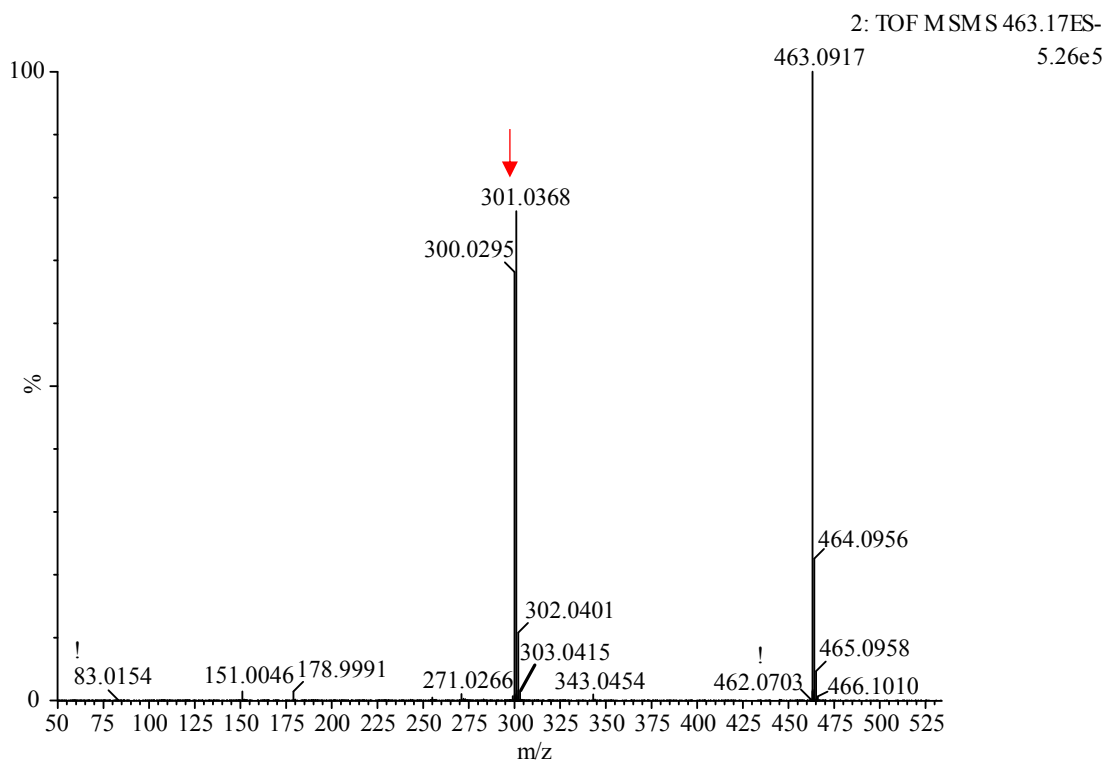
Naměřené m/z ^A	Δ ppm ^B	RT [min]	Elementární složení ^C	Fragmenty m/z	Anotace
463,0879	0,4	9,04	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	301	quercetin-3-O-hexosid
549,0879	-0,2	9,48	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅	301, 505	quercetin-3-(6''-malonylhexosid)
533,0930	-0,2	10,67	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄	285, 489	luteolin-7-O-(6''-malonyl)glukosid

^A [M-H]⁻

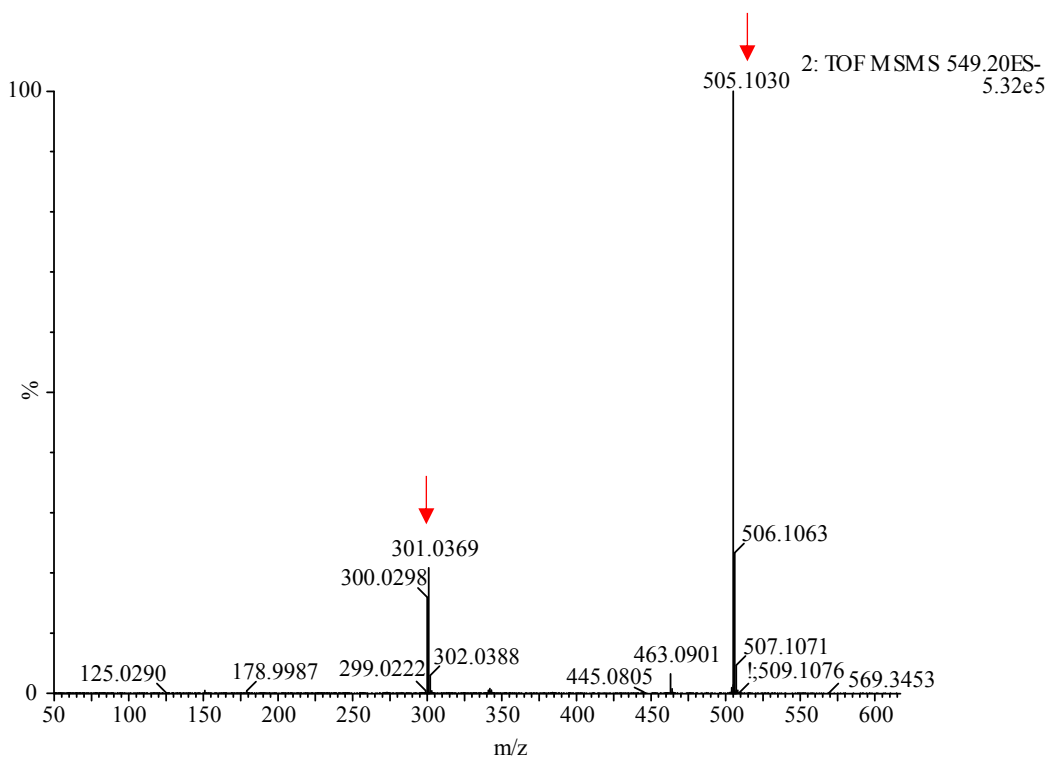
^B odchylka naměřené hmoty m/z od teoretické hmoty sumárního vzorce m/z

^C [M-H]⁻

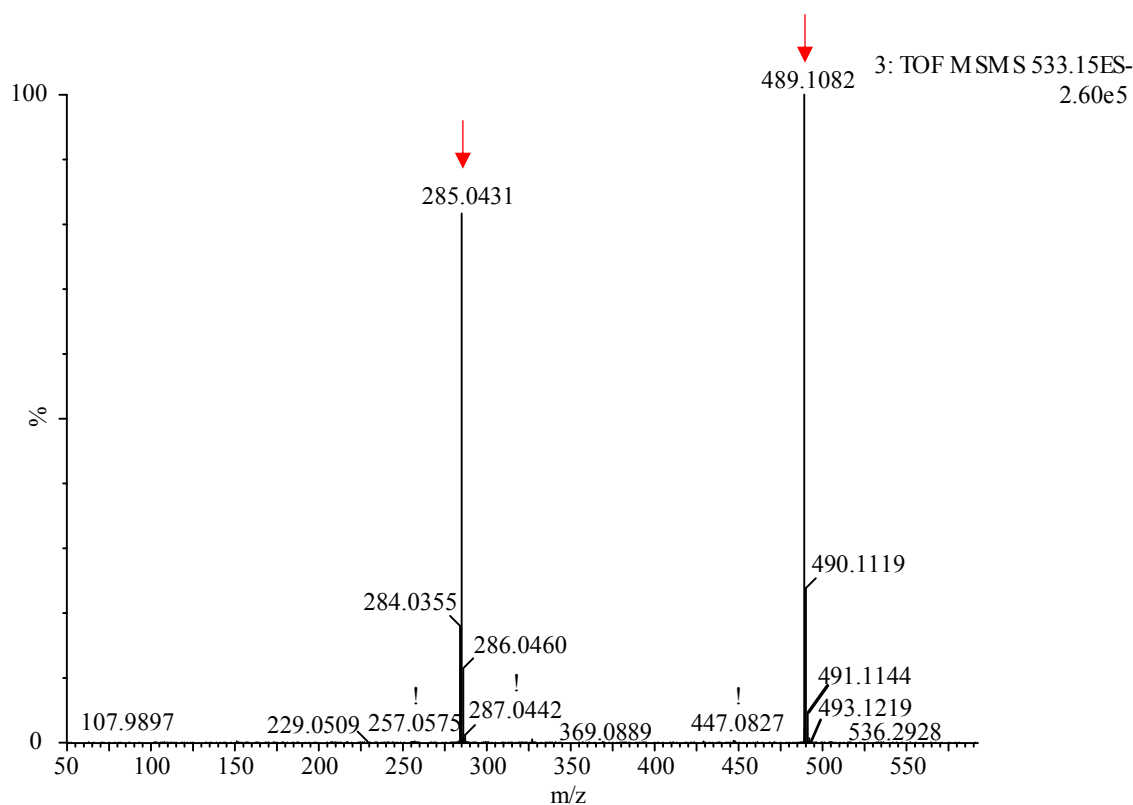
Součástí předběžné identifikace tří hlavních metabolitů frakce K1 moringy olejodárné byla i detekce jejich fragmentů, jak je zmíněno výše. Tyto fragmenty, nebo také produktové ionty, jsem detekovala z MS/MS spekter pro jednotlivé prekurzorové ionty. Z těchto spekter jsem identifikovala fragment 301 pro prekurzorový ion m/z 463, dále fragmenty 301 a 505 pro prekurzorový ion m/z 549 a fragmenty 285 a 489 pro prekurzorový ion m/z 533. MS/MS spektra prekurzorových iontů, v kterých jsou zobrazeny ionty produktové, jsou vyobrazeny v následujících třech obrázcích – na Obrázku 25 je MS/MS spektrum prekurzorového iontu m/z 463 s produktovým iontem 301, na Obrázku 26 je MS/MS spektrum prekurzorového iontu m/z 549 s produktovými ionty 301 a 505, a na Obrázku 27 je MS/MS spektrum prekurzorového iontu m/z 533 s produktovými ionty 285 a 489. Detekované fragmenty (produktové ionty) jsou obrázcích označeny červenou šipkou.



Obrázek 25: MS/MS spektrum prekurzorového iontu (m/z 463) v retenčním čase 9,04 min detekovaného ve frakci K1 moringy olejodárné v negativním módu.

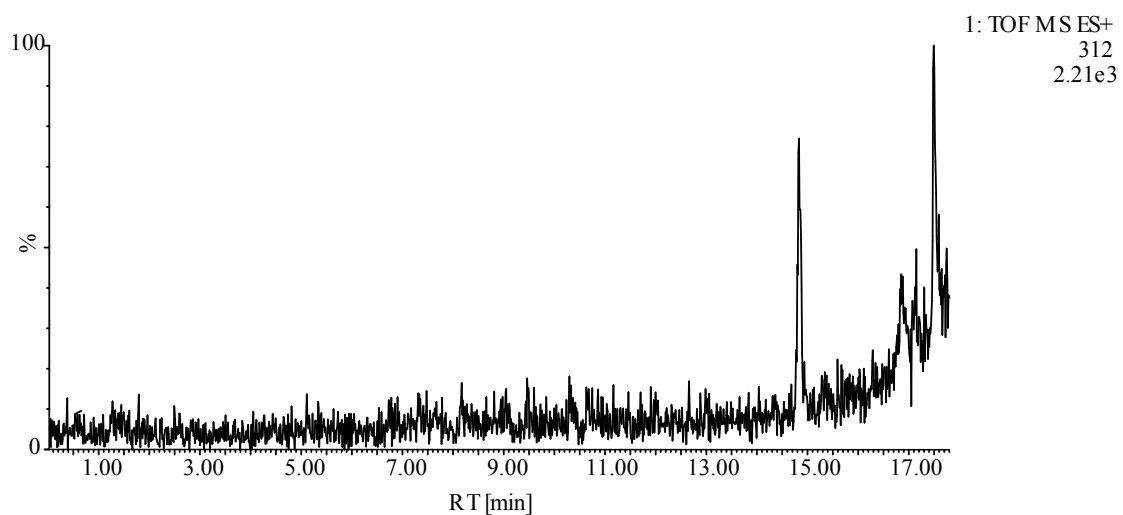


Obrázek 26: MS/MS spektrum prekurzorového iontu (m/z 549) v retenčním čase 9,48 min detekovaného ve frakci K1 moringy olejodárné v negativním módu.



Obrázek 27: MS/MS spektrum prekurzorového iontu (m/z 533) v retenčním čase 10,67 min detekovaného ve frakci K1 moringy olejodárné v negativním módu.

Výše uvedenou analýzou s literárním srovnáním jsem předběžně identifikovala tři majoritní metabolity zastoupené ve frakci K1 moringy olejodárné, a to deriváty quercetinu, konkrétně quercetin-3-O-hexosid a quercetin-3-O-(6''-malonylhexosid), a luteolinu, konkrétně luteolin-7-O-(6''-malonyl)glukosid. Známou látkou, kterou moringa olejodárná obsahuje, a která aktivuje dráhu Nrf2, je i moringin ($M_w = 311,3530 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Z tohoto důvodu jsem se pokusila dokázat jeho přítomnost ve vzorku, jelikož nebyl předběžně identifikován ve výše zmíněných majoritních metabolitech. S tímto účelem jsem se zobrazila chromatogram v pozitivním módu, který vyobrazuje pseudomolekulární ion $[M+H]^+$, jehož teoretické m/z je 311,3530. Z výsledku chromatogramu, uvedeného na Obrázku 28, je však patrné, že frakce K1 moringin neobsahovala. Detekován byl pouze šum a od retenčního času 15 min kontaminační látky, které byly vymyty z SPE kolonek.



Obrázek 28: UHPLC-MS chromatogram frakce K1 moringy olejodárné v pozitivním módu. Extracted ion chromatogram (EIC) zobrazuje m/z 312, který odpovídá pseudomolekulárnímu iontu moringinu $[M+H]^+$.

6 DISKUZE

Cílem této bakalářské práce bylo vyhledat rostlinné extrakty aktivující dráhu transkripčního faktoru Nrf2. Nejdříve jsem hledala rostliny, u kterých byla dle literatury prokázána produkce antioxidantních a chemoprotektivních látek. Na základě těchto kritérií jsem vybrala rostliny marhaník obecný (*Punica granatum* L.) a z něj kůru a dřevěný plod, moringu olejodárnou (*Moringa oleifera*), camu camu (*Myrciaria dubia*) a kustovnici čínskou (*Lycium chinense*). Z těchto rostlin jsem připravila extrakty, které jsem testovala na adherentní buněčné linii EpRE-LUX, která využívá jako reportéru EpRE-zprostředkované aktivace genové transkripce luciferázovou expresi, jež katalyzuje produkci světla, luminiscenci. Při testování rostlinných extraktů tedy byla sledována právě luminiscenční aktivita ve srovnání s pozitivní kontrolou, kyselinou lipoovou, což je látka, u níž byla prokázána aktivace Nrf2 dráhy (Michalska *et al.*, 2019).

Testováním rostlinných extraktů jsem zjistila, že schopnost aktivace transkripční dráhy Nrf2 měl extrakt moringy olejodárné. U ostatních extraktů nebyla aktivita významná. Extrakty kůry granátového a camu camu navíc vykázaly toxické účinky. Způsobeno to bylo tím, že tyto extrakty uvolnily buňky ze dna jamek mikrotitrační destičky. Z tohoto testování byl tedy nejzajímavějším extrakt z moringy olejodárné, který jsem se rozhodla frakcionovat. Připravila jsem osm frakcí na reverzní fázi C18, kdy probíhalo postupné vymývání od polárních po nepolární látky, a šest frakcí pro získání polárních záporně a kladně nabitých látek na iontoměničové chromatografii – na tři frakce na anexu, kde jsem získávala látky bazické povahy, a na tři frakce na katexu, kde jsem získávala látky kyselé povahy. Extrakty ze všech frakcí jsem poté testovala na buněčné linii EpRE-LUX, a navíc ještě na buněčné linii HepG2-GFP pro ujištění, že aktivace Nrf2 dráhy metabolity moringy olejodárné nebyla specifická pouze pro určitý typ buněk. Buněčná linie HepG2-GFP byla upravena tak, že exprimovala zelený fluorescenční protein, jenž emituje fluorescenci, a proto byla u této buněčné linie sledována fluorescenční aktivita.

Výsledky těchto měření byly u obou buněčných linií mírně odlišné. Způsobeno to bylo tím, že buněčná linie HepG2-GFP nebyla na tento typ testování dostatečně citlivá. Z tohoto důvodu jsem aktivitu frakcí hodnotila zejména na buněčné linii EpRE-LUX, a tyto výsledky jsem následně srovnala s buněčnou linií HepG2-GFP. Tímto postupem jsem vyhodnotila frakci C7 z reverzní fáze C18 a frakci K1 z katexu jako neaktivnější, jelikož měly nejvyšší naměřené hodnoty luciferázové aktivity u buněčné linie EpRE-LUX a navíc dosahovaly i značných hodnot fluorescenční aktivity na buněčné linii HepG2-GFP.

V rámci výsledků buněčných testů jsem získala odlišné hodnoty aktivity, ve srovnání s negativní kontrolou, i u kyseliny lipoové. Ta je však prokázaným aktivátorem Nrf2 dráhy a její výsledky by měly být vždy stejné. Testování jsem ale neprováděla na stejně starých buňkách, což mohlo mít za důsledek právě odlišné hodnoty její aktivity. Dalším faktorem, který tyto rozdíly

mohl způsobit, byla rychlost luciferázové reakce. Ta je totiž po přidání roztoku s obsahem luciferinu (FlashMixu) k buňkám okamžitá. Prodleva, která byla způsobena přemístěním mikrotitrační destičky s buňkami do multifunkčního readeru pro měření, tedy způsobovala pokles luminiscenční aktivity, a proto byly hodnoty aktivity kyseliny lipoové na různých mikrotitračních destičkách odlišné.

Buněčné testování extraktů a frakcí jsem ukončila určením dvou frakcí, C7 a K1, jako aktivních, jak je již zmíněno výše. V dalším kroku jsem se pokusila identifikovat aktivní látky, které tyto frakce obsahují, a to pomocí UHPLC-MS. Z důvodu náročnosti a nákladnosti experimentu jsem k analýze zvolila pouze frakci K1. Z výsledných chromatogramů, získaných z ionizace analytů v pozitivním i negativním módu, jsem zjistila, že tato frakce obsahovala tři majoritní píky značící tři majoritní metabolity. Každý z těchto metabolitů jsem se pokusila předběžně identifikovat určením jejich MS/MS spekter v negativním módu, m/z a elementárního složení. Pro ověření správnosti jsem MS/MS spektra poté srovnala i v módu pozitivním, ale ta v online databázích nebyla dostupná pro všechny látky.

Fytochemické složení moringy olejodárné bylo již několikrát studováno. Například ve spojitosti s Nrf2 byl detekován moringin jako látka aktivující tuto transkripční dráhu (Michl *et al.*, 2016), který se mi však nepodařilo ve frakci K1 prokázat. Dalšími látkami objevenými v morinze olejodárné jsou například quercetin, zeatin či kaempferol (Anwar *et al.*, 2007). Derivát quercetinu se mi pomocí srovnání MS/MS spekter s databází podařilo předběžně ve frakci K1 identifikovat. Konkrétně jsem porovnávala MS/MS spektrum prekurzorového iontu m/z 463 s fragmentem 301, jehož spektrum odpovídalo quercetin-3-O-glukosidu. Po porovnání MS/MS spektra jsem dále s literaturou porovnávala hodnotu naměřeného m/z , fragmenty a elementární složení. Podle tohoto porovnání hodnoty odpovídaly quercetin-3-O-glukosidu nebo quercetin-3-O-galaktosidu, které byly také v morinze olejodárné detekovány (Braham *et al.*, 2020). Druhým derivátem quercetinu, který jsem předběžně identifikovala z MS/MS spektra prekurzorového iontu m/z 549 s fragmenty 301 a 505, byl quercetin-3-(6''-malonyl)galaktosid). Naměřené hodnoty m/z , fragmenty i elementární vzorec odpovídaly podle literatury quercetin-3-(6''-malonyl)glukosidu (Braham *et al.*, 2020). U žádného z derivátů quercetinu jsem však touto analýzou nemohla přesně určit, zda se jednalo o glukosid či galaktosid quercetinu, jelikož obě látky mají stejný sumární vzorec a společně spadají do hexosidů, tedy sacharidů s šesti uhlíky a jsou navzájem epimerní. Obecně bych tedy mohla říci, že první detekovanou látkou byl quercetin-3-O-hexosid a druhou detekovanou látkou byl quercetin-3-O-(6''-malonyl)hexosid).

Posledním předběžně identifikovaným metabolitem byl po porovnání MS/MS spektra prekurzorového iontu 533 s fragmenty 285 a 489 luteolin-7-O-(6''-malonyl)glukosid. Srovnání s literaturou ukazovalo stejnou naměřenou hodnotu m/z , stejné fragmenty i elementární složení, navíc byla i tato látka detekována v morinze olejodárné (Braham *et al.*, 2020).

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo identifikovat rostlinné extrakty aktivující dráhu transkripčního faktoru Nrf2. První část práce se zabývala stanovením luciferázové aktivity po působení zvolených rostlinných extraktů na buněčnou linii EpRE-LUX. Jako kontrolní látka a standard byla použita kyselina lipoová, u níž byla aktivace Nrf2 dráhy prokázána. Z původních čtyř zvolených a testovaných rostlin byla vybrána jedna, která vykazovala aktivaci dráhy Nrf2 na buněčné linii EpRE-LUX, a to moringa olejodárná (*Moringa oleifera*). Tato rostlina byla poté použita pro přípravu frakcí, které byly testovány na buněčných liniích EpRE-LUX a HepG2-GFP. Ze všech testovaných frakcí vykazovala aktivitu frakce K1 z iontoměničové chromatografie, jelikož její aktivita byla prokázána na obou buněčných liniích.

Druhou částí práce byla identifikace aktivních látek ve frakci K1 moringy olejodárné z UHPLC-MS analýzy. V chromatogramu byly detekovány tři majoritní metabolity, jejichž elementární složení bylo vypočítáno na základě přesné hmoty m/z . Srovnáním MS/MS spekter s literaturou se mi podařilo předběžně identifikovala quercetin-3-O-hexosid, quercetin-3-O-(6''-malonylhexosid) a luteolin-7-O-(6''-malonyl)glukosid.

V této práci tedy bylo zjištěno, že rostlina moringa olejodárná je aktivátorem dráhy transkripčního faktoru Nrf2, která vede k obranným reakcím organismu, a tak chrání buňky před oxidačním stresem a vykazuje chemopreventivní účinky. Tato aktivita by potenciálně mohla být aktivována deriváty quercetinu a luteolinu.

8 LITERATURA

1. Acworth, I. N., Oxon, D. P. (2003): The Handbook of Redox Biochemistry. ESA, Inc.
2. Anwar F., Latif, S., Ashraf M., Gilani A. H. (2007): *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy research* (21): 17–25.
3. Arora, S., Bhanot, D. (2014). [online] [navštíveno 17.1.2020] Dostupné z (<https://lab-training.com/wp-content/uploads/2014/11/HPLC-E-Book.pdf>)
4. Bird, I. M. (1989): High performace liquid chromatography: principles and clinical applications. *Scientific Tools in Medicine*: 783–787.
5. Boerboom, A.-M. J. F., Vermeulen, M., van der Woude, H., Bremer, B. I., Lee-Hilz, Y. Y., Kampman, E., van Bladeren, P. J., Rietjens, I. M. C. M., Aarts, J. M. M. J. G. (2006): Newly constructed stable reporter cell lines for mechanistic studies on electrophile-responsive element-mediated gene expression reveal a role for flavonoid planarity. *Biochemical pharmacology* 72 (2): 217–226.
6. Braham F., Carvalho, D. O., Almeida, C. M. R., Zaidi, F., Magalhães, J. M. C. S., Guido, L. F., Gonçalves, M. P. (2020): Online HPLC-DPPH screening method for evaluating of radical scavenging phenols extracted from *Moringa oleifera* leaves. *South african journal of botany* (129): 146–154.
7. Canning, P., Sorrell, F. J., Bullock, A. N. (2015): Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free radical biology and medicine* (88): 101–107.
8. Carr, A.C., Maggini, S. (2017): Vitamin C and immune function. *Nutrients* 9 (11): 1211
9. Cemazar, M., Hreljac, I., Sersa, G., Filipic, M. (2009): Construction of EGFP expressing HepG2 cell line using electroporation. *World congress on medical physics and biomedical engineering* 25: 128–131.
10. Cooper, J. A. (2009). [online] [navštíveno 20.3.2019] Dostupné z (<https://www.britannica.com/science/transcription-factor>)
11. Coskun, O. (2016): Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul* 3 (2): 156–160.
12. de Wet, J. R., Wood, K. V., de Luca, M., Helinski, D. R., Subramani, S. (1987): Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 7 (2): 725–737.
13. Dickinson, D. A., Levonen, A.-L., Moellering, D. R., Arnold, E. K., Zhang, H., Darley-Usmar, V. M., Forman, H. J. (2004): Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free radical biology and medicine* 37 (8): 1152–1159.
14. Donno, D., Beccaro, G. L., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., Bounous, G. (2015): Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of Functional Foods* 18 (B): 1070–1085.

15. Fiedor, J., Burda, K. (2014): Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6 (2): 466–488.
16. Franco, R., Cidlowski, J. A. (2009): Apoptosis and glutathione: beyond and antioxidant. *Cell death and differentiation* (16): 1303–1314.
17. Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011): Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling* 15 (6): 1583–1606.
18. Ghaste, M., Mistrik, R., Shulaev, V. (2016): Applications of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) and orbitrap based high resolution mass spectrometry in metabolomics and lipidomics. *International Journal of Molecular Sciences* 17 (6): 816.
19. Glisodin. [online] [navštívěno 28.3.2019] Dostupné z <http://glisodin.zeitguysdev.com/science/>.
20. Hajhashemi, V., Vaseghi, G., Pourfarzam, M., Abdollahi, A. (2010): Are antioxidants helpful for disease prevention? *Research in Pharmaceutical Sciences* (5): 1–8.
21. Chauhan, A., Chauhan, V., Brown, W. T., Cohen, I. (2004): Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin – the antioxidant proteins. *Life Sciences* 75 (21): 2539–2549.
22. Chin, Y.-W., Lim, S. W., Kim, S.-H., Shin, D.-Y., Suh, Y.-G., Kim, Y.-B., Kim, Y. C., Kim, J. (2003): Hepatoprotective pyrrol derivatives of *Lycium chinense* fruit. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (1): 79–81.
23. Chirinos, R., Galarza, J., Betalleluz-Pallardel, I., Pedreschi, R., Campos, D. (2010): Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry* 120 (4): 1019–1024.
24. Issaq, H. J., Conrads, T. P., Janini, G. M., Veenstra, T. D. (2002): Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis* (23): 3048–3061.
25. Klouda, P. (2003): *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda.
26. Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M. (2004): Oxidative stress sensor Keap 1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology* 24 (16): 7130–7139.
27. Langley, J. A., Pergolizzi, J. V., Taylor, R., Ridgway, C. (2015): Antioxidant and associated capacities of camu camu (*Myrciaria dubia*): a systematic review. *Journal of alternative and complementary medicine* 21 (1): 8–14.
28. Madrigal-Carballo, S., Rodriguez, G., Krueger, C. G., Dreher, M., Reed, J. D. (2009): Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal of functional foods* 1 (3): 324–329.

29. Manz, A., Pamme, N., Iossifidis, D. (2004): Bioanalytical chemistry. Imperial College Press, London.
30. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I. N. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry* 32 (8): 595–603.
31. Mena P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna G., Viguera, C. G., Bruni, R., Crozier, A., Rio, D. D. (2012): Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MS. *Molecules* 17: 14821–14840.
32. Michl, C., Vivarelli, F., Weigl, J., De Nicola, G. R., Canistro, D., Paolini, M., Iori, R., Rascle, A. (2016): The chemopreventive phytochemical moringin isolated from *Moringa oleifera* seeds inhibits JAK/STAT signaling. *PLoS One* 11 (6).
33. Mitsuishi, Y., Motohashi, H., Yamamoto, M. (2012): The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Frontiers in Oncology* (2).
34. News medical. [online] [navštíveno 20.3.2019] Dostupné z <https://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems.aspx>
35. Oberle, S., Polte, T., Abate, A., Podhaisky, H.-P., Schröder, H. (1998): Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells. *Circulation Research* (82): 1016–1020.
36. Pizzorno, J. (2014): Glutathione! *Integrative Medicine: A Clinician's Journal* 13 (1): 8–12.
37. Prester T., Talalay, P., Alam, J., Ahn, Y. I., Lee, P. J., Choi, A. M. K. (1995): Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). *Molecular medicine* 1 (7): 827–837.
38. Razis A. F. A., Ibrahim, M. D., Kntayya, S. B. (2014): Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian pacific journal of cancer prevention* 15 (20): 8571–8576.
39. Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S., L., Beall, H. D., Anwar, A., Siegel, D. (2000): NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-biological interactions* 129 (1–2): 77–97.
40. Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N. (2013): Potential applications of antioxidants. *Journal of Pharmacy Research* (7): 828–835.
41. Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., Fryer, A. A. (2001): Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 482 (1–2): 21–26.
42. Surh, Y.-J., Kundu, J. K., Na, H.-K. (2008): Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* (74): 1526–1539.

43. Tiloka, C., Anand, K., Gengan, R. M., Chuturgoon, A. A. (2018): Moringa oleifera and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (108): 457–466.
44. Traber, M. G., Atkinson, J. (2007): Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free radical biology and medicine* 43 (1): 4–15.
45. Wellington, K. W. (2015): Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. *Royal society of chemistry* (5): 20309–20338.
46. Younus, H. (2018): Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences* 12 (3): 88–93.
47. Zarfeshany, A., Asgary, S., Javanmard, S. H. (2014): Potent health effects of pomegranate. *Advanced biomedical research* 3: 100.
48. Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., Resson, H. W. (2012): LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems* 2 (8): 470–481.
49. Zima, T. (2003). [online] [navštíveno 17.2.2019] Dostupné z <http://www.edukafarm.cz/c160-antioxidacni-ochrana-organismu>
50. Zhu, J., Wang, H., Chen, F., Fu, J., Xu, Y., Hou, Y., Kou, H. H., Zhai, Ch., Nelson, M. B., Zhang, Q., Andersen, M. E., Pi, J. (2016): An overview of chemical inhibitors of the Nrf-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy. *Free radical biology and medicine* (99): 544–556.