

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických vied



PÔSOBENIE EXTRAKTOV Z PAPERADÍ NA BUNKOVÚ LÍNIU SW480

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Andrea Zacharská

Čestné vyhlásenie

Svojim podpisom prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola nikdy použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, dňa

.....
Andrea Zacharská

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať svojej školiteľke, pani doc. Ing. Petre Matouškovej, Ph.D., za trpezlivosť a čas, cenné rady a odbornú pomoc, ktoré mi poskytla pri vypracovávaní tejto diplomovej práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických vied

Študentka: Andrea Zacharská

Školiteľ: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Pôsobenie extraktov z papradí na bunkovú líniu SW480

Rakovina je jednou z hlavných príčin úmrtí vo svete. Aj napriek tomu, že na trhu máme niekoľko dostupných liekov na liečbu nádorových ochorení, žiaden z nich nie je úplne účinný a bezpečný. Hlavným problémom býva toxicita, ktorú sa odborníci snažia eliminovať hľadaním iných alternatív liečby. Jednou z možností sú aj rastliny a ich sekundárne metabolity s antiproliferatívnymi a antioxidantnými účinkami vzhľadom k tomu, že karcinogenita môže súvisieť aj s voľnými radikálmi. V našom prípade sme pozornosť upriamili práve na antioxidantný, resp. prooxidantný efekt, konkrétne u papradí. V práci sa zameriavame na 4 druhy papradí (*Athyrium filix – femina*, *Dryopteris dilatata*, *Dryopteris borreri*, *Blechnum spicant*), ktorých extrakty o rôznych koncentráciách sme skúmali ako potenciálne prospešné látky v boji proti oxidačnému stresu na bunkovej línii SW480. Využívali sme metódu s fluorescenčnou sondou H₂DCF-DA, ktorá sa používa na detekciu bunkovej produkcie ROS. V prvotnom nastavení experimentu sme ako pozitívnu kontrolu použili roztok TBHP, ktorý sa spolu s jednotlivými extraktami pridávali až v poslednom kroku - sledoval sa prooxidantný efekt. Z výsledkov bolo zrejmé, že testované látky narozdiel od TBHP neindukovali tvorbu ROS. Druhý experiment prebiehal v opačnom slede a sledoval sa efekt antioxidantný. Jeho podstatou bol 18h pretreatment testovanými látkami a pozitívnymi kontrolami Catechinom a Quercetinom, s cieľom pripraviť bunky na oxidačný stres tvorbou antioxidantných enzýmov. Signifikantný antioxidantný efekt sme pozorovali u extraktu z *Dryopteris dilatata* o koncentrácii 100µg/ml. Ostatné látky buď tvorbu ROS nijako neovplyvnili, alebo naopak vyčerpali antioxidantný aparát bunky, čo sa preukázalo veľmi vysokou intenzitou fluorescencie. Aj napriek tomu, že niektoré z našich látok preukázali schopnosť antioxidantného pôsobenia, nemožno tieto výsledky pokladať za smerodajné. Potrebný je ďalší cieleňvý výskum.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Student: Andrea Zacharská

Supervisor: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of fern extracts on the SW480 cell line

Cancer is one of the leading causes of death in the world. Although we have several drugs available for the treatment of cancer, none of them are completely effective and safe. The fundamental problem is toxicity, which experts try to eliminate by looking for other treatment alternatives like plants and their secondary metabolites with antiproliferative and antioxidant effects against free radicals, that can cause cancer. Our work is focused on the antioxidant, as well as the prooxidant effect of 4 species of ferns (*Athyrium filix - femina*, *Dryopteris dilatata*, *Dryopteris borreri*, *Blechnum spicant*), whose extracts of different concentrations were studied as potentially beneficial substances against oxidative stress on the SW480 cell line. We used the fluorescent probe H₂DCF-DA to detect the production of reactive oxygen species (ROS) in cells. In the initial setup the potential prooxidant effect was monitored alongside with the *tert*-butyl hydroperoxide solution as a positive control. The results demonstrated that these test substances did not induce the ROS production. The second experiment was focused on the potential antioxidant effects. The positive controls Catechin and Quercetin together with the fern extracts were added at the beginning, as an 18-hour pretreatment in order to prepare the cells for oxidative stress by inducing antioxidant enzymes. We achieved a significant antioxidant effect of *Dryopteris dilatata* extract (100 µg/ml). The others do not affect the production of ROS this way, on the contrary some of them depleted the antioxidant apparatus of cells, as was shown by higher intensity of fluorescence. Although some substances have shown antioxidant activity, the experiment cannot be considered as definitive. Further targeted research is needed.

OBSAH

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK	2
1. ÚVOD	4
2. TEORETICKÁ ČASŤ	6
2.1. Reactive oxygen species (ROS) – reaktívne formy kyslíka.....	6
2.1.1. Biochemický a biomedicínsky význam ROS.....	6
2.1.1.1. Priaznivé účinky ROS	8
2.1.1.2. Negatívne účinky ROS.....	9
2.1.1.2.1. Oxidačné poškodenie lipidov - lipidová peroxidácia (LPO)	10
2.1.1.2.2. Oxidačné poškodenie proteínov	13
2.1.1.2.3. Oxidačné poškodenie DNA	14
2.1.2. Antioxidanty a antioxidačná ochrana organizmu.....	14
2.1.2.1. Enzýmové antioxidanty.....	15
2.1.2.2. Neenzýmové proteínové antioxidanty	16
2.1.2.3. Neenzýmové nízkomolekulové antioxidanty syntetizované v organizme	16
2.1.2.4. Nízkomolekulové antioxidanty získané potravou.....	17
2.2. Vyššie rastliny	18
2.2.1. Výtrusné rastliny	18
2.2.1.1. Paprad'orasty	20
2.2.1.1.1. Paprade v liečebnej praxi, vo vede a výskume	20
2.2.1.1.2. Athyrium filix – femina (Papradka samičia)	21
2.2.1.1.3. Dryopteris dilatata (Paprad' rozložená).....	22
2.2.1.1.4. Dryopteris borreri (Paprad' rezavá).....	23
2.2.1.1.5. Blechnum spicant (Rebrovka rôznolistá).....	24
3. CIEĽ PRÁCE	25
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
4.1. Materiál a chemikálie.....	26

4.2. Pomôcky a prístroje	26
4.3. METÓDY	27
4.3.1. Bunkové línie	27
4.3.2. Kultivácia buniek	27
4.3.3. Kultivačné médium	28
4.3.4. Pasážovanie buniek	28
4.3.5. Počítanie buniek	30
4.3.6. Nasadzovanie buniek	31
4.3.7. Ovplyvňovanie buniek testovanými látkami	31
4.3.8. Vyhodnocovanie – metóda WST-1	33
4.3.9. ROS detekcia na bunkovej úrovni	34
4.3.9.1. Prooxidačný efekt	36
4.3.9.2. Antioxidačný efekt	37
4.3.10. Štatistická analýza dát	39
5. VÝSLEDKY	40
5.1. Antiproliferatívne pôsobenie papradí	40
5.1.1. Úvodný screening	40
5.1.2. Testovanie vybraných látok pri rôznych časových intervaloch	41
5.1.3. Testovanie dvoch vzoriek vo väčšom rozsahu koncentrácií	42
5.2. ROS	44
5.2.1. Stanovenie koncentrácie pozitívnej kontroly TBHP	44
5.2.2. Prooxidačný efekt vybraných vzoriek	45
5.2.3. Antioxidačný efekt vybraných vzoriek	46
6. DISKUSIA	51
7. ZÁVER	56
8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	57

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

5-FU	5-fluorouracil
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropán) dihydrochlorid
AMK	aminokyseliny
ATB	antibiotikum
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenozíntrifosfát
C	Catechin
CCl₄	tetrachlórmetán
CO₂	oxid uhličitý
Cu⁺, Zn²⁺, Mn²⁺	katión medi, zinku a horčíka
DCF	dichlorfluorescein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium (médium)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl
DPPH-H	2,2-difenyl-1-picrylhydrazin
EC₅₀	polovica maximálnej efektívnej koncentrácie
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
FBS	fetálne bovinné sérum
GIT	gastrointestinálny trakt
GPx	glutatiónpoxidáza
GRed	glutatióntreduktáza
GSH	glutatión
GSSG	oxidovaný glutatión
H₂DCF-DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetat (sonda)
H₂O₂	peroxid vodíka
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HeLa	bunková línia rakoviny krčka maternice, pomenovaná po Henriette Lacks
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethanesulfonic acid
IARC	International Agency for Research on Cancer

IC₅₀	polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie
IRP	ischemicko-reperfúzne poškodenie
K562	myelogénna leukemická bunková línia
L•	lipidový radikál
LDH	laktátdehydrogenáza
LH	lipidová membrána
LOOH	lipidový peroxid
LPO	lipidová peroxidácia
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NADP⁺	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NK	nukleové kyseliny
NO	oxid dusnatý
O₂	kyslík
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
ORAC-FL	oxygen radical absorbance capacity – fluorescein
PBS	fosfátový pufr
Q	Quercetin
ROS	reactive oxygen species
RTG	Röntgenové žiarenie
-SH	thiolová skupina
SOD	superoxiddismutáza
TBHP	terc-butyl hydroperoxide
UV	ultrafialové žiarenie
WHO	World Health Organization
WST	Water-soluble Tetrazolium salts
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

1. ÚVOD

Spätosť medzi voľnými radikálmi a ochoreniami, ktoré môžu byť nimi vyvolané či zhoršené, či možnosť antioxidačnej terapie sú otázky, ktoré sú rozoberané nie len v odbornej literatúre, no sú aj jednou z tém diskusií klinických odborov medicíny [1]. Okrem toho, že kyslík je základnou životnou podmienkou pre aeróbne organizmy, môže byť aj škodlivý, a to v podobe vysokých koncentrácií voľných kyslíkových radikálov, ktoré poškodzujú bunky štruktúrne a funkčne, pričom môžu viesť až k procesu karcinogenézy a vzniku nádorových ochorení [2,3]. Väčšina voľných radikálov v tele existuje vo forme reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Jedná sa o molekuly, ktoré sú schopné indukovať priame oxidačné poškodenie nie len DNA, ale aj ďalších biomolekúl – lipidov a bielkovín.

Prepojenie oxidačného stresu a protinádorovej terapie sa v posledných rokoch stáva terčom záujmu mnohých vedcov, ktorí pripúšťajú možnosť, že úspech liečby onkologického ochorenia môže súvisieť práve s antioxidantami endogennými (syntetizujú sa *de novo*) či exogennými (prijaté potravou či výživovými doplnkami). Je to ale otázka kontroverzná, keďže antioxidanty môžu aj podporovať, aj potláčať účinnosť protinádorovej terapie. V súčasnej dobe však neexistuje dostatok relevantných dôkazov na vydanie jednoznačného odporúčania, či podávanie antioxidantov popri onkologickej liečbe je, alebo nie je prospešné. Jedným z dôvodov môže byť aj fakt, že ich účinok závisí od mnohých faktorov, ako napríklad typ nádoru, druh užívaných chemoterapeutík a rovnako tiež závisí aj od konkrétneho typu antioxidantu [4].

Výskumu rastlín ako zdroju protirakovinových látok sa začalo venovať už v 50. rokoch 20. storočia, keď boli objavené rastlinné vinca alkaloidy (vinkristín a vinblastín) a izolované cytotoxické podofylotoxíny [5]. Hlavným dôvodom, prečo sa záujem vedcov presunul od syntetických liečiv k prírodnej alternatíve je to, že prírodné látky sú prospešnejšie z hľadiska nežiadúcich účinkov a toxicity [6]. Aj napriek pokrokom v protinádorovej terapii sa stretávame s určitými nevýhodami u jednotlivých liečebných postupov, napríklad u chemoterapie, kedy podávanie niekoľkých chemoterapeutických látok vedie k tvorbe ROS, čo je jeden z eradikačných mechanizmov na zničenie nádorových buniek. Práve preto zameranie sa na ROS prostredníctvom antioxidantov môže priniesť pozitívne výsledky liečby. Jedným z pozitív môže byť napríklad to, že niekoľko chemopreventívnych látok v strave s antioxidačnými vlastnosťami môžu jednak zosilniť rádioterapiou vyvolané cytotoxické účinky na nádorové bunky a zároveň

tiež znížiť toxicitu na zdravé okolité tkanivá. Ďalšie pozitívum môže priniest individuálne poradenstvo ohľadom antioxidantov či doplnkov obsahujúcich antioxidanty onkologickým pacientom. Tí v dôsledku liečby čelia mnohým nežiadúcim účinkom, napr. chudnutie spôsobené nízkym príjmom výživy, strata chuti do jedla, ktoré možno obísť práve týmto spôsobom [7]. Preto sme sa v našej práci zamerali na *in vitro* skúmanie extraktov z papradí na bunkovú líniu SW480, čo je bunková línia kolorektálneho karcinómu, ktorý je v Českej republike, podľa odhadov GLOBOCANU 2020, druhým najčastejšie sa vyskytujúcim nádorovým ochorením u mužov a žien [8].

2. TEORETICKÁ ČASŤ

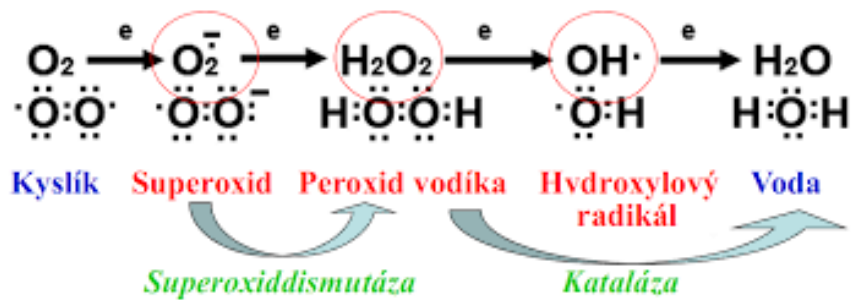
2.1. Reactive oxygen species (ROS) – reaktívne formy kyslíka

Ľudský organizmus je neustále vystavovaný rôznym faktorom produkujúcim voľné radikály či iné oxidanty. Reaktívne formy kyslíka (skratka ROS, prevzatá z anglického jazyka: „reactive oxygen species“), nazývané aj ako voľné kyslíkové radikály, sú čiastočne redukované alebo excitované formy atmosférického kyslíka [9]. Z chemického hľadiska sú to akékoľvek paramagnetické častice (atóm, molekula či ión), ktoré majú vo valenčnej vrstve jeden, prípadne viac nepárových elektrónov a sú schopné krátkodobej samostatnej existencie [10] ako látky tvorené jedným alebo viacerými atómami kyslíka, ktoré sú reaktívnejšie ako molekulový kyslík. Patria k najrozšírenejším typom radikálov vznikajúcich v ľudskom organizme [11] (Obr. 1).

2.1.1. Biochemický a biomedicínsky význam ROS

Za fyziologických podmienok sú ROS pod dohľadom obranných mechanizmov, ku ktorým patria antioxidantné enzýmy a antioxidanty, ako napríklad vitamín C, E alebo karotenoidy. Tento dohľad nad tvorbou voľných radikálov je veľmi dôležitý pre zaistenie normálne fungujúceho bunkového metabolizmu. Hromadenie voľných radikálov v organizme vedie k poškodeniu buniek v dôsledku oxidácie bielkovín, lipidov, nukleových kyselín a ďalších biomolekúl. Ich zvýšená tvorba súvisí aj so vznikom rôznych ochorení či s procesom starnutia [11].

Ak sa chce kyslík zúčastniť na oxidačných reakciách je nutné, aby sa aktivoval, napr. fotodynamickým procesom za vzniku reaktívneho singletového kyslíka s nestabilným elektrónovým párom, alebo postupnou redukciou jedným elektrónom. ROS možno odvodiť od základnej molekuly kyslíka tromi následnými jednoelektrónovými redukciami za vzniku superoxidového radikálu, peroxidu vodíka a hydroxylového radikálu, pričom v konečnej fáze vzniká voda [11] (Obr. 1).



Obr. 1 Štvorelektrónová redukcia kyslíka na vodu [12]

V živých organizmoch môžu vznikať aj ďalšie reaktívne formy kyslíka (Tab. 1):

Tab. 1 Charakteristika reaktívnych foriem kyslíka [11]

Reaktívna forma O	Symbol	Polčas	Vlastnosti
Superoxidový radikál	$\text{O}_2^{\cdot -}$	10^{-6} s	Slabý oxidant
Hydroperoxylový radikál	HO_2^{\cdot}		Silnejší oxidant ako $\text{O}_2^{\cdot -}$
Peroxid vodíka	H_2O_2	minúty	Oxidant, difúzia cez membrány
Hydroxylový radikál	OH^{\cdot}	10^{-9} s	Extrémne reaktívny, difúzia len na veľmi krátke vzdialenosti
Alkoxylový radikál	LO^{\cdot}	10^{-6} s	Menej reaktívny ako OH^{\cdot} , ale reaktívnejší ako ROO^{\cdot}
Peroxylový radikál	LOO^{\cdot}	10^{-2} s	Slabší oxidant, vysoká difúzia
Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$	10^{-6} s	Silný oxidant

Voľné radikály môžu byť pre organizmus prospešné, aj životu škodlivé. Čo sa týka prospešnosti, u vyšších rastlín sa zistilo, že ROS regulujú vývoj, diferenciáciu, redoxný potenciál, signalizáciu stresu, interakcie s inými organizmami, systémové reakcie a smrť buniek [13-18]. Naopak ich škodlivý potenciál spočíva v tom, že môžu vystupovať aj ako toxické vedľajšie produkty aeróbného metabolizmu a prispievať tak k javu nazývanému „oxidačný stres“. Tieto škodlivé produkty sú tvorené primárne v chloroplastoch, mitochondriách a peroxizómoch. Taktiež sú tvorené aj v iných bunkových kompartmentoch, ktoré obsahujú proteíny alebo molekulu s dostatočne vysokým redoxným potenciálom na excitáciu alebo darovanie elektrónu vzdušnému kyslíku. Odstraňované alebo detoxifikované sú potom radom antioxidačných enzýmov a antioxidantov [18]. Celý tento proces, od produkcie až po odstránenie ROS antioxidačnými mechanizmami prebieha v bunkách neustále, aby sa zabránilo niektorým z potenciálne toxických účinkov ROS, ktoré by mohli zahŕňať oxidáciu a poškodenie DNA, bielkovín a membrán [13-19]. Aj napriek škodlivosti ROS, úlohou antioxidačnej ochrany nie je ich úplná eliminácia vzhľadom k tomu, že kyslíkové radikály plnia aj množstvo dôležitých fyziologických funkcií [10].

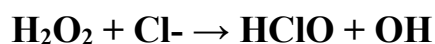
2.1.1.1. Priaznivé účinky ROS

Voľné radikály si okrem negatívnych účinkov zachovali aj pozitívny význam. V živých organizmoch majú nezastupiteľnú funkciu, samozrejme len v prípade, že ich koncentrácia v organizme je primeraná [20], že sú aktívne na správnom mieste a nie sú namierené proti vlastným biomolekulám [21,22]. Zohrávajú viacero významných úloh, medzi ktoré patrí aj ich nepostrádateľná účasť v systéme nešpecifickej imunity, v procese fagocytózy, ktorý je najdôležitejšou prekážkou šírenia patogénnych mikroorganizmov v tele hostiteľa. Tohto procesu sa zúčastňujú tzv. profesionálne fagocyty (neutrofily, makrofágy), ktoré využívajú voľné radikály kyslíka a dusíka ako zbraň proti patogénom a cudzorodým štruktúram [21-23]. Fáza fagocytózy, pri ktorej dochádza k tvorbe kyslíkových radikálov, sa nazýva „respiračné vzplanutie“. Na tomto jave sa podieľajú enzýmy NADPH – oxidáza a myeloperoxidáza.

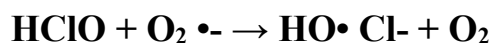
NADPH – oxidáza, ktorá je súčasťou plazmatickej membrány fagocytov, katalyzuje vznik superoxidu [24]:



Reakciou katalyzovanou superoxidodismutázou vzniká peroxid vodíka, ktorý následne reaguje s chloridovými iónmi za vzniku kyseliny chlórnej – reakciu katalyzuje myeloperoxidáza:



Vzniknutá kyselina chlórna s mohutným oxidačným účinkom je schopná zabíjať baktérie, plesne, parazity a tumorové bunky. Taktiež je schopná podieľať sa na vzniku ešte reaktívnejšieho hydroxilového radikálu:



Pozitívne účinky ROS možno pozorovať aj v ďalších oblastiach [21,23]:

- hydroxylový radikál pri biosyntéze cholesterolu a žlčových kyselín, pri detoxikácii xenobiotík a ďalších liekov
- peroxid vodíka pri oxidácii jódidu na jód v štítnej žľaze
- oxid dusnatý a jeho vazodilatačný efekt pri erekcii, ako neurotransmitter, regulátor imunitných pochodov
- superoxid a peroxid vodíka pri oplodňovaní vajíčka spermiou – superoxid narúša membránu vajíčka, čím umožňuje vstup spermie a peroxid zabraňuje ďalšiemu prenikaniu spermií do vajíčka

Vďaka svojim vlastnostiam majú dobré predpoklady pre účasť na bunkovej signalizácii ako signálne molekuly – druhí poslovia prevádzajúci extracelulárne signály za účelom vytvorenia špecifickej bunkovej imunity [25]. Najčastejšie sa jedná o peroxid vodíka, ktorý vzniká zo superoxidu pri reakcii katalyzovanej superoxidodismutázou [26].

2.1.1.2. Negatívne účinky ROS

V bunkách živých organizmov sa nachádza mnoho zdrojov voľných radikálov s toxickými účinkami. Stav narušenej rovnováhy systému oxidant – antioxidant v prospech prooxidanta možno nazvať ako oxidačné preťaženie, resp. oxidačný stres [27].

Oxidačný stres je v medicíne a biológii dôležitý pojem. S týmto pojmom prvýkrát prišiel nemecký doktor a biochemik Helmut Sies v roku 1985. Oxidačný stres definoval ako stav, kedy hladiny ROS významne prevyšujú kapacitu antioxidantných obranných látok, čo v konečnom dôsledku vedie k poškodeniu biologického systému. Vysoká hladina ROS v organizme môže byť spôsobená buďto ich zvýšenou tvorbou, alebo nízkou aktivitou antioxidantných látok [28]. V živých systémoch môžu vznikáť napríklad fotodynamickou reakciou či v redoxných reakciách. Ionizujúce žiarenie (RTG, rádioaktívne či UV) má dostatok energie na to, aby rozštiepilo väzbu O-H vo vode, za vzniku hydroxylového a vodíkového radikálu, ktoré častokrát môžu viesť k poškodeniu kože či rakovine. Tvorbu radikálov môžu navodiť aj viaceré exogénne faktory - chemické látky (ozón, CCl₄, pesticídy), medikamenty, chemoterapeutiká a podobne. V živých systémoch však prevláda tvorba radikálov v rámci redoxných reakcií, ktoré prebiehajú buď samovoľne, alebo sú katalyzované enzýmami.

Hlavným zdrojom voľných radikálov v organizme je elektrónový transportný systém lokalizovaný v bunkových organelách, nazývaných mitochondrie. Mitochondrie, tzv. bunkové elektrárne (zaisťujúce tvorbu energie vo forme ATP), sú organely ohraničené membránami (vonkajšia a vnútorná). Membrána je tvorená fosfolipidovou dvojvrstvou, ktorej súčasťou sú okrem lipidov aj proteíny, cholesterol či oligosacharidový reťazec. Každá z týchto zložiek sa môže poškodiť vplyvom ROS [11].

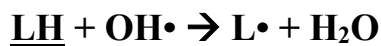
Okrem poškodenia biomolekúl zohráva nadmerná produkcia ROS významnú úlohu aj pri zápalových procesoch, urýchľuje starnutie a prispieva tiež k rôznym chorobným stavom, ako napríklad pľúcne ochorenia, ateroskleróza a ďalšie, s ňou súvisiace kardiovaskulárne choroby, onkologické a neurodegeneratívne ochorenia (Parkinson a Alzheimer), ochorenia GITu, ľadvín, cievna mozgová príhoda, diabetes a ďalšie [29]. Toto riziko sa zvyšuje s vekom, keďže starší ľudia sú náchylnejší na oxidačný stres v dôsledku poklesu účinnosti ich endogénnych antioxidačných mechanizmov [30]. K riziku prispieva aj nezdravý životný štýl, napríklad strava a fajčenie [31].

2.1.1.2.1. Oxidačné poškodenie lipidov - lipidová peroxidácia (LPO)

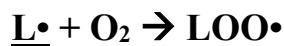
Jedná sa o najvýraznejšie poškodenie spôsobené voľnými radikálmi. Princíp poškodenia spočíva v tom, že radikál, napr. $\text{OH}\cdot$ vzniknutý Fentonovou reakciou:



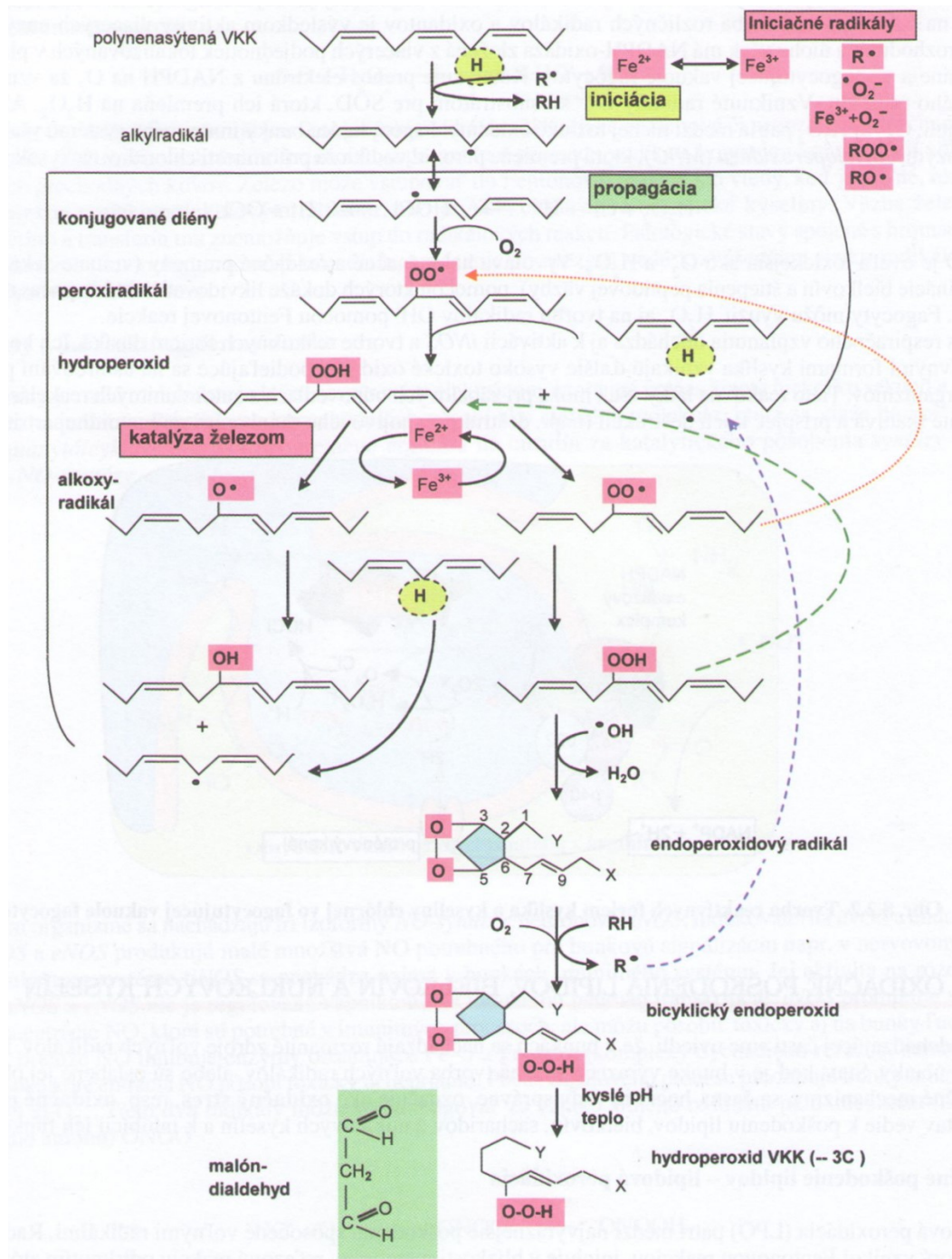
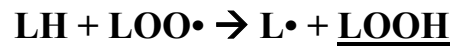
zapríčiňuje reťazovú reakciu v blízkosti mitochondriálnej membrány, pri ktorej dochádza k odtrhnutiu vodíka z uhl'ovodíkového reťazca lipidovej membrány (LH). Tejto reakcie sa zúčastňujú hlavne polynenasýtené vyššie karboxylové kyseliny.



Vzniknutý lipidový radikál ($\text{L}\cdot$) následne reaguje s O_2 a výsledkom je peroxylový radikál:



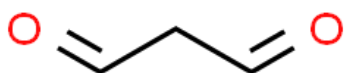
Peroxylový radikál môže potom ďalej oxidovať membránové proteíny, cholesterol, alebo môže napádať ďalšie polyneenasýtené mastné kyseliny, pričom vzniká lipidový peroxid LOOH:



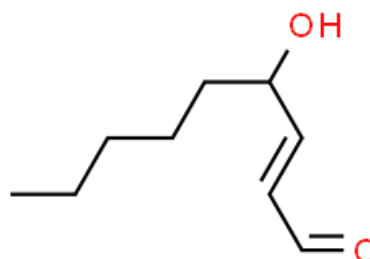
Obr. 2 Oxidačné poškodenie lipidov neenzýmovou cestou a štiepenie polyneenasýtených vyšších karboxylových kyselín vplyvom voľných radikálov [11]

S lipidovým peroxidom vzniká aj ďalší lipidový radikál, ktorý môže znova vstupovať do reakcie. Táto reťazová reakcia sa tým pádom šíri ďalej a pokračuje až do momentu terminácie reakcie. Výsledkom LPO je pokles fluidity a strata celistvosti (integrity) membrány, čím sa membrána stáva priepustná aj pre látky fyziologicky nepriepustné. Vzniknuté peroxylové radikály poškodzujú membránové proteíny a dochádza tak k inaktivácii receptorov, enzýmov a prenášačov. Navyše narušenie integrity membrány môže viesť k ďalšej tvorbe voľných radikálov a jedná sa tak o akýsi začarovaný kruh. Degradáciou lipidových peroxidov (LOOH) vznikajú látky ako etán či propán. Ich vznik signalizuje, že v organizme prebiehajú nejaké patologické procesy súvisiace práve s voľnými radikálmi – zápalové stavy (akútne a chronické), ischemicko-reperfúzne poškodenie (IRP), diabetes mellitus alebo ateroskleróza.

Konečné produkty LPO sú malondialdehyd (Obr. 3) a 4-hydroxynonenal (Obr. 4) – látky, ktoré môžu mať cytotoxické, mutagénne, genotoxické účinky, ktoré môžu inhibovať syntézu bielkovín a DNA, inaktivovať enzýmy či modifikovať medzibunkovú komunikáciu pri ich reakcii s proteínmi, peptidmi, lipidmi, nukleovými kyselinami (NK) [11].



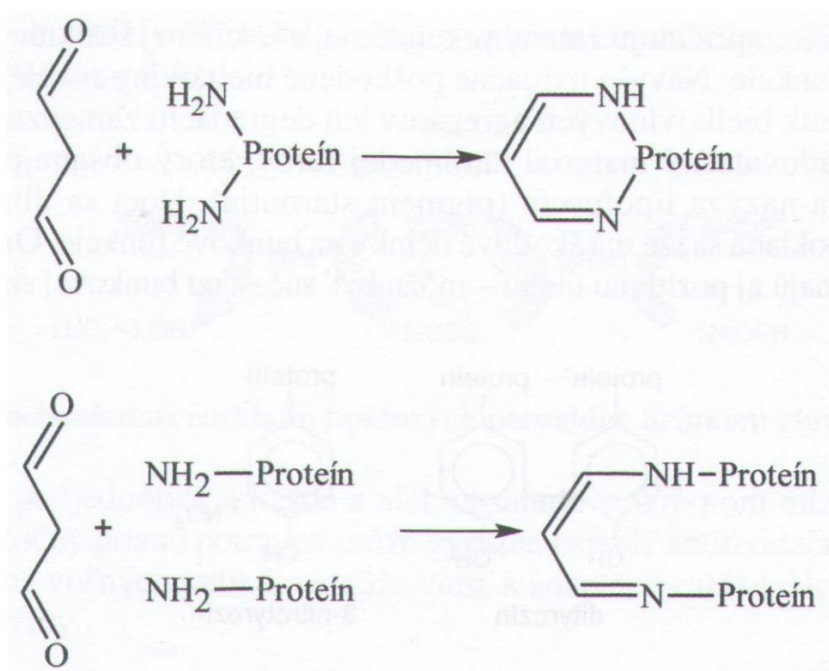
Obr. 3 Malondialdehyd (MDA) [32]



Obr. 4 4-hydroxynonenal [33]

2.1.1.2.2. Oxidačné poškodenie proteínov

K poškodeniu bielkovín môže dôjsť po ich napadnutí radikálmi kyslíka a dusíka. Konkrétne sa jedná o napadnutie bočných reťazcov aminokyselín prítomných v bielkovinách. Najviac citlivé sú aminokyseliny cysteín, methionín, prolín, arginín, lyzín a aromatické AMK (Obr. 5).



Obr. 5 Reakcia MDA s bielkovinami, ktorá vedie ku vzniku vnútro a medzimolekulových priečných väzieb [11]

Oxidačné poškodenie bielkovín možno zistiť pomocou indikátorov. Jedným z nich je koncentrácia karbonylových skupín. Karbonylové skupiny vytvárajú s -NH₂ skupinami bielkovín (aminoskupinami) tzv. Schiffove bázy, pričom vznikajú priečne väzby a proteínové agregáty. Tie môžu vznikáť aj pri oxidácii -SH skupín dvoch cysteínových zvyškov za vzniku disulfidovej väzby. Rovnako je to aj pri kombinácii dvoch tyrozínových radikálov, kedy vzniká dityrozín ako ďalší indikátor detekovateľný z moču.

Oxidačné modifikácie vedú k zmene sekundárnej a terciálnej štruktúry bielkovín, čo v konečnom dôsledku spôsobuje až zánik ich biologickej funkcie. Takto poškodené bielkoviny potom oveľa rýchlejšie podliehajú proteolytickej degradácii.

Naopak, vznikom agregátov sa degradácia proteínov nekoná a tieto nefunkčné agregáty sa hromadia v bunke. Tento nedegradovateľný materiál tvorený oxidačne poškodenými bielkovinami a produktami LPO je hnedožltej farby a označujeme ho ako lipofuscín, pigment starnutia. Predpokladá sa, že má nepriaznivé účinky na funkcie bunky [11].

2.1.1.2.3. Oxidačné poškodenie DNA

Poškodenie nositeľky genetickej informácie bunky môže nastať reakciou s koncovými produktami LPO (malondialdehyd a 4-hydroxynonenal), alebo priamou reakciou DNA s voľnými radikálmi. Reakcia genotoxických aldehydov s dusíkatými bázami ako je adenín a guanín, prispieva ku vzniku cyklických produktov. Všetky stavebné jednotky DNA môžu reagovať s voľnými radikálmi, pričom sa poškodzujú nielen bázy purínové a pyrimidínové, ale aj monosacharid deoxyribóza. Najznámejšia oxidačná reakcia je adícia $\text{OH}\cdot$ na uhlík C_8 – vzniká 8-hydroxyguanín.

Podobne ako poškodenie bielkovín, aj poškodenie DNA je možné zistiť pomocou indikátora – meranie 8-hydroxydeoxyguanozínu v moči. Oxidačne poškodená DNA je príčinou vznikajúcich mutácií a karcinómu, taktiež príčinou starnutia [11].

2.1.2. Antioxidanty a antioxidačná ochrana organizmu

Evolúcia organizmov v prostredí bohatom na zdroje voľných radikálov viedla k vývoju viacerých antioxidačných obranných systémov na ochranu životne dôležitých biomolekúl pred ROS [28]. Okrem toho je obrannou líniou aj množstvo zložiek, ktoré organizmus prijíma potravou či potravinovými doplnkami.

Mechanizmy ochrany organizmu pred škodlivým vplyvom voľných radikálov možno rozdeliť na [11]:

1. prevencia tvorby voľných radikálov
2. zastavenie nežiadúcich oxidačných reakcií zachytávaním
3. premenou voľných radikálov na menej reaktívne látky
4. reparácia poškodených molekúl a bunkových štruktúr
5. expresia génov, ktoré kódujú antioxidanty

Termín antioxidant možno definovať ako každú látku, ktorá dokáže zabrániť, znížiť alebo napraviť poškodenie cieľovej biomolekuly, ktoré je spôsobené ROS. V biológii a medicíne existuje veľa rôznych druhov antioxidantov, ktoré sú klasifikované rôznymi spôsobmi [28].

2.1.2.1. Enzýmové antioxidanty

Medzi hlavné endogénne antioxidantné enzýmy patrí superoxidodismutáza, kataláza a glutationperoxidáza.

Superoxiddismutáza (SOD) je v prvej línii antioxidantného systému. Je to metaloproteín katalyzujúci premenu superoxidového radikálu na H_2O_2 a vodu. Existujú 3 izoformy v ľudskom organizme:

- Cu^+/Zn^{2+} -SOD (SOD1) – v cytosole
- Mn^{2+} -SOD (SOD2) – v mitochondriách
- EC-SOD (SOD3) – v extracelulárnej matrix, obsahuje tiež ióny Cu^+ a Zn^{2+} ako SOD1

Prítomnosť a správna koordinačná väzba iónov kovov je dôležitá pre funkciu enzýmu.

Kataláza je enzým, ktorý sa podieľa na premene H_2O_2 na O_2 a vodu.

Glutatiónpoxidáza (GPx) je enzým prítomný najmä v cytosole a mitochondriách, katalyzujúci rozklad H_2O_2 a ďalších peroxidov pomocou glutatiónu (GSH), NADPH a enzýmu glutatiónereduktázy (GRed) – ten redukuje oxidovanú formu glutatiónu (GSSG) na GSH. GPx sa skladá zo štyroch podjednotiek, pričom každá obsahuje esenciálny mikroprvok selén. Nedostatočný príjem selénu v potrave znižuje antioxidantnú obranyschopnosť organizmu [11].

2.1.2.2. Neenzýmové proteínové antioxidanty

Za neenzýmové proteínové antioxidanty možno považovať bielkoviny, ktoré na seba viažu ióny železa a medi – napríklad transferín, laktoferín, feritín a ceruloplazmín. Do tejto skupiny antioxidantov tiež patria bielkoviny s thiolovými skupinami schopné eliminovať voľné radikály podobne ako GSH. Významným extracelulárnym antioxidantom tohto typu je albumín, ako naprostá väčšina antioxidantnej kapacity krvnej plazmy, spolu s kyselinou močovou. Mimo toho, že dokáže na seba viazať ióny medi, obsahuje tiež -SH skupinu, vďaka ktorej vie detoxikovať peroxid vodíka či kyselinu chlórnu [11].

2.1.2.3. Neenzýmové nízkomolekulové antioxidanty syntetizované v organizme

Táto skupina antioxidantov je neobyčajná. Patria sem látky, ktoré okrem funkcie antioxidantov plnia aj iné biologické funkcie (hormonálna funkcia), prípadne sa môže jednať o degradačné produkty bunkového metabolizmu. Ich účinky boli dokázané *in vitro* [11].

Tab. 1 Neenzýmové antioxidanty [11]

Antioxidanty syntetizované v organizme	Antioxidanty v potrave
Bilirubín	Kyselina askorbová – vitamín C
Glutatión, tioredoxín	Vitamín E
Kyselina močová	Karotenoidy
Koenzým Q	Rastlinné fenoly (catechin, quercetin)
Kyselina lipoová	
Melatonín	
Pohlavné hormóny	
2-oxokyseliny	
Dipeptidy obsahujúce His	
Albumín	

2.1.2.4. Nízkomolekulové antioxidanty získané potravou

Medzi antioxidanty prijímané potravou patria predovšetkým vitamíny a stopové prvky.

Vitamín C (kyselina askorbová) – vo vode rozpustný vitamín nielen s antioxidantnými, ale aj s prooxidačnými účinkami. Podstatou antioxidantného účinku je, že askorbylový radikál vznikajúci pri reakcii $\bullet\text{O}_2^-$ a $\bullet\text{OH}$ nie je dostatočne reaktívny. Oxidovaný dehydroaskorbát vznikajúci reakciou dvoch askorbylových radikálov sa môže redukovať späť na askorbát pomocou GSH a NADPH, alebo dochádza k jeho degradácii. Prooxidačný efekt má vitamín C *in vitro*, kedy v prítomnosti železa podnecuje tvorbu H_2O_2 a $\bullet\text{OH}$, avšak za fyziologických podmienok ešte nie je úplne jasný tento jeho účinok [11].

Vitamín E – vitamín rozpustný v tukoch s dominantným postavením medzi antioxidantmi, hlavne forma – α -tokoferol. Okrem toho, že vychytáva kyslíkové oxidanty, jeho významnou úlohou je terminácia LPO v membránach a lipoproteínoch. Podstata spočíva v tom, že peroxylové radikály premieňa na lipidové peroxidy a sám sa mení na radikál tokoferolylový. Tento radikál už však nie je reaktívny a ani nepokračuje v lipidovej peroxidácii. Za pomoci vitamínu C alebo GSH sa potom vracia do pôvodnej podoby - α -tokoferol. Pri tejto regenerácii vitamínu E vzniká pre zmenu radikál kyseliny askorbovej, ktorý sa následne detoxikuje [11]. Spolupráca hydrofilných a lipofilných vitamínov je v antioxidantnej ochrane organizmu veľmi dôležitá, lebo práve vďaka takejto spolupráci sa radikálová podoba vitamínu dostáva do vodného prostredia, kde sa buď ďalej premieňa, alebo sa z organizmu eliminuje [11].

Karotenoidy – dôležitú úlohu zohráva β -karotén, ako prekurzor vitamínu A. Jeho úlohou je vychytávanie peroxylových radikálov a tiež detoxikácia singletového kyslíka – absorbcia excitačnej energie a vrátenie molekuly do základného stavu. Tieto antioxidanty nazývame aj ako tzv. zhášače [11].

Flavonoidy – sú súčasťou červených, modrých a žltých pigmentov v rastlinách. Potravinovým zdrojom je najmä ovocie, zelenina, zelený a čierny čaj či červené víno. Najviac rozšírené flavonoidy sú kamferol, kvercetín a rutín. Ich účinok je rôzny – inhibícia LPO, vychytávanie radikálov, chelátory železa [11].

Syntetické antioxidanty – jedná sa predovšetkým o chelatovorné látky s využitím pri intoxikácii ťažkými kovmi – dimerkaprol (otrava As, Hg), penicilamín (otrava Cu, zabránenie jeho kumulácie), EDTA (otrava Pb), deferoxamín (otrava Fe). Môžu pôsobiť aj ako vychytávače voľných radikálov (N-acetylcysteín pri intoxikácii paracetamolom) [11].

Sekundárne obranné mechanizmy – enzýmy podieľajúce sa na reparácii poškodenej DNA a tiež rôzne lipo a proteolytické enzýmy, ktoré odstraňujú oxidačne poškodené lipidy a proteíny. Hlavnou cestou degradácie týchto poškodených zložiek je proteolytický komplex – proteazóm [11].

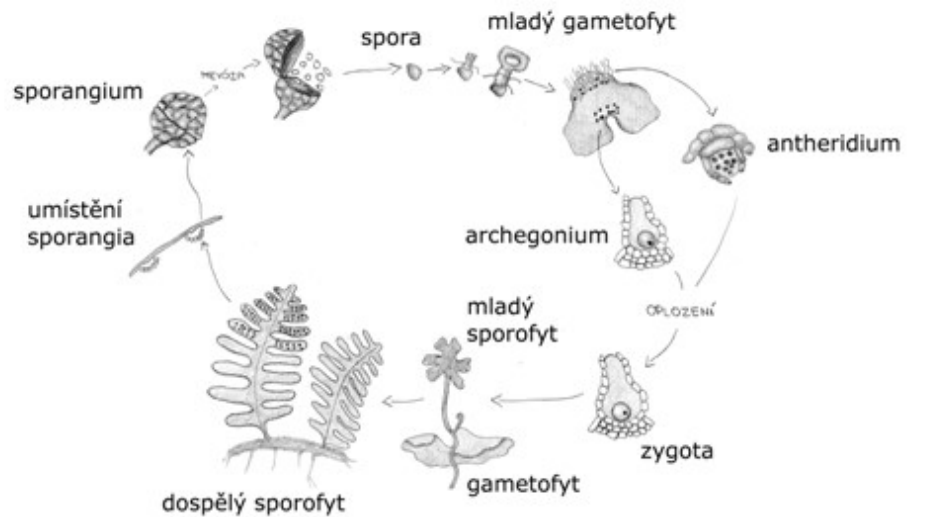
2.2. Vyššie rastliny

Vyššie rastliny (*Cormobionta*) sú zväčša autotrofné rastliny, ktoré sa vyvinuli z nižších rastlín. V priebehu evolúcie teda opustili vodné prostredie a začali sa prispôbovať suchozemskému životu. Ich telo tvorí tzv. cormus, ktorý je diferencovaný na vegetatívne a reprodukčné orgány a má zložitejšiu stavbu než telo nižších rastlín (tj. stielka - thallus). Keďže u týchto rastlín došlo k ich presunu z vody na suchú zem, musel vzniknúť akýsi systém transportu vody s rozpustenými látkami po celom tele. Tento systém sa nazývajú vodivé pletivá, ktoré v rastlinných orgánoch vytvárajú cievne zväzky. Telá vyšších rastlín sa skladajú z diferencovaných buniek. Tie vytvárajú pletivá a pravé orgány – koreň, stonka a list. Delíme ich na dve skupiny - výtrusné rastliny, rozmnožujúce sa výtrusmi a semenné rastliny, ktoré sa rozmnožujú semenami [34].

2.2.1. Výtrusné rastliny

Výtrusné rastliny (*Sporophyta*) sú starobylou skupinou rastlín, ktorá sa vyvinula z nižších rastlín (zelené riasy). Rozmnožovacia funkciu u nich plnia výtrusy. V ich životnom cykle sa striedajú dve životné štádiá – rodozmena - striedanie pohlavnej a nepohlavnej generácie. Nepohlavná generácia – sporofyt - vytvára charakteristické reprodukčné orgány nazývané výtrusnice (sporangia). Tie produkujú výtrusy (spóry), ktoré v zemi klíčia a vyrastá pohlavná generácia - gametofyt (prokel).

Prokel je zväčša obojpohlavný a produkuje obe gaméty, aj vajíčka v archeogónoch, aj spermie v anterídiách. Oplodnenie si vyžaduje vodné prostredie, pri ktorom vzniká zygóta ($2n$). Výsledkom je sporofyt s výtrusnicou, v ktorej vznikajú výtrusy [34].



© Biomach

Obr. 6 Rodozmena rastlin [35]

Medzi výtrusné rastliny (*Sporophyta*) patria tieto oddelenia [34]:

1. Oddelenie: **RYNIORASTY** (Ryniophyta)
2. Oddelenie: **MACHORASTY** (Bryophyta)
3. Oddelenie: **PLAVÚŇORASTY** (Lycopodiophyta)
4. Oddelenie: **PRASLIČKORASTY** (Equisetophyta)
5. Oddelenie: **SLADIČORASTY** (Polypodiophyta)

2.2.1.1. Paprad'orasty

Súhrnným názvom paprad'orasty sa označuje posledná skupina výtrusne sa rozmnožujúcich rastlín. Sú najstaršie z prvohôr, ich vývoj dosiahol vrchol v období druhohôr. Za ich predchodcov môžeme považovať prvé zelené suchozemské rastliny. So životom na suchej zemi sa ich telá viac a viac rozlišovali a vznikli rastové a vyživovacie ústroje s cievnymi zväzkami. Taktiež sa vytvorili aj korene, ktorých úlohou je upevniť rastlinu v pôde a zaistiť jej prísun živín, ktoré sú pre existenciu nevyhnutné. Postupne vznikla aj nadzemná byľ s listami.

Paprade mierného klimatického pásma sú tieňomilné byliny. Najznámejšia, najhojnejšie zastúpená u nás a farmaceuticky dôležitá je mohutná paprad' samčia, rastúca v tienistom a vlhkom prostredí. V tropickom pásme nájdeme aj stromovité druhy, podobné už vyhynutým druhom pochádzajúcich z prvohorných močaristých pralesov [36].

2.2.1.1.1. Paprade v liečebnej praxi, vo vede a výskume

Rastliny boli už odjakživa inšpiráciou pre nové lieky. Vďaka tomu, že sú bohatým zdrojom zlúčenin s rôznou farmakologickou aktivitou sa používali v ľudovom liečiteľstve a ich účinky sa využívajú aj dnes, v rámci podpory ľudského zdravia pri liečbe ochorení [37]. K týmto rastlinám patrí aj skupina cievnatých suchozemských rastlín, ktorá hraje dôležitú rolu v zdraví a strave - paprade [38]. Ich využitie v liečebnej praxi je rôznorodé. Používajú sa pri bežných ochoreniach vďaka ich očistnému a antibakteriálnemu účinku, na liečbu žalúdočných a renálnych infekcií, ako diuretiká, analgetiká (na bolesť hlavy, žalúdka, GITu) a protizápalové látky [39]. Sú veľmi zaujímavé aj z hľadiska reprodukčnej biológie a produkcie špecifických sekundárnych metabolitov, vďaka čomu sa stali stredobodom pozornosti pre vedu a výskum, ktoré sa zaoberajú práve ich bioaktívnymi zložkami [40,41].

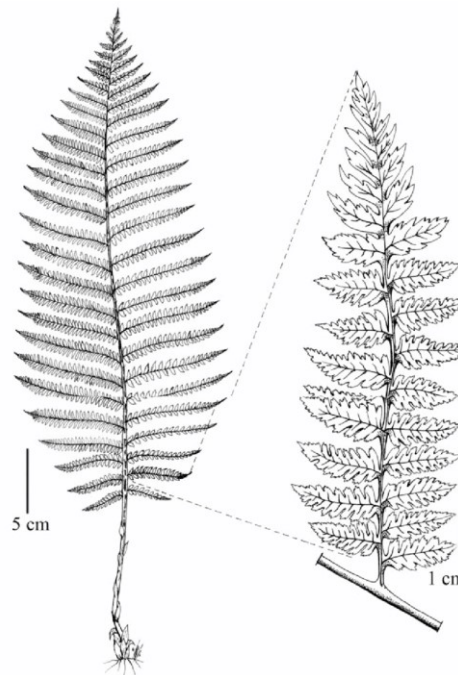
Existuje niekoľko štúdií zameraných na obsahové látky papradí. Jedná sa o širokú škálu fytochemikálií, napr. alkaloidy, flavonoidy, polyfenoly, karotenoidy, terpenoidy a steroidy, ktoré fungujú ako prírodné inhibítory enzýmov a sú zodpovedné za protizápalové, antimikrobiálne, antivírusové a antioxidačné vlastnosti vo vzťahu k voľným radikálom [40-42].

Problematike voľných radikálov a antioxidačných vlastností sa venuje aj experimentálna časť tejto diplomovej práce. Zameraná je na štyri konkrétne druhy papradí a to *Athyrium filix – femina*, *Dryopteris dilatata*, *Dryopteris borreri* a *Blechnum spicant*.

2.2.1.1.2. *Athyrium filix – femina* (Papradka samičia)

Papradka samičia patrí medzi trváce byliny z čeľade papradkovité (*Athyriaceae*). Jedná sa o veľkú, až 1m vysokú papraď. Typický je hrubý podzemok pokrytý tmavohnedými plevinami, ktoré pokrývajú aj rozšírené bázy listových stopiek. Listy sú veľké a rastú v bohatej prízemnej ružici. Majú podlhovasto kopijovité, dvojito až trojito perovito zložené čepele listov, ktoré sú na vrchole končisté. Rastlina sa rozmnožuje výtrusmi, ktoré vytvárajú tzv. kôpky. Kôpky výtrusníc sú veľmi početné a objavujú sa každoročne (júl – september) na rube každého listu. Výtrusnice sú drobné, čiarkovité.

Papradka je spoľahlivým ukazovateľom podmáčaných lesných pôd. Veľmi bujne rastie v presvetlených lesoch, kde je častokrát aj dominantnou rastlinou, avšak v plnom svetle sa jej nedarí. Je cirkumpolárnym horským druhom, ktorý nájdeme v severnej Afrike, v Európe, v ázijských horách či v Severnej Amerike, vždy v lesných oblastiach [43].

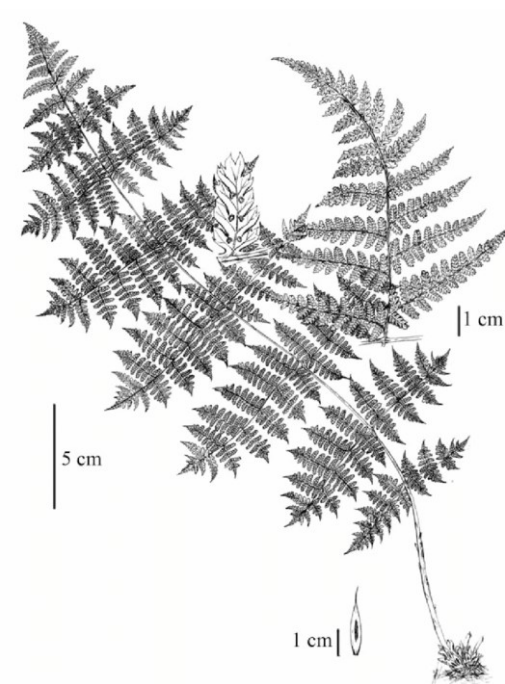


Obr. 7 *Athyrium filix-femina* [44]

2.2.1.1.3. *Dryopteris dilatata* (Paprad' rozložená)

Paprad' rozložená je vytrvalá, výtrusná bylina z čeľade paprad'ovité (*Dryopteridaceae*). Pre rastlinu je charakteristický krátky, plazivý podzemok a listy rozložené do riedkej ružice, dlhé až 100cm. Listy sú perovité, pričom na rube každého listu sa vytvárajú kôpky výtrusníc. Ľahko sa lámu a dokážu prezimovať.

Paprad' najlepšie prosperuje v tienistých až polotienistých stanovištiach, prevažne vo vlhkých horských oblastiach. Preferuje bukové a smrekové lesy, vlhké skaly v roklinách či pobrežné jelšiny. Vyskytuje sa naprieč celou Európou, rovnako tiež v Severnej Amerike. Prakticky vôbec sa nepestuje. Ak áno, zvykne sa vysádzať na sever orientované strany budov, kde je obvykle hlboký tieň. Darí sa jej aj pod korunami stromov [45].



Obr. 8 *Dryopteris dilatata* [44]

2.2.1.1.4. *Dryopteris borrieri* (Paprad' rezavá)

Paprad' rezavá patrí do čeľade paprad'ovitá (*Dryopteridaceae*). Je vytrvalá veľká paprad', ktorá sa vyznačuje jedno alebo viachlavým podzemkom. Typické sú lesklé tmavozelené listy s čepeľou dvakrát sperenou, prezimujúce. Na ich rube sa nachádzajú výtrusnice slúžiace na rozmnožovanie.

Tento rastlinný druh preferuje tienisté pôdy humózne, listnaté či zmiešané lesy. Nachádza sa tiež na strmých balvanistých svahoch, na dne rokĺn či na okraji lesných ciest. V rámci Českej republiky ju nachádzame najmä v horských a podhorských oblastiach Moravy a Sliezska [46]. Považuje sa za vzácny druh horskej paprade, ktorý je aj zaradený do zoznamu ohrozených rastlín v rámci Českej republiky [47].

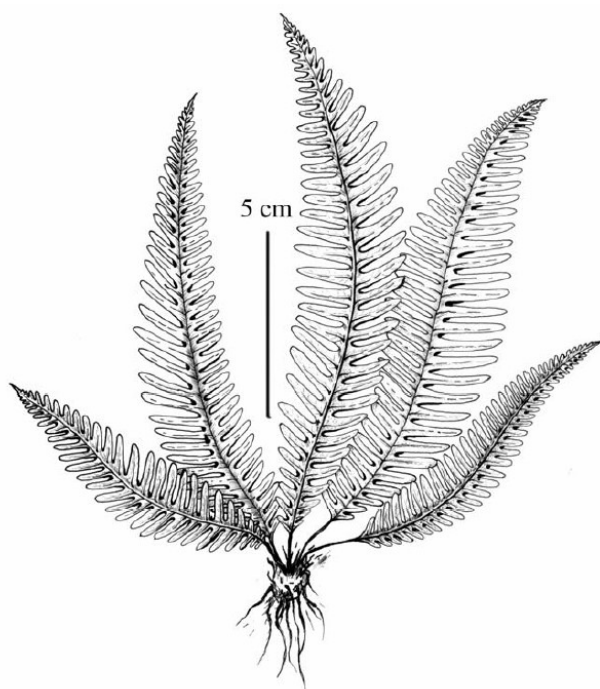


Obr. 9 Dryopteris borrieri [48]

2.2.1.1.5. *Blechnum spicant* (Rebrovka rôznolistá)

Rebrovka rôznolistá je stálezelená, vytrvalá papraď s krátkym červenohnedým podzemkom, ktorý je na bázach mladých listov pokrytý žltohnedými až hnedými plevinami. Rastlina púta pozornosť svojimi sýto zelenými, lesklými, kožovitými listami, ktoré rastú stopkovito, sú od seba funkčne oddelené a rastú v hustých trsoch [49]. Na Rebrovke rozišujeme dva typy listov. Neplodné listy, ktoré previsujú k zemi, sú naplosko rozložené a dokážu prezimovať do nasledujúceho roku a plodné listy, ktoré naopak vyrastajú vzpriamene. Na ich spodnej strane vyrastajú výtrusnice, ktorých výtrusy dozrievajú v priebehu leta (jún – júl). Po dozretí výtrusov tieto listy odumierajú [43].

Výskyt Rebrovky sa viaže na kyslé pôdy s dostatočnou nielen pôdnou, ale aj vzdušnou vlhkosťou. Môžeme ju nájsť v biotopoch od smrekových lesov, rašelinných borín, cez bukové lesy až po hlboké skalné rokliny s klímou inverzného charakteru. Jedná sa o druh tienistých stanovišť, ktorý sa vyskytuje v Európe, východnej Ázii, Severnej Amerike, Afrike, na Kanárskych ostrovoch či v krajinách Blízkeho východu. V Českej republike sa vyskytuje predovšetkým v montánnych oblastiach [49].



Obr. 10 *Blechnum spicant* [44]

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom mojej diplomovej práce bolo:

- 1) Stanoviť antiproliferatívny účinok vybraných extraktov z papradí na nádorovú líniu SW480
- 2) Stanoviť vplyv extraktov z papradí na tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS)

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Materiál a chemikálie

- Bunková línia SW480 – (ATCC, UK)
- DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle's médium) – (Sigma-Aldrich, ČR)
- FBS – fetálne bovinné serum - (Lonza, ČR)
- HEPES – 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid - (Sigma-Aldrich, ČR)
- Penicilín/Streptomycín – (Lonza, ČR)
- PBS - fosfátový pufr – (Sigma-Aldrich, ČR)
- Trypsin-EDTA – (Lonza, ČR)
- Trypanová modrá – (Biotech, ČR)
- DMSO – dimethylsulfoxid - (Sigma-Aldrich, ČR)
- WST(s)-1 - Water-soluble Tetrazolium salts - (Sigma-Aldrich, ČR)
- H₂DCF-DA – 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetat - (Sigma-Aldrich, ČR)
- HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution - (Sigma-Aldrich, ČR)
- TBHP - terc-butyl hydroperoxide - (Sigma-Aldrich, ČR)
- Bežné chemikálie čistoty p.a.

4.2. Pomôcky a prístroje

Pomôcky

Sterilné (plastové) kultivačné nádobky, jednorazové pipety sterilné (5, 10 ml), manuálne a automatické pipety (jedno a multikanálové), špičky (sterilné a nesterilné), pipetovač, 96-jamkové doštičky, vaničky, kadičky, mikroskúmvky, Bürkerova komôrka, jednorazové rukavice, stojan na skúmvky, kahan.

Prístroje

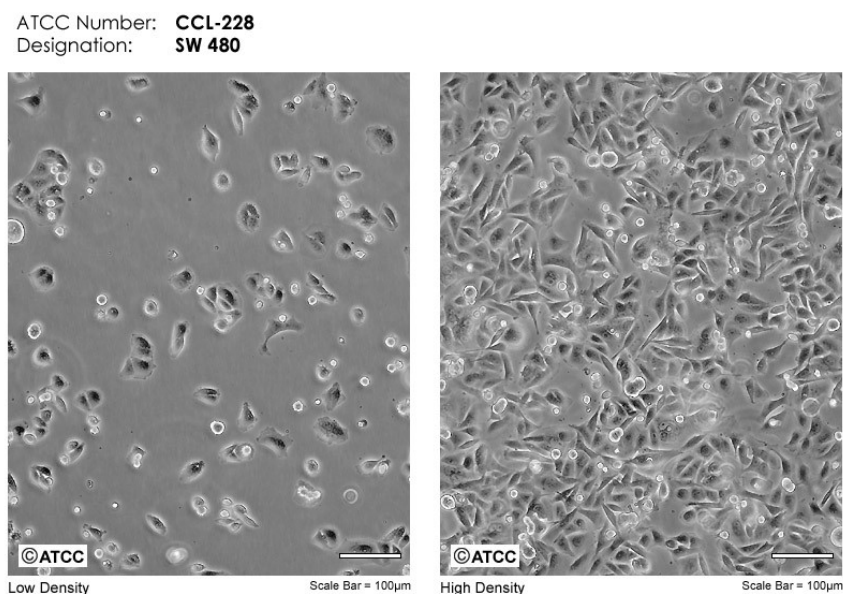
Laminárny box (BioAir AURA 2000 M.A.C.), CO₂ inkubátor (Heraeus Heracell 150), mikroskop (Nikon Eclipse TS 100), vodná lázeň (Memmert), doštičkový reader (Tecan Infinite M 200).

4.3. METÓDY

4.3.1. Bunkové línie

V experimentálnej časti diplomovej práce bola použitá bunková línia SW480 (Obr. 11), pôvodne izolovaná z nádorového tkaniva 50 ročného muža s diagnostikovaným kolorektálnym adenokarcinómom. Od tejto línie bola neskôr odvodená ďalšia, a to SW620 bunková línia, získaná z metastatického depozita, ktorým boli lymfatické uzliny rovnakého muža.

V súčasnosti sa pre experimentálne účely využíva banka bunkových kultúr ATCC (American Type Culture Collection), odkiaľ sa bunky získavajú a kde sú tieto bunky pestované za presne stanovených podmienok nevyhnutných pre ich rast [50].



Obr. 11 Nádorová línia SW480 [51]

4.3.2. Kultivácia buniek

Na kultiváciu buniek SW480 boli použité sterilné kultivačné nádobky, pričom samotná kultivácia prebiehala v inkubátore za presne stanovených podmienok – teplota 37°C, minimálne 5% obsah CO₂ a 90% relatívna vlhkosť.

4.3.3. Kultivačné médium

Vo všeobecnosti platí, že pre prácu s bunkovými kultúrami je veľmi dôležité nastavenie kultivačných podmienok takých, aby čo najviac napodobňovali prostredie fyziologické (*in vivo*). Tieto podmienky možno doceliť výberom správneho kultivačného média. Výber je vždy empirický, pričom sa vychádza buď zo skúseností, alebo z údajov publikovaných inými laboratóriami. Správnosť výberu je nutnosťou pre dosiahnutie správnej kultivácie.

Kultivačné médium je substrát poskytujúci výživu a vhodné podmienky *in vitro*. Jedná sa o vodný roztok obsahujúci mnoho, niekedy aj niekoľko desiatok látok, ktoré sú potrebné pre rast a delenie buniek. Medzi tieto látky radíme napr. anorganické soli, ktoré sa podieľajú na udržiavaní osmotického tlaku a pH, ďalej pufr, ktorého úlohou je udržať stále pH. Okrem toho sú veľmi dôležité aj látky slúžiace ako zdroj energie pre bunky. K takýmto látkam patrí glukóza, lipidy a mastné kyseliny, proteíny a takisto aj vitamíny, stopové prvky. Možný je aj prídavok antibiotika či krvného séra, ktoré vedia vylepšiť zloženie média. Najpoužívanejšie krvné sérum je fetálne bovinné sérum (FBS). Toto sérum predstavuje zdroj rastových faktorov a bielkovín. Obsahuje tiež inhibítory proteáz, vitamíny a stopové prvky. FBS má však aj svoje nevýhody, ako napríklad vyššie riziko prenosu infekcií na bunky. Táto problematika sa preto rieši využitím bezsérových kultivačných médií, ktoré sú síce drahšie, no majú komplexnejšie zloženie oproti médiu klasickému. Ich nevýhodou je však horší rast bunkových kultúr [52].

V našich experimentoch bolo použité kultivačné médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) s vysokým obsahom glukózy (4,5 g/l) a L-glutamínu. Pred použitím sa však muselo správne pripraviť. K 450ml DMEM high glucose sa pridalo 50ml FBS, 5ml HEPES pufru a 5ml ATB penicilín/streptomycín. Hotové médium sa dôkladne premiešalo a uložilo na tmavé a chladné miesto, do chladničky pri teplote od 2-8°C.

4.3.4. Pasážovanie buniek

Precíznosť a dôslednosť pri starostlivosti o bunkové kultúry sú kľúčom k úspechu každého jedného experimentu. Kultivačné podmienky by mali čo najviac kopírovať prostredie *in vivo* a bunky by mali byť pravidelne pasážované.

Pasážovanie je nariadenie a prenos buniek na nové kultivačné médium. Tento proces sa uskutočňuje v laminári zaistujúcim aseptické podmienky, aby nedošlo ku kontaminácii a vykonáva sa pravidelne (my 2x týždenne), aby sa bunky udržali pri živote. Ak by sa nechali v nádobke príliš dlho bez pasáže, došlo by k ich premnoženiu, živiny v médiu by sa vyčerpali a bunky by odumierali. Podstata spočíva v odobratí časti buniek, ich zmiesenie s novým médiom a prenesenie do novej kultivačnej nádobky.

Pred samotnou prácou bolo vždy potrebné vopred si prichystať pracovisko. Ako prvé sa umyli ruky a následne pripravil laminár – vysvietil sa UV lampou, čím sa zabezpečila sterilita prostredia, v ktorom celý proces prebiehal. Medzitým sa vybralo médium, PBS a trypsín a všetko sa vložilo do lázne vytemperovanej na teplotu 37°C. Po 15min sa UV vyplo, zaplo sa laminárne prúdenie, vybrala sa UV lampa a do laminára sa umiestnili všetky potrebné pomôcky a látky. Do laminára sa vložilo (všetko vystriekané liehom): odpadná kadička, 2x5ml a 1x10ml pipeta, pipetovač, médium, PBS, trypsín, prípadne aj nová kultivačná nádobka. Týmto sa skončila prípravná fáza a mohlo sa prejsť k samotnej pasáži.

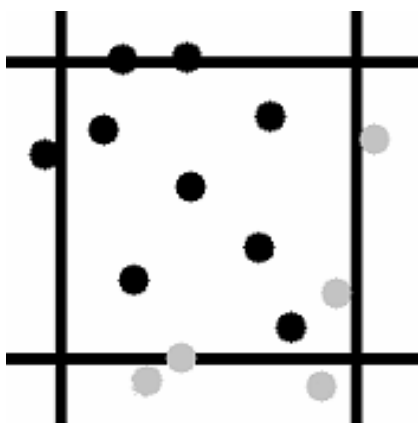
Bunky sa vytiahli z inkubátora a pod mikroskopom sa skontrolovalo, či ich je dostatok. Následne sa preniesli do laminára, kde sa z kultivačnej nádobky zlialo médium a bunky sa 2x opláchli 7ml PBS. Oplachom sa odstránilo médium so sérom a všetkými soľami, ktoré by mohli trypsín inhibovať. Rovnakou pipetou sa pridali 1,2ml už spomínaného trypsínu. Jemným krúživým pohybom nádobky sa zaistilo, že sa trypsín rozprestrel po celom dne, aby mohol rovnomerne pôsobiť. Nádobka sa opäť vložila do inkubátora a trypsín sa nechal pôsobiť približne 5min (37°C, 5% CO₂), kým sa väčšina buniek neuvoľnila od kultivačného povrchu a aj od seba navzájom. Po 5min sa pod mikroskopom skontrolovalo, či sa bunky púšťajú a či majú guľovitý tvar. Keď už drvivá väčšina mala tvar guľovitý, bunky sa ešte sklepli úderom z boku na nádobku.

Aby sa zabránilo natráveniu buniek pôsobením trypsínu, bolo potrebné ho nariediť, a to pridaním 4ml kultivačného média s obsahom FBS. Vzniknutá suspenzia sa pomocou pipety niekoľkokrát nasávala a vypúšťala, aby sa zaistila homogenita. Pasážovalo sa podľa potreby do kultivačných nádob – suspenzia sa pipetou vysala tak, aby tam zostal 1ml, ku ktorému sa následne pridalo 12ml čistého média, čím sa pasážovanie ukončilo. Nádobkou sa potriaslo, aby sa suspenzia rovnomerne rozprestrela a vložila sa do inkubátora s pootvoreným vrchom. Zbytok vysatej suspenzie sa buď odstránil, alebo použil na nasadzovanie buniek.

4.3.5. Počítanie buniek

Najjednoduchšou metódou počítania buniek, resp. určovania koncentrácie bunkovej suspenzie je využitie Bürkerovej komôrky. Jedná sa o špeciálne podložné sklíčko s 2 meracími políčkami, ktoré je tvorené sústavou veľkých štvorcov (9), ohraničených trojitými čiarami a sústavou malých štvorcov (16), vložených do štvorcov veľkých a ohraničených dvojitými čiarami.

Do mikroskúmavky sa napipetovalo 10 μ l bunkovej suspenzie, získanej predchodzu pasážou a 10 μ l trypanovej modrej. Po dôkladnom pretrepaní sa odobralo 10 μ l nariadenej suspenzie a napipetovalo sa do oboch polovic komôrky. Naplnená komôrka bola vložená pod mikroskop a počítali sa všetky bunky v 5 štvorcoch uložených v diagonále, pričom bunky ležiace na čiarach sa počítali len z dvoch strán (horná a ľavá) (Obr. 12).



Obr. 12 Pravidlo pre počítanie buniek v Bürkerovej komôrke [53]

Bunky čiernej farby sa počítajú, svetlé bunky nie.

Výpočet koncentrácie buniek v 1ml podľa vzorca:

$$c = \frac{x}{5} \cdot 2 \cdot 10^4$$

c.....počet buniek v 1ml

x/5....počet buniek napočítaných v 1 štvorci Bürkerovej komôrky

2.....riedenie

10⁴...prepočet množstva na 1 ml

4.3.6. Nasadzovanie buniek

Po vypočítaní koncentrácie buniek za pomoci Bürkerovej komôrky sa následne pripravila bunková suspenzia. Pripravila sa v objeme 10ml (vrátane rezervy pre multikanálovú pipetu), keďže do každej jamky 96-jamkovej doštičky je treba napipetovať 100µl buniek.

Potrebný objem bunkovej suspenzie sa vypočíta zo vzťahu:

$$v_1 = \frac{c_2 \cdot v_2}{c_1}$$

v_1 ... objem bunkovej suspenzie, ktorý potrebujeme

c_1 ... spočítaná koncentrácia buniek

v_2 ... objem potrebný na celú (96j) doštičku = 10ml

c_2 ... koncentrácia buniek, ktorú na experiment potrebujeme; závisí od doby expozície danou látkou (používala sa koncentrácia $2 \cdot 10^4$)

Výpočtom sa zistilo, aký objem bunkovej suspenzie je potrebný na experiment. Získaná hodnota sa potom doplnila takým množstvom média, aby celkový objem suspenzie predstavoval 10ml. Z tohto objemu sa následne napipetovalo 100µl do každej jamky. Hotová doštička bola vo finále označená a uložená do inkubátora na 24h. Pripravovali sa však 3 doštičky, na 3 časové intervaly – 24, 48 a 72h.

4.3.7. Oplyvňovanie buniek testovanými látkami

Expozícia buniek testovanými látkami sa uskutočňuje po 24h od nasadenia buniek na doštičku. Samotnej expozícii však predchádza ešte príprava zásobných roztokov. Celý tento proces musí prebiehať v sterilnom prostredí laminárneho boxu.

Zahriaté médium a rozmrazené testované látky sa vložili do laminára spolu s ďalšími potrebnými pomôckami. V úvodnom screeningu na SW480 bolo použitých 16 vzoriek, vyhodnotených po 72h (Obr. 14 – výsledky). Na základe výsledkov z tohto screeningu boli pre ďalšie experimenty použité už len niektoré vzorky - 2, 12, 13 a 40, každá vzorka v dvoch koncentráciách (10 a 100µg/ml).

V prvotnom experimente boli použité všetky tieto vzorky v oboch koncentráciách (spolu 8), pričom cieľom bolo zistiť, aká vzorka má najväčší efekt. Tento efekt sa sledoval v troch časových intervaloch - 24, 48 a 72h, preto sa pripravovali 3 doštičky (súvisia s tým aj jednotlivé objemy roztokov). Do vaničky sa 8x napipetovali 3ml média a 3 μ l z každej vzorky, ktoré boli zoradené vzostupne. Ako kontroly sa použili 10% DMSO a médium s prídavkom 0,1% DMSO (K) – čo odpovedalo koncentrácii DMSO vo vzorkách. Po príprave expozičných roztokov sa tieto roztoky dôkladne premiešali a následne nanášali na 3 kultivačné doštičky potom, čo sa odsávačkou vysali všetky jamky. Nanášalo sa 100 μ l do každej jamky a to nasledovne (Tab. 3):

Tab. 3 Spôsob nanášania vzoriek na doštičku

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H		K	2/10	2/100	12/10	12/100	13/10	13/100	40/10	40/100	DMSO	

Po úvodnom screeningu sa ďalej dôkladnejšie testovali už len tie látky, ktoré mali na bunky nejaký efekt. V tomto prípade to boli vzorky 13 a 40, ktorých spektrum sme si ale rozšírili o ďalšie koncentrácie (50 a 200 μ g/ml), aby sme získali presnejšie výsledky. Tieto koncentrácie však bolo nutné pripraviť. 50 μ g/ml sa pripravilo zriedením 100 μ g/ml s DMSO v pomere 1:1. 200 μ g/ml nebolo nutné pripravovať, stačilo použiť dvojnásobné množstvo koncentrácie 100 μ g/ml (kontrola mala následne takisto dvojnásobnú koncentráciu DMSO). Postup prípravy jednotlivých roztokov vo vaničke bol identický s predchádzim (3ml média + 3 μ l vzorky), okrem 200 μ g/ml koncentrácie – pri ktorej sa použilo 6 μ l vzorky (100 μ g/ml) + 3ml média. Opäť sa nanášalo na 3 kultivačné doštičky, 100 μ l do každej jamky (Tab. 4). Pripravené doštičky sa nakoniec vložili do inkubátora a následne sa vyhodnocovali po uplynutí 24, 48 a 72h.

Tab. 4 Spôsob nanášania vzoriek na doštičku

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H		K	13/10	13/50	13/100	13/200	40/10	40/50	40/100	40/200	DMSO	

4.3.8. Vyhodnocovanie – metóda WST-1

WSTs (Water-soluble Tetrazolium salts) sú kvartérne amóniové soli so širokým využitím. Používajú sa pri enzymatických testoch, imunotestoch či na monitoring životaschopnosti buniek [54].

Existuje viacero spôsobov, ako hodnotiť antiproliferatívnu aktivitu exogenných agens na vitálne bunky. Jedným z nich je aj metóda nazývaná WST-1. Výhodou tejto metódy je, že je citlivejšia než ostatné, napr. MTT či XTT. WST-1 je označenie pre stabilnú tetrazoliovú soľ, ktorá sa na povrchu životaschopnej bunky štiepi komplexným bunkovým mechanizmom pomocou enzýmu sukcinát-tetrazolium reduktáza.

Enzým je aktívny len v metabolicky intaktných bunkách, pričom jeho pôsobením vzniká vo vode rozpustný, oranžovo sfarbený formazan. Tento dej závisí od produkcie koenzýmu NAD(P)H, ktorý sa tvorí vo vitálnych bunkách. To znamená, že množstvo vzniknutého formazanu závisí od toho, koľko buniek je metabolicky aktívnych [55].

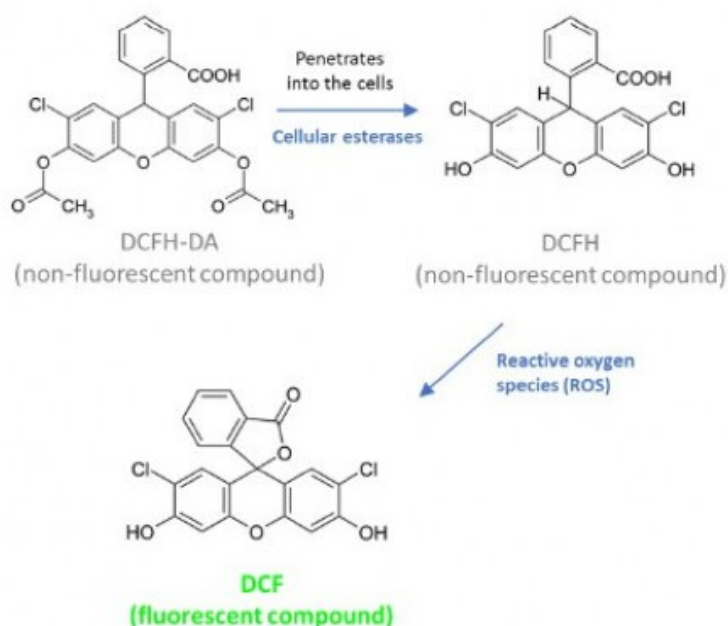
Naše vyhodnocovanie prebiehalo práve touto metódou. Po tom, čo boli bunky ovplyvnené testovanými látkami sa kultivačné doštičky uložili do inkubátora, kde čakali na svoje vyhodnotenie po 24, 48 a 72h. Na to však bolo potrebné pripraviť si v laminári príslušný roztok. WST vybrané z mrazničky sa nechalo zahriať na pár minút vo vodnej lázni. Potom sa pripravil samotný roztok. Použilo sa 20x nariedené WST, tzn. 1ml WST + 19ml média sa zmiešalo vo vaničke. Z inkubátora sa potom vybrala doštička, ktorej obsah sa kompletne vysal pomocou odsávačky a následne sa do všetkých jamiek

napipetovalo 100µl tohto roztoku multikanálovou pipetou. Doštička sa opätovne vložila do inkubátora a po 1h bola zmeraná absorbanca spektrofotometrom (Tecan Infinite M 200), pri vlnovej dĺžke 440nm a referenčnej vlnovej dĺžke 600nm. Po hodinovej inkubácii boli zmeny nie len merateľné, ale aj voľným okom viditeľné (oranžovo sfarbené jamky). Intenzita sfarbenia odpovedala množstvu prítomných živých buniek (málo živých buniek = malé množstvo formazanu).

4.3.9. ROS detekcia na bunkovej úrovni

Reaktívne formy kyslíka (ROS) sa vyznačujú krátkodobou životnosťou. Ich stanovenie je pomerne náročné, avšak nie nemožné.

Na detekciu ROS v bunkách sme využili fluorescenčnú sondu H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát). Jedná sa o látku, ktorá má schopnosť prestupovať cez bunkovú membránu pasívnou difúziou do bunky vo forme diacetátu. Po preniknutí do bunky sa acetátové skupiny štiepia pôsobením esteráz a následne vplyvom prítomných ROS dochádza k oxidácii, za vzniku vysoko fluorescenčnej zlúčeniny dichlorfluoresceinu (DCF). Platí, že intenzita fluorescencie je priamo úmerná množstvu ROS v bunke. DCF možno detekovať fluorescenčnou spektroskopiou pri vlnovej dĺžke 485/525nm a teplote 37°C (Obr. 13).



Obr. 13 Tvorba fluorescenčnej zlúčeniny DCF pôsobením ROS [56]

Bunky SW480 (nasadené v množstve 100 μ l/jamka na 2 kultivačné doštičky o koncentrácii buniek 2.10⁴) sa nechali 24-48h rásť v inkubátore, aby sa dosiahla konfluencia cca 90%.

V prvom experimente bolo cieľom stanoviť koncentráciu TBHP, ktorá by bola vhodná ako pozitívna kontrola pre sledovanie prooxidačných účinkov. Doštička s nasadenými bunkami sa vybrala z inkubátora, v laminári sa odsal celý jej obsah a následne sa jamky 2x prepláchli pufrom HBSS (100 μ l). Druhý preplach sa na doštičke nechal, aby bunky neboli v suchu a medzitým sa do sterilných mikroskúmaviek predpripravili – čisté HBSS a taktiež roztoky TBHP v koncentráciách 50, 100, 200 a 300mM, ktoré sa následne riedili (Tab. 5).

Tab. 5 Spôsob nanášania vzoriek na doštičku

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		HBSS		1ml HBSS + 0,25 μ l TBHP		1ml HBSS + 0,5 μ l TBHP		1ml HBSS + 1 μ l TBHP		1ml HBSS + 1,5 μ l TBHP		
C												
D												
E												
F												
G												
H	X		K		X		50		X		100	X

Keď boli roztoky hotové, nasledovalo riedenie sondy. Sondy je treba chrániť pred svetlom, preto akákoľvek manipulácia s ňou musí prebiehať za tmy. Sonda sa vybrala z mrazničky a v laminári sa vo vaničke 10 000x nariedila (2 μ l sondy + 20ml HBSS). Následne sa z doštičky odsal druhý preplach HBSS a za tmy sa nanieslo 100 μ l (riedenej) sondy do vyznačených stĺpcov (Tab. 5). Doštička so sondou sa zabalila do alobalu a vložila do inkubátora (37°C) na 30min. Po 30min sa sonda odsala a znova sa jamky prepláchli 2x 100 μ l HBSS (za tmy). Po druhom preplachu sa na doštičku naniesli predpripravené roztoky (Tab. 5) a na záver bolo fluorescenčnou spektroskopiou (Tecan Infinite M 200) pri vlnovej dĺžke 485/525nm a teplote 37°C, stanovené množstvo fluorescenčného DCF, ktorý vzniká pôsobením ROS na použitú sondu. Z tohto merania bola vypočítaná optimálna koncentrácia TBHP, vhodná ako pozitívna kontrola pre

d'alsie experimenty. Merania sa robili v časových intervaloch – 10, 30min, 1, 2, 3, 4, 18 a 24h. Zistilo sa, že všetky koncentrácie zvyšovali množstvo dichlorofluoresceinu DCF (z pôvodnej sondy DCF-DA). Pre d'alsie experimenty, kedy sa sledoval prooxidačný a antioxidačný efekt vybraných vzoriek, bola ako pozitívna kontrola nakoniec zvolená koncentrácia TBHP 200 μ M, ktorá sa pripravovala.

4.3.9.1. Prooxidačný efekt

Po tom, čo bola zvolená pozitívna kontrola (TBHP 200 μ M) sa pokračovalo v experimente so zameraním sa na prooxidačné (negatívne) účinky jednotlivých vzoriek – tvorba ROS. Postupovalo sa podobne ako pri prvom experimente, tzn. v laminári 2x preplach pufrom HBSS (100 μ l), pričom druhý preplach sa na doštičke opäť nechal, zatiaľčo sa pripravili expozičné roztoky a nariedila sa sonda.

Príprava látok: V 8-jamkovej vaničke sa nariedili vzorky papradí (4), o koncentráciách 10 a 100 μ g/ml. Riedil sa 1 μ l vzorky s 1ml pufru HBSS.

Príprava kontrol: Do sterilných mikroskúmaviek sa pripravili kontroly - 0,1% DMSO (1 μ l 100% DMSO + 1ml HBSS) + pozitívna kontrola - 200 μ M TBHP (1ml HBSS + 1 μ l 200mM TBHP).

Po príprave roztokov nasledovalo riedenie sondy zo zásobného roztoku (100mM) za tmy (2 μ l sondy + 20ml HBSS), odsal sa druhý preplach HBSS a nanieslo sa 100 μ l (riedenej) sondy na všetky rady (6) naraz (za tmy!). Doštička v alobale sa na 30min vložila do inkubátora (37°C). Potom sa sonda odsala, jamky sa prepláchli 2x 100 μ l HBSS (za tmy) a po druhom preplachu sa naniesli roztoky papradí + kontrola (0,1% DMSO) + pozitívna kontrola (200 μ M TBHP) (Tab. 6). Vo finále sa po 10, 30min, 1, 2, 3, 4h inkubácii merala intenzita fluorescencie na prístroji Tecan Infinite M 200, pri vlnovej dĺžke 485/525nm a teplote 37°C.

Tab. 6 Spôsob nanášania vzoriek na doštičku

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H		K (0,1% DMSO)	2/10	2/100	12/10	12/100	13/10	13/100	40/10	40/100	TBHP (200 μM)	

4.3.9.2. Antioxidačný efekt

Okrem prooxidačného efektu sa tiež skúmal aj opačný, antioxidačný efekt jednotlivých vzoriek – potlačenie tvorby ROS ich antioxidačným pôsobením. Postup realizácie experimentu sa od predchádzajúceho líšil, pretože sa postupovalo opačne. Začalo sa tzv. 18h pretreatmentom, ktorého cieľom bolo indukovať tvorbu antioxidačných enzýmov a tým pripraviť bunky na oxidačný stres. Sonda sa narozdiel od predchádzajúceho experimentu pridávala až na konci. Celý proces prebiehal v laminári (so sondou sa pracovalo za tmy).

Pretreatment spočíval v príprave jednotlivých roztokov a ich nanosení na doštičky. Ako prvé sa nariesili vzorky papradí (2, 12, 13, 40), s koncentraciami 10 a 100μg/ml v 8-jamkovej vaničke (1μl vzorky + 1ml média). Ďalej sa pripravila kontrola - 0,1% DMSO (2μl 100% DMSO + 2ml média) a na záver roztoky Catechinu (C) a Quercetinu (Q). Najprv boli pripravené ich zásobné, 1M roztoky, z ktorých sa potom pripravili ich 10mM roztoky zriedením s DMSO (10μl 1M roztoku C/Q + 990μl DMSO). Tieto roztoky sa použili podobne ako vzorky papradí (1μl vzorky + 1ml média). Okrem toho sa nanášalo aj čisté médium a pufr HBSS. Pretreatment trval 18h (inkubátor) a vyzeral nasledovne (Tab. 7 a 8):

Tab. 7 Spôsob nanášania vzoriek na doštičku

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	X médium	X médium	K (0,1% DMSO)	Q	C	X (HBSS)	2/10	2/100	12/10	12/100	X médium	X médium

Tab. 8 Spôsob nanášania vzoriek na doštičku

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	X médium	X médium	K (0,1% DMSO)	Q	C	X (HBSS)	13/10	13/100	40/10	40/100	X médium	X médium

Po 18h pretreatmente sa jamky (2-11) odsali a 2x prepláchli 100 μ l HBSS. Druhý preplach sa nechal (aby bunky neboli v suchu) a medzitým sa za tmy nariedila sonda DCF-DA (3,2 μ l sondy + 32ml HBSS). Následne sa druhý preplach odsal a do všetkých jamiek sa napipetovalo 100 μ l riedenej sondy. Doštička zabalená v alobale sa na 30min vložila do inkubátora (37°C). Počas toho sa nariedilo 30ml 100 μ M TBHP (15 μ l 200mM TBHP + 30ml HBSS) – roztok sa pridával na konci. Po pol hodine sa sonda odsala

a jamky sa znova prepláchli 2x 100 μ l HBSS. Nakoniec sa pridalo 100 μ l TBHP (100 μ M) a merala sa intenzita fluorescencie (Tecan Infinite M 200, 485/525nm, 37°C) v časových intervaloch 0, 10, 30min, 1, 2, 3, 4h.

4.3.10. Štatistická analýza dát

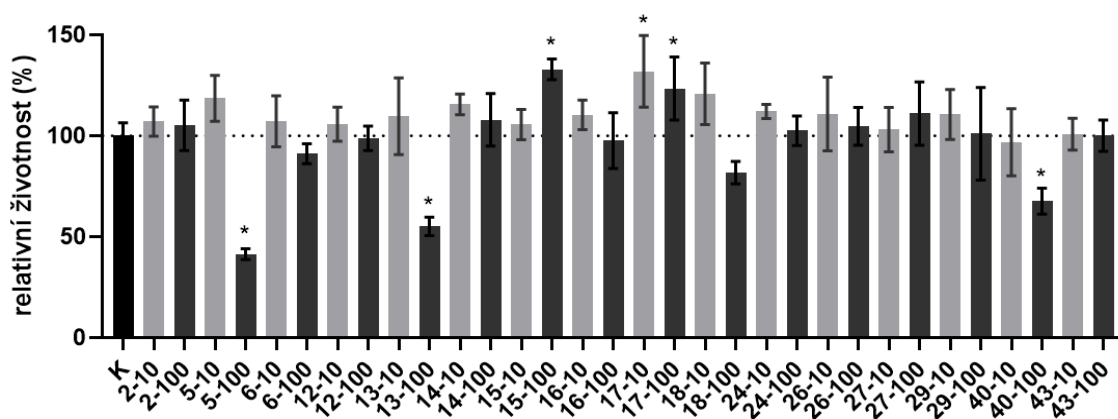
Štatistická analýza dát bola spravená pomocou programu GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software, USA), metódou Ordinary OneWay ANOVA s *post hoc* Holm-Sidak testem. Za štatisticky významné boli považované rozdiely hodnôt od hladiny významnosti $p \leq 0,05$. Pre stanovenie teoretických hodnôt IC₅₀ boli dáta preložené nelineárnou krivkou (Nonlin fit) pomocou programu GraphPad.

5. VÝSLEDKY

5.1. Antiproliferatívne pôsobenie papradí

5.1.1. Úvodný screening

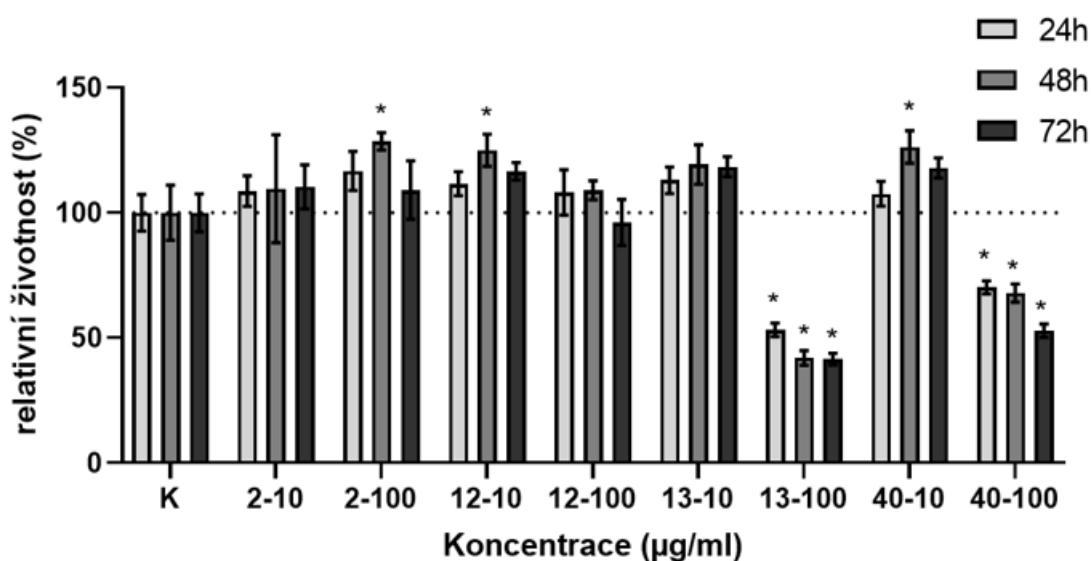
V úvodnom screeningu sa stanovoval antiproliferatívny účinok všetkých extraktov z papradí v dvoch koncentráciách (10 a 100µg/ml) na bunkovú líniu SW480 po 72h inkubácii. Pôsobenie týchto látok sa hodnotilo za pomoci WST-1 metódy, ktorej podstata spočíva v tvorbe formazanu v živých bunkách pôsobením mitochondriálnych dehydrogenáz. Výsledný formazan má oranžové sfarbenie, absorbanca pri 440nm odpovedá počtu živých buniek (slabá oranžová – málo formazanu = málo vitálnych buniek). Životaschopnosť buniek sa vzťahovala ku kontrole (médiu s 0,1% DMSO), kde vitalita predstavovala 100%. Z grafu je vidieť, že len niektoré extrakty pôsobili antiproliferatívne. Niektoré pôsobili naopak, pre bunky mierne podporne. Vybrané extrakty boli použité v ďalších testoch (Obr. 14).



Obr. 14 Grafické znázornenie závislosti relatívnej životnosti buniek [%] na koncentrácii [µg/ml] jednotlivých látok; * štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$)

5.1.2. Testovanie vybraných látok pri rôznych časových intervaloch

Úvodný screening nám pomohol vyselektovať potenciálne antiproliferatívne látky. Pre ďalšie testovanie boli vybraté už len niektoré z nich – vzorky 2, 12, ktoré žiaden signifikantný účinok nevykazovali a vzorky 13 a 40, ktoré antiproliferatívne pôsobili. Toto meranie pre rôzne časové intervaly bolo opäť uskutočnené metódou WST-1 a len v koncentráciách 10 a 100 μ g/ml (Obr. 15).

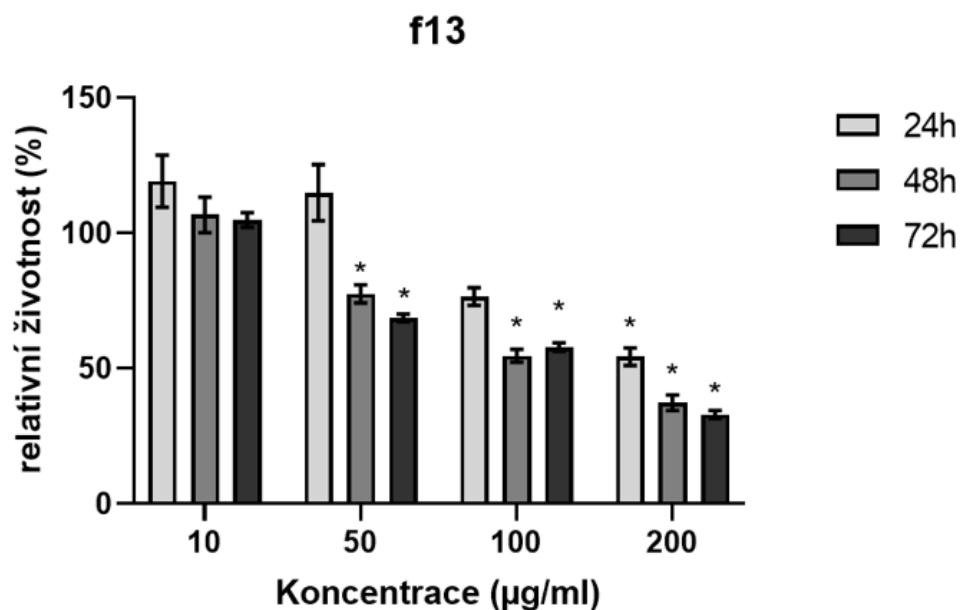


*Obr. 15 Závislosť relatívnej životnosti buniek [%] na koncentrácii [μ g/ml] štyroch vybraných vzoriek v rôznych časoch; * štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$)*

Štyri vybrané vzorky boli podrobené ďalšiemu testovaniu (po 24, 48 a 72h), pri ktorom sa sledovala opäť životaschopnosť buniek, resp. ich antiproliferatívny efekt. Výsledky merania poskytli opäť o niečo užší výber. Dospelo sa k dvom vzorkám (13 a 40), ktoré mali efekt vzhľadom k tomu, že vitalita buniek s týmito vzorkami bola v porovnaní s kontrolou (vitalita 100%) značne nižšia, tzn. že sa u týchto vzoriek potvrdil antiproliferatívny efekt.

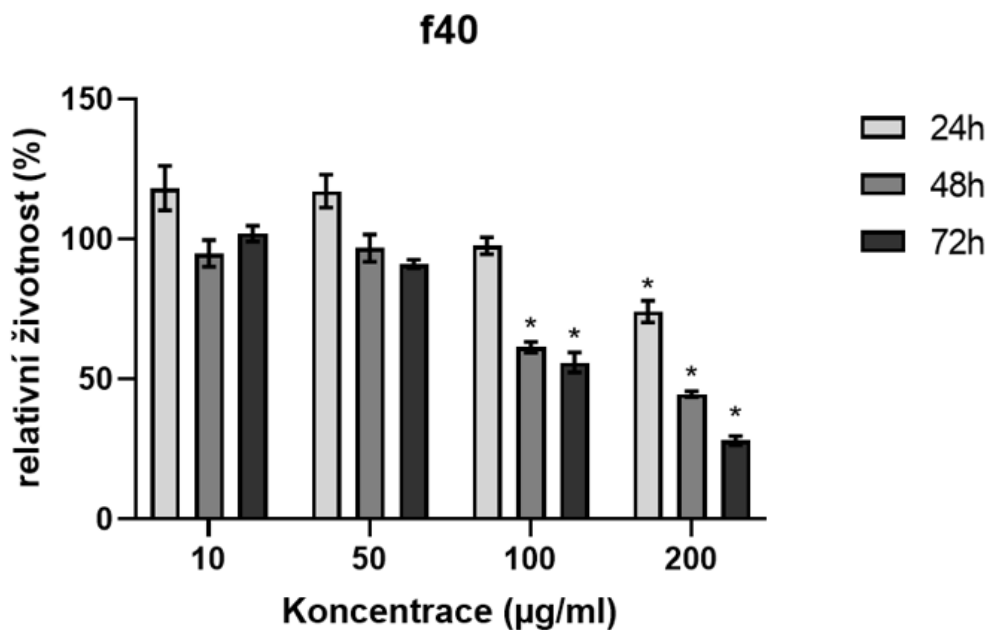
5.1.3. Testovanie dvoch vzoriek vo väčšom rozsahu koncentrácií

Ďalšie hodnotenie bolo venované už len látkam, u ktorých bol v predchodzom testovaní spozorovaný nejaký efekt na bunky. Uskutočnilo sa dôkladnejšie testovanie vzoriek 13 a 40 v rôznych časových intervaloch, za použitia širšieho spektra koncentrácií (Obr. 16 a 17) pre stanovenie približnej hodnoty IC_{50} .



Obr. 16 Závislosť relatívnej životnosti buniek [%] na koncentrácii [µg/ml] vzorky 13 (*Dryopteris Borreri*) v intervale 24, 48 a 72h; * štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$)

Pri dôkladnejšom testovaní látky sme zistili, že už koncentrácia 50µg/ml má na bunky antiproliferatívny efekt, avšak až po uplynutí minimálne 48h (s časom tento efekt silnie, tzn. že po 72h je výraznejší). Podobne sa efekt prejavil aj u 100µg/ml, so začiatkom až po 48h. V čase 72h je vidieť efekt slabší, než by mal byť (očakáva sa zvyšujúci sa efekt v čase). U koncentrácii 200µg/ml je vidieť antiproliferatívne pôsobenie už po 24h, ktoré postupne silnie.



Obr. 17 Závislosť relatívnej životosť buniek [%] na koncentráciách [µg/ml] vzorky 40 (*Blechnum spicant*) v intervale 24, 48 a 72h; * štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$)

Podrobnejším testovaním tejto látky bol efekt zaznamenaný až od koncentrácie 100µg/ml po uplynutí 48h a viac. Koncentrácia 200µg/ml mala efekt už po 24h. V oboch prípadoch efekt silnel s časom a rastúcou koncentráciou.

Z uvedených grafov vyplýva, že s rastúcou koncentráciou a dlhšími časovými intervalmi antiproliferatívny efekt látok rastie. V tabuľke 9 je uvedená vypočítaná hodnota IC_{50} (tj. koncentrácia, ktorá zníži životosť buniek na 50% v porovnaní s kontrolou, kde sú všetky bunky vitálne), získaná extrapoláciou krivky. Vzhľadom k tomu, že nemáme koncentráciu, ktorá by vedela zabiť 100% buniek (je potrebná pre výpočet správnej sigmoidnej krivky), je táto hodnota iba teoretická (Tab. 9).

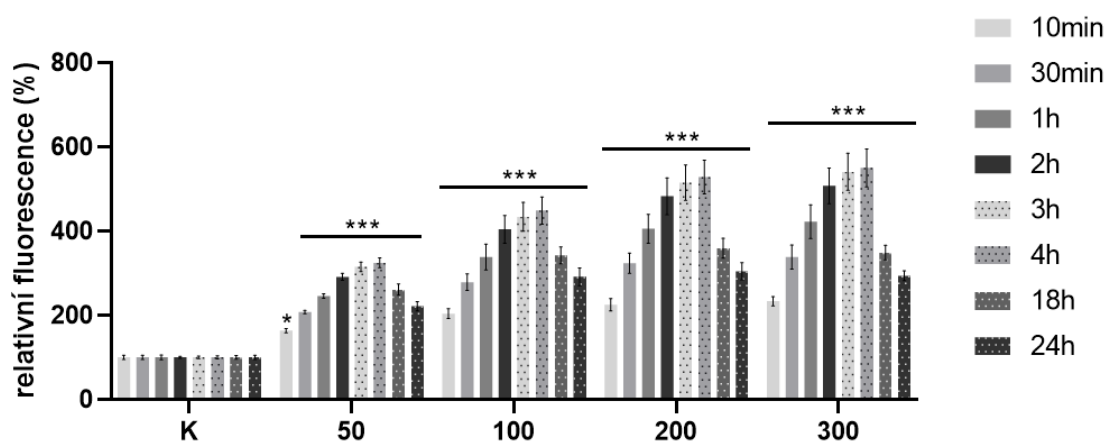
Tab. 9 IC_{50}

IC_{50}	24h	48h	72h
f13	>200	138,0	121,6
f40	>200	>200	141,5

5.2. ROS

5.2.1. Stanovenie koncentrácie pozitívnej kontroly TBHP

Cieľom prvého experimentu bolo stanoviť, aká koncentrácia TBHP je vhodná ako pozitívna kontrola pre ďalšie experimenty (použité boli koncentrácie 50, 100, 200 a 300mM), s využitím metódy s fluorescenčnou sondou H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát). Ako kontrola bol použitý roztok HBSS bez sondy. Podstatou tejto metódy je vznik vysoko fluorescenčnej zlúčeniny dichlorfluoresceinu (DCF) po pridaní sondy, vplyvom prítomných ROS. Meranie sa uskutočňovalo vo viacerých časoch a na základe výsledkov bol zhotovený graf (Obr. 18).



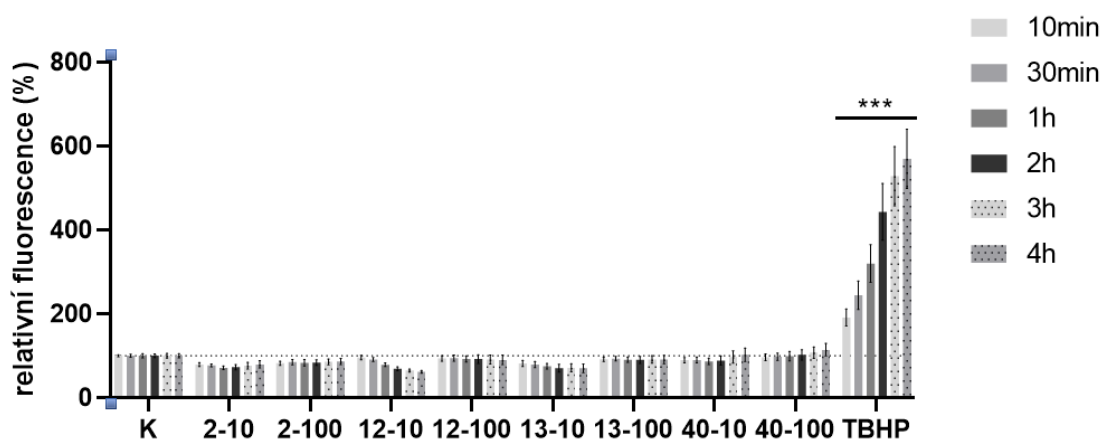
Obr. 18 Závislosť relatívnej fluorescencie (%) na koncentrácii [mM] TBHP;

* štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$)

Z grafu vyplýva, že každá zvolená koncentrácia zvyšuje množstvo DCF (z pôvodnej sondy DCF-DA). Výsledkom experimentu bolo zvolenie 200 μ M koncentrácie TBHP ako pozitívnej kontroly, ktorá sa pripravila nariedením zásobného, 200mM roztoku TBHP.

5.2.2. Prooxidačný efekt vybraných vzoriek

Po stanovení vhodnej koncentrácie pozitívnej kontroly (200 μ M TBHP) experiment pokračoval s cieľom zistiť, či vybrané vzorky papradí vykazujú prooxidačný, vysoko nežiadúci efekt (podpora oxidačných procesov vedúca k tvorbe ROS). Prítomnosť voľných radikálov sa zisťovala opäť pomocou fluorescenčnej sondy (Obr. 19).



*Obr. 19 Závislosť relatívnej fluorescencie (%) na koncentrácii [μ g/ml] jednotlivých vzoriek; *** štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,001$)*

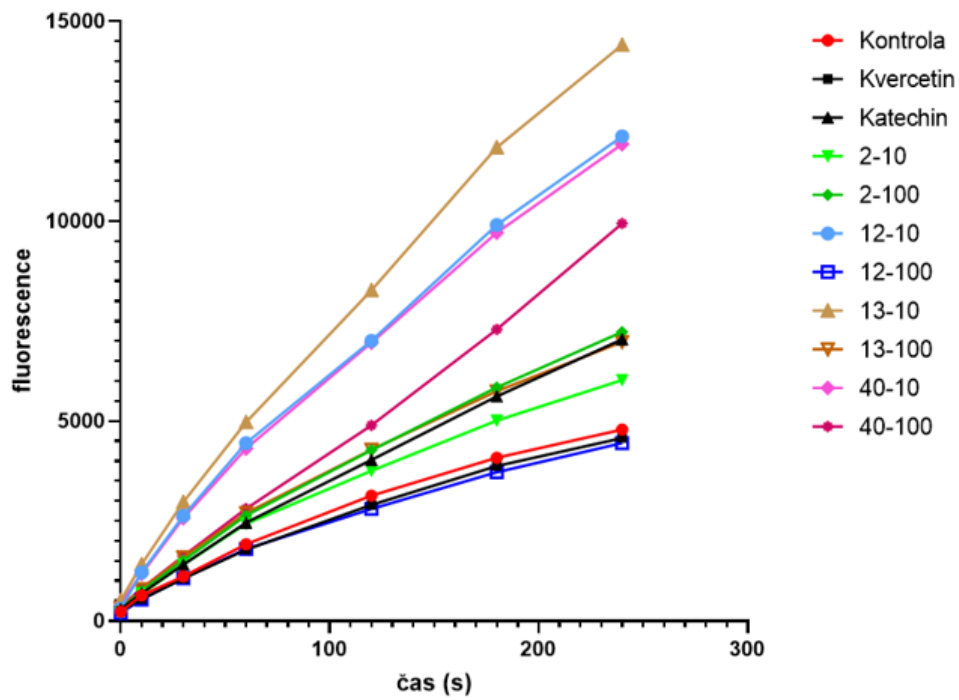
Z uvedeného grafu vyplýva, že látky neindukujú tvorbu ROS. V porovnaní s pozitívnou kontrolou TBHP, kde vidíme ROS zvyšujúce sa v čase, sú hodnoty jednotlivých látok v grafe podstatne nižšie.

5.2.3. Antioxidačný efekt vybraných vzoriek

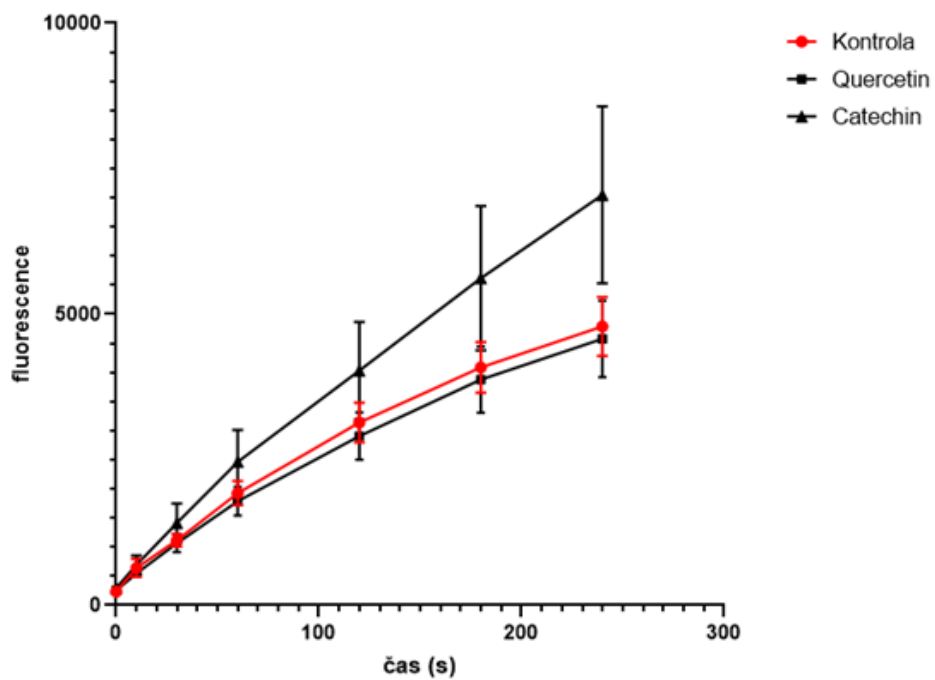
Sledovanie potenciálneho antioxidačného efektu je veľmi náročný experiment z viacerých hľadísk: inakosť každej látky, odhad potrebnej doby pôsobenia, vhodnosť správnej koncentrácie, antioxidačný efekt môže nastať spolu s tvorbou ROS, príslušné látky môžu bunky usmrtiť.

Vzhľadom k doteraz pretrvávajúcej pandémie ochorenia Covid-19 nebolo možné v čase vypracovávania experimentálnej časti uskutočniť viacero rôznych nastavní experimentu. Z časového hľadiska bol možný len tento jeden experiment.

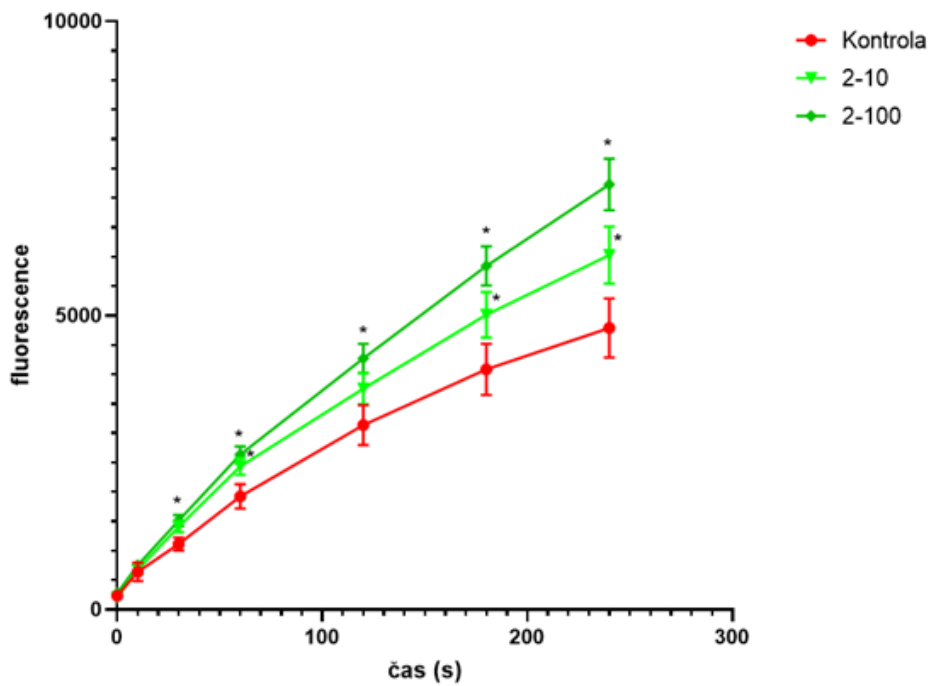
Pri sledovaní potenciálneho antioxidačného efektu boli jednotlivé extrakty pridávané na začiatku - išlo teda o pretreatment látkami (18h), s cieľom pripraviť bunky na možný oxidačný stres tým, že navodia tvorbu antioxidačných enzýmov. Okrem skúmaných látok sa pridávali aj ďalšie roztoky – kontrola 0,1% DMSO, roztoky flavonoidov Catechinu a Quercetinu (pozitívne kontroly), ktoré fungujú ako antioxidanty. Po 18h nasledoval preplach, pridanie fluorescenčnej sondy H₂DCF-DA, znova preplach a pridanie TBHP. Experiment sa vyhodnocoval zmeraním intenzity fluorescence vo viacerých časoch a následne boli zostrojené grafy (Obr. 20-25).



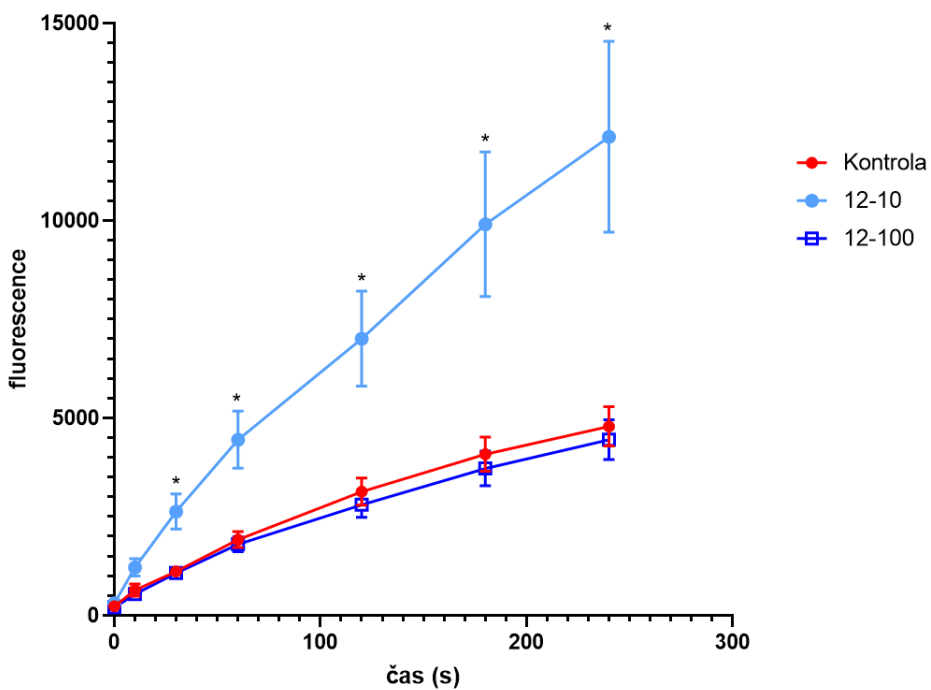
Obr. 20 Celkový prehľad všetkých vzoriek



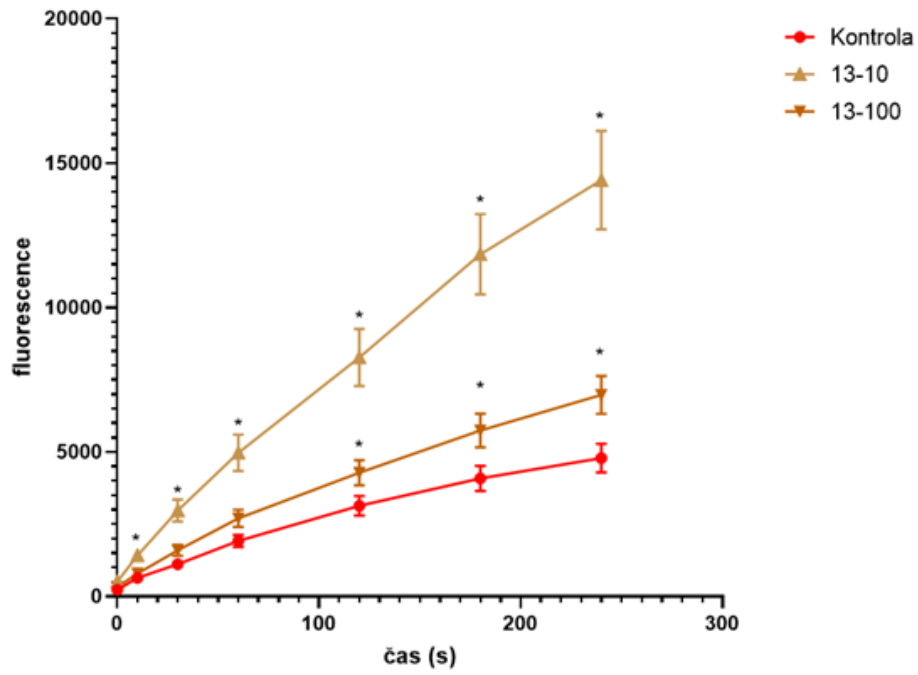
Obr. 21 Pozitívne kontroly Catechin a Quercetin



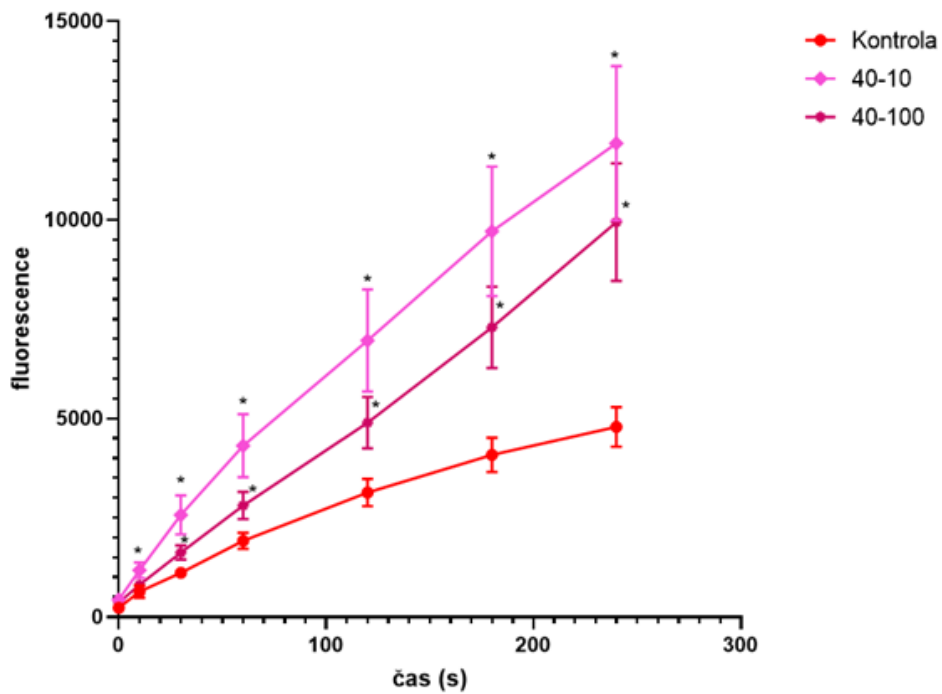
Obr. 22 *Athyrium filix-femina*; * štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$)



Obr. 23 *Dryopteris dilatata*; * štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$)



Obr. 24 *Dryopteris borreeri*; * štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$)



Obr. 25 *Blechnum spicant*; * štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($p < 0,05$)

Prvý graf (Obr. 20) predstavuje celkové zhrnutie čiastkových výsledkov experimentu zameraného na antioxidačný efekt extraktov z papradí. Z tohto grafu vyplýva, že vzniknuté ROS majú stúpajúcu tendenciu v čase, tzn. že s rastúcim časom sa zvyšovalo množstvo prítomných ROS a teda aj fluorescencia postupne narastala.

Ďalším dôležitým zistením je, že u použitých kontrol (roztoky Catechinu a Quercetinu) je vidieť, že tieto látky majú zjavne iný mechanizmus popisovaného „antioxidačného“ pôsobenia. U Quercetinu vidíme pomalší nárast ROS v čase v porovnaní s Catechinom (krivka Quercetinu rastie pomalšie (Obr. 21)), na základe čoho možno povedať, že Quercetin aspoň trochu dokázal pripraviť bunky na oxidačný stres, zatiaľčo Catechin nie.

Podstatou experimentu bol pretreatment jednotlivými látkami s cieľom zistiť ich antioxidačné pôsobenie. Okrem vyššie spomenutého Quercetinu je možné vidieť mierny antioxidačný efekt aj u vzorky 12/100, pretože v porovnaní s kontrolou nemá táto krivka tak prudký nárast, čo znamená, že táto konkrétna látka nevyčerpala antioxidačný aparát bunky narozdiel od ostatných látok, ktoré sa s oxidačným stresom vyrovnávali zle a preto bol u niektorých z nich zaznamenaný vysoký nárast fluorescencie. V grafe však vidíme aj viacero látok, u ktorých pretreatment nemal na bunky žiaden efekt, tzn. že tieto látky nijako neovplyvnili vznikajúce ROS – jedná sa o látky 2/10, 2/100 a 13/100.

Najvyššie hodnoty v grafe patria látkam, ktoré pravdepodobne vyčerpali antioxidačný aparát bunky a tým bola aj intenzita fluorescencie výrazne vyššia v porovnaní s kontrolou. K týmto látkam patria 12/10, 13/10, 40/10 a 40/100.

Očakávaný výsledok, ktorý by preukázal antioxidačné vlastnosti testovaných extraktov, by bol pozorovaný ako nižšia fluorescencia oproti kontrole. Pri pretreatmente by mohlo dôjsť k tvorbe antioxidačných enzýmov, ktoré by následne zabránili tvorbe ROS pôsobením TBHP. Bohužiaľ bola táto hypotéza vyvrátená, lebo ako je vidieť z celkového grafu (Obr. 20), väčšina látok má v tomto nastavení experimentu skôr prooxidačný efekt.

6. DISKUSIA

Vzťah medzi človekom a rastlinami sa datuje už od čias ľudského pôvodu. Ľudia už od svojho vzniku boli závislí na rastlinách ako na primárnych potrebách – potraviny, krmivo, palivo, drevo a podobne. Neskôr začali rastliny využívať aj pri rôznych ochoreniach, vďaka ich potenciálnej schopnosti liečiť [57]. V posledných rokoch záujem o rastliny ešte viac stúpol, najmä čo sa týka ich obsahových látok a ich možného použitia pri liečbe chronických či infekčných ochorení. Rastlinné extrakty majú veľa sekundárnych metabolitov, ktoré môžu byť výhodnejšou alternatívou (z pohľadu vedľajších účinkov) k syntetickým liečivám, pričom viaceré z nich sú už aj kategorizované ako bezpečné a všeobecne uznávané látky [58]. K týmto rastlinám patria aj paprade, ktoré si znovu získali pozornosť odborníkov. Ich výťažky boli a doteraz sú študované s cieľom stanovenia nielen ich biologickej aktivity, ale aj s cieľom identifikovať zodpovedné chemické entity. Zistilo sa, že extrakty z papradí vykazujú antioxidantné, antimikrobiálne, antibakteriálne, antivírusové, protizápalové a antiproliferatívne účinky [41,42] a že obsahujú mnoho fenolových zlúčenín, glykozidov, flavonoidov, terpenoidov, karotenoidov, alkaloidov a mastných kyselín [40,41]. Ich potreba je cenná nielen z medicínskeho, ale aj výživového hľadiska a preto aj náš výskum sa nimi zaoberal.

Prvotným cieľom našich experimentov bolo stanoviť antiproliferatívny účinok extraktov z papradí na nádorovú bunkovú líniu SW480. Antiproliferatívny účinok sa hodnotil metódou WST-1 v troch časoch – 24, 48 a 72h, kedy sa merala absorbancia. Zo všetkých skúšaných látok sme sa nakoniec dopracovali k dvom extraktom (vzorka 13 a 40), ktoré sa následne použili na detailnejšie testovanie, aby sme získali čo najpresnejšie výsledky. Očakávaný antiproliferatívny efekt sa potvrdil u oboch, pričom sa postupne s narastajúcou koncentráciou a časom zvyšoval.

Podobné výsledky dosiahli vo svojej štúdií aj Tsun-Thai Chai et al. (2013) [59], ktorí skúmali antiproliferatívne účinky extraktov (listy a oddenky) tropickej paprade *Phymatopteris triloba* (*Polypodiaceae*), na nádorových bunkách dvoch typov – HeLa (bunková línia rakoviny krčka maternice) a K562 (myelogénna leukemická bunková línia). Využili však metódu MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid). Podstatou tejto metódy je redukcia tetrazoliovej soli enzýmami v metabolicky aktívnych bunkách za vzniku fialových kryštálikov formazanu, ktoré je potrebné

rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle (zvyčajne DMSO), aby sa mohla zmerať absorbancia. Platí, že čím je silnejšie sfarbenie roztoku, tým viac živých buniek je prítomných [60]. Tsun-Thai Chai et al. (2013) vystavili tieto dve bunkové línie extraktom a 5-fluorouracilu (5-FU) o koncentráciách 125, 250 a 500 μ g/ml na 72h. 5-FU je štandardné chemoterapeutikum, ktoré slúžilo ako kontrola (s maximálnym antiproliferatívnym efektom). Po zmeraní absorbancie dospeli k rovnakému záveru ako my, že antiproliferatívny efekt oboch extraktov sa im potvrdil s tým, že tento efekt narastá so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktov, v ich prípade u oboch bunkových línií. Samotné extrakty teda efekt vykazovali, avšak v porovnaní s 5-FU so 100%-tnou antiproliferatívnou aktivitou, vyprodukovali (500 μ g/ml) len 40%-tnú antiproliferatívnu aktivitu na HeLa bunky a 30%-tnú na bunky K562. Tým, že svoje vzorky vzťahovali ku kontrole, teoreticky mali možnosť vypočítať si hodnotu EC₅₀ (tj. koncentrácia, ktorá navodí efekt polovičný (50%) oproti maximu). Avšak po tom čo zistili, že antiproliferatívny efekt jednotlivých vzoriek nedosahoval ani 50% vo vzťahu ku 5-FU (maximum 100%), túto hodnotu nepočítali. V našom prípade šlo o hodnotu IC₅₀ (tj. koncentrácia, ktorá zníži životnosť buniek na 50% v porovnaní s maximom, kde je životnosť stopercentná), ktorú sme ale stanovili len teoreticky, pretože sme nemohli použiť koncentráciu (kvôli obmedzenej rozpustnosti extraktu), ktorá by všetky bunky zabila a ktorá je potrebná pre výpočet sigmoidnej krivky (Tab. 9).

Ďalšie metódy, ktoré možno použiť na hodnotenie antiproliferatívneho účinku sú napríklad XTT a MTS. Všetky metódy (WST-1, MTT, XTT a MTS) sú kolorimetrické a sú založené na meraní absorbancie jednotlivých farbív pomocou spektrofotometra. Ich podstata je rovnaká, no líšia sa v počte krokov. Zatiaľčo pri WST-1, XTT a MTS vznikajú štiepne produkty rozpustné vo vode, vhodné hneď na meranie, u MTT to tak nie je a preto je potrebné najprv rozpustiť vzniknuté kryštáliky formazanu vo vhodnom rozpúšťadle (najčastejšie DMSO) a až potom je možné merať absorbanciu [60]. Zo všetkých týchto metód je teda najvýhodnejšia tá, ktorú sme použili aj my – WST-1. Výhodnejšia oproti ostatným je z hľadiska citlivosti, nižšej škodlivosti (žiadne DMSO ako pri MTT), menšej pravdepodobnosti vzniku chýb vďaka tomu, že je to „one-step postup“ (nie ako MTT). Výhodou je tiež rýchlosť [55].

Okrem vyššie spomenutých metód možno použiť aj iné, s iným princípom pôsobenia. Takou metódou je napríklad aj LDH test. Jedná sa o nerádioaktívny kolorimetrický test, vhodný na vysokovýkonnú kvantifikáciu bunkovej smrti a lýzy buniek na základe merania aktivity laktátdehydrogenázy (LDH), uvoľnenej z cytozolu

poškodených buniek do kultivačného média, v dôsledku poškodenia bunkovej membrány. Indikátorom bunkovej smrti je práve tá uvoľnená, extracelulárna LDH. Koncentrácia LDH môže byť meraná pomocou rôznych kitov, napr. kit na detekciu cytotoxicity od výrobcu Roche [61].

Neutral Red Uptake test alebo test s Neutrálnou červenou je ďalšia možná metóda určená na meranie cytotoxicity, na meranie počtu životaschopných buniek. Test je založený na schopnosti zdravých buniek absorbovať a viazať vo svojich lyzozómoch vitálne farbivo neutrálnu červenú. Príjem neutrálnej červenej závisí od schopnosti bunky udržiavať gradienty pH produkciou ATP. Pri fyziologickom pH má farbivo náboj neutrálny, čo mu umožňuje prestupovať bunkovú membránu. Vo vnútri lyzozómov je protónový gradient na udržanie nižšej hodnoty pH, než je v cytoplazme. Takto sa farbivo nabije a udrží sa vo vnútri lyzozómov. Pri poškodení bunky alebo bunkovej smrti sa gradient pH stratí, čo spôsobí zvýšenú priepustnosť membrány a uvoľnenie zadržanej neutrálnej červenej [62].

Viabilita buniek môže byť detekovaná aj pomocou prístroja, ktorý počíta a analyzuje častice. Príkladom je systém CASY (Cell Counter & Analyzer System), fungujúci na princípe prepúšťania elektrického prúdu skrz membránu vitálnych a nevitálnych buniek. Neporušená membrána živých buniek je pre prúd nepriepustná, vďaka čomu sú tieto bunky zobrazované v skutočnej veľkosti. Naopak mŕtve bunky s poškodenou membránou prúd prepúšťajú a sú zobrazované vo veľkosti ich jadra [63].

Na meranie cytotoxicity a viability buniek možno použiť aj resazurinový test s využitím modrého farbiva resazurinu, ktoré sa pôsobením reduktáz mení na netoxické, vo vode rozpustné, fluorescenčné, ružové farbivo resorufin. K tejto redukcii dochádza predovšetkým v zdravých bunkách [64,65].

V tejto diplomovej práci sme okrem antiproliferatívneho účinku pozorovali aj antioxidačný, respektíve prooxidačný efekt extraktov, ktoré sú veľmi dôležité vo vzťahu k voľným kyslíkovým radikálom (ROS). Vieme, že ROS vedia byť užitočné aj škodlivé podľa toho, v akom množstve sa v bunkách nachádzajú. Ideálna je rovnováha. Ak je však ich percento v bunkách nižšie či vyššie, môže to mať škodlivé následky. Nízke percento nie je schopné zabezpečiť správne fungovanie buniek z hľadiska regulácie biochemických pochodov, naopak vysoké percento nie je schopné zabezpečiť riadenú reguláciu [66]. Prooxidačný aj antioxidačný efekt extraktov sme pozorovali metódou s fluorescenčnou sondou H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát). Podstatou tejto metódy je vznik vysoko fluorescenčnej zlúčeniny dichlorfluoresceinu

(DCF) po pridaní sondy, vplyvom prítomných ROS. Pri oboch experimentoch boli samotné kroky rovnaké, líšilo sa len ich poradie. U prooxidačného efektu sme samotné extrakty z papradí pridávali v poslednom kroku a sledovali sme, či budú indukovať vznik ROS. U antioxidačného efektu sme látky pridávali hneď na začiatku – išlo o pretreatment, ktorý trval 18h a jeho úlohou bolo ochrániť bunky pred škodlivým pôsobením voľných radikálov oxidačného činidla TBHP, pridávaného do všetkých jamiiek.

Okrem metódy so sondou H₂DCF-DA existujú aj ďalšie metódy umožňujúce kvantifikáciu antioxidačnej aktivity rastlinných extraktov, ako napríklad DPPH a ORAC test. Metóda voľných radikálov DPPH sa v zásade používa na výskum celkovej antioxidačnej kapacity extraktov či metabolitov a taktiež aj na hodnotenie antiradikálovej aktivity prírodných antioxidantov [67]. Táto DPPH analýza sa považuje za jednu z bežných a najvhodnejších kolorimetrických techník na zachytávanie voľných radikálov metabolitmi či extraktmi rôzneho pôvodu [68]. Je to metóda rýchla a jej podstatou je reakcia testovanej látky s voľným stabilným dusíkovým radikálom tmavofialovej farby - difenylpikrylhydrazylom – DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl), pri ktorej sa radikál redukuje, odfarbuje a vzniká difenylpikrylhydrazin - DPPH-H (2,2-difenyl-1-picrylhydrazin). Daná reakcia je najčastejšie vyhodnocovaná spektrofotometricky, zmeraním absorbancie [69,70].

Ďalšou metódou, ktorá by sa dala použiť na stanovenie antioxidačnej kapacity látok je test ORAC (oxygen radical absorbance capacity). Je to metóda hodnotiaca elimináciu kyslíkových radikálov. Stanovenie je založené na inhibícii peroxyradikálne indukovanej oxidácie, ktorá je iniciovaná tepelným rozkladom AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropán) dihydrochlorid). Týmto spôsobom ORAC test využíva biologicky relevantný zdroj radikálov a kombinuje inhibičný čas a stupeň inhibície do jednej veličiny. Avšak posledné úpravy tohto testu zahŕňajú aj použitie fluoresceínu ako fluorescenčnej sondy, adaptáciu na vysokovýkonný formát a schopnosť merať lipofilnú, hydrofilnú a celkovú antioxidačnú kapacitu. Táto modifikácia, s vynechaním krokov premývania, výrazne zjednodušila túto metódu, vďaka čomu je teraz ideálna na meranie antioxidačnej kapacity látok. Nazýva sa ORAC-FL, pričom ako štandard využíva vo vode rozpustný analóg vitamínu E – Trolox, s ktorým sú všetky ostatné testované látky porovnávané [71].

V našej štúdií bola použitá iba jedna metóda z dôvodu vypuknutia pandémie počas vypracovávania praktickej časti tejto práce. Z časového hľadiska tak nebolo možné otestovať viacero metód a preto výsledky tohto experimentu nemožno považovať za smerodajné. Pre získanie presnejších výsledkov je treba uskutočniť ešte ďalšie experimenty s využitím iných metód a nastavení, aby sa dali výsledky porovnať a stanoviť tak účinnosť jednotlivých vzoriek [72]. Odporúča sa použiť aspoň dve rôzne metódy [73]. Pre úplnú správnosť výsledkov by bolo vhodné okrem sledovania účinku látok sledovať aj ich vplyv v ľudskom organizme keďže vieme, že antioxidanty prijímané potravou môžu pôsobiť ako v gastrointestinálnom trakte, tak aj celkovo v organizme po ich vstrebaní. Práve týmto vstrebateľným antioxidantom je treba venovať pozornosť, pretože po vstrebaní podliehajú metabolizmu v pečeni a vo výsledku môžu mať inú účinnosť vzhľadom k tomu, že po metabolizácii existujú v podobe metabolitov [69].

7. ZÁVER

Výsledky, ku ktorým sme sa dopracovali v experimentoch pri riešení tejto diplomovej práce, možno zhrnúť nasledovne:

- V úvodnom screeningu s koncentráciami 10 a 100µg/ml bol v bunkovej línii SW480 preukázaný antiproliferatívny efekt viacerých látok, z ktorých boli vybrané len niektoré pre ďalšie experimenty – vzorka 2, 12, 13, 40.
- Detailnejším testovaním vybraných štyroch vzoriek s koncentráciami 10, 50, 100 a 200µg/ml, sa antiproliferatívny efekt prejavil len u vzorky 13 (*Dryopteris borrieri*) a 40 (*Blechnum spicant*), pričom efekt narastal so zvyšujúcou sa koncentráciou a časom; zvyšné dve vzorky nevykazovali signifikantný efekt.
- Antioxidačný účinok skúmaný na rovnakých štyroch vzorkách s koncentráciami 10 a 100µg/ml, sa v porovnaní s kontrolou (0,1% DMSO) mierne prejavil u vzorky 12/100 (*Dryopteris dilatata* 100µg/ml), ktorá zrejme nevyčerpala antioxidačný aparát bunky ako látky ostatné, u ktorých bol zaznamenaný výrazný nárast fluorescence v dôsledku prítomných ROS.
- Quercetin ako pozitívna kontrola dokázal o niečo lepšie pripraviť bunky na oxidačný stres než Catechin.

8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Kimáková, T., Bernadič, M., Krištúfek, P.: Problematika voľných radikálov, oxidačného stresu a antioxidantov vo vzťahu k neinfekčným ochoreniam. In: Monitor medicíny SLS. Bratislava: Slovenská lekárska spoločnosť, 2012, (1), 9-14. ISSN 1338-2551.
2. Antioxidants and Cancer Prevention [online]. [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/diet/antioxidants-fact-sheet>
3. Choudhari, S.K. et al.: Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer: A review. *Oral Oncology*, 2014; 50:10–18.
4. Minárik, P., Kimáková, T. (2016). Antioxidanty a ich úloha pri prevencii a liečbe rakoviny. In *Praktické lekárstvo*, 2016, roč. 6, č. 1, s. 22-28. ISSN 1338-3132.
5. Bhanot, A., Sharma, R., Noolvi, M. N.: Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *International journal of phytomedicine*. 2011, vol. 3, iss. 1, s. 9-26.
6. Gordon, M. C., David, J.: Plants as a source of anti-cancer agents. In: *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, vol.100, iss. 1-2, s. 72-79. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.011.
7. Thyagarajan, A., Sahu, R.P.: Potential contributions of antioxidants to cancer therapy: immunomodulation and radiosensitization. In: *Sage Journals*, 2018;17:210-216.
8. Population Fact Sheets: Czechia [online]. [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: <https://geo.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>
9. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. eds. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th edn), Oxford university Press.
10. Pláteník, J.: Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. In: *Interní medicína pro praxi*, 2009, 11(1): 30–33.
11. Dobrota, D.: *Lekárska biochémia*. Martin: Osveta, 2012, 723 s. ISBN 978-80-8063-293-9.
12. IBMB – Institute of Molecular Biomedicine [online]. [cit. 2021-01-05]. Dostupné z: http://www.imbm.sk/wp-content/uploads/2017/03/pmb03-ros_pokroky_2015.pdf

13. Foyer, C.H., Noctor, G. (2013). Redox signaling in plants. In: *Antioxid. Redox Signal*, 18, s. 2087–2090.
14. König, J., Muthuramalingam, M., Dietz K.-J.: Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: Transmitters, sensors and targets. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012;15:261–268. doi: 10.1016/j.pbi.2011.12.002.
15. Mignolet-Spruyt, L. et al. (2016). Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. In: *Journal of Experimental Botany*, 67, 3831–3844.
16. Vaahtera, L., Brosche, M., Wrzaczek, M., & Kangasjärvi, J. (2014). Specificity in ROS signaling and transcript signatures. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9), 1422-1441.
17. Mittler, R. et al. (2011). ROS signaling: the new wave? In: *Trends Plant Sci.*, 2011 Jun;16(6):300-309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007.
18. Mittler, R. et al. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. In: *Trends Plant Sci.*, 2004 Oct;9(10):490-8. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009.
19. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. eds (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th edn), Oxford university Press.
20. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V. et al. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017;2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763.
21. Ďuračková, Z. (1998). *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne I. (Definícia, rozdelenie a biologický význam voľných radikálov a antioxidantov)*. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. 285 s. ISBN 80-88908-11-6.
22. Štípek, S. a kol. (2000). *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada Publishing, 2000, 326 s. ISBN 80-7169-704-4.
23. Racek, J. (2003). *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Praha: Galén, 2003, 90 s. ISBN 80-7262-231-5.
24. Racek, J., Holeček, V.: *Enzymy a volné radikály*. *Chemické listy*, 1999, roč. , č. 93, s. 774 – 780.
25. Covarrubias, L.: *Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?* In: *Developmental Biology*, 2008, roč. 320, č. 2, s. 1 – 11.
26. Dworakowski, R., Anilkumar, N., Zhang, M., Shah, A.M.: *Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species*. In: *Biochem Soc Trans.*, 2006 Nov;34(Pt 5):960- 4.

27. Sies, H., Murphy, E.M. (1991). Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1991, roč. 8, s. 211-224. ISSN 1011-1344.
28. Li, Y. R., Jia, Z., & Trush, M. A. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. In: *Reactive Oxygen Species*, 1(1), 9–21. doi:10.20455/ros.2016.803.
29. Galli, F., Piroddi, M., Annetti, C., Aisa, C., Floridi, E., Floridi, A. (2005). Oxidative stress and reactive oxygen species. In: *Contrib Nephrol.*, 149: 240-260.
30. Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew W.-P.-P., Rahman H.S. (2018). Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. In: *Frontiers in Pharmacology*, 9 (OCT) , art. no. 1162.
31. Hrubá, D., Soška, V., Fiala, J. a kol. (2009). Kouření a kardiovaskulární nemoci. In: *Praktický lékař, časopis pro další vzdělávání lékařů v praxi*, 2009, roč. 89, č. 2, s. 72-73. ISSN 0032-6739.
32. Malondialdehyde [online]. [cit. 2021-01-10]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10499.html>
33. 4-Hydroxynonenal [online]. [cit. 2021-01-10]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4446465.html>
34. Vyššie rastliny [online]. [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/rastliny/vyssie-rastliny>
35. Rodozmena [online]. [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: <http://www.biomach.cz/biologie-rostlin/system-a-evoluce-rostlin/kapradorosty>
36. Thurzová, L. a kol.: *Malý atlas liečivých rastlín*. Martin: Osveta, piate, doplnené vydanie, 1973, 480 s. ISBN 70-031-73.
37. Clark, A.M.: Natural Products as a resource from new drugs. In: *Pharm. Res.*, 1996; 13: 1133.
38. Chang HC., Gupta S.K., Tsay HS. (2011). Studies on Folk Medicinal Fern: An Example of “Gu-Sui-Bu”. In: Kumar A., Fernández H., Revilla M. (eds) *Working with Ferns*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3_21
39. Ho, R., Teai, T., Bianchini, J.P., Lafont, R. and Rahariveloma-nana, P.: Ferns: From Traditional Uses to Pharmaceutical Development, Chemical Identification of Active Principles. In: *Working with Ferns: Issues and Applications*, New York: Springer, 2010, s. 321-346.

40. Cao, H., Chai, T. T., Wang, X., Morais-Braga, M. F. B., Yang, J. H., Wong, F. C., . . . Coutinho, H. D. M. (2017). Phytochemicals from fern species: potential for medicine applications. In: *Phytochemistry Reviews*, 16(3), 379-440. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9488-7>.
41. Goswami, H. K., Sen, K., & Mukhopadhyay, R. (2016). Pteridophytes: evolutionary boon as medicinal plants. In: *Plant Genetic Resources-Characterization and Utilization*, 14(4), 328-355. <https://doi.org/10.1017/s1479262116000290>.
42. Zhu, Q.-F.; Zhao, Q.-S. Chemical constituents and biological activities of lycophytes and ferns. In: *Chin. J. Nat. Med.*, 2019, 17, 887–891.
43. Májovský J. a kol.: *Rastliny lesov I*. Bratislava: Obzor, druhé prepracované a doplnené vydanie, 1976, 380 s. ISBN 65-023-76.
44. Khoshravesh, R., Akhani H., Eskandari M., Greuter W.: Ferns and fern allies of Iran. In: *Rostaniha (Botanical Journal of Iran)*, 2009, vol. 10, no. 1. ISSN: 1608-4306.
45. Smatana, M. (2010). Paprade, prasličky, plavúne [pdf]. [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <https://www.szkt.sk/dokumenty/oznamy/2010/paprade.pdf>
46. Ekrt, L. et al. (2010). Rozšíření a taxonomická problematika skupiny *Dryopteris affinis* v České republice. In: *Zpr. Čes. Bot. Společ.*, Praha, 45: 25–52.
47. Holub, J., Procházka, F. (2012). Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. In: *Preslia*, Praha, 84: 631–645.
48. *Dryopteris borreri* [online]. [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://www.agefotostock.com/age/en/details-photo/dryopteris-borreri-dandy-21-2b/MEV-10492565>
49. Čvančara A. (1988). *Blechnum L.* – žebrovice. In: Hejný S., Slavík B., Chrtek J., Tomšovic P. & Kovanda M. (eds), *Květena České socialistické republiky 1*, p. 278–280, Academia, Praha.
50. SLABÝ, O.: *Molekulární medicína*. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
51. ATCC – HCT-116 [online]. [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-247.aspx>
52. Vejražka, M.: *Buněčné kultury* [pdf]. [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: <https://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
53. Počítání buněk [pdf]. [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: http://www.rustreg.upol.cz/_materials/bubcv/BUBCV4.pdf

54. Water Soluble Tetrazolium Salts (WSTs) [pdf]. [cit. 2020-12-06]. Dostupné z: <https://www.interchim.fr/ft/F/F98881.pdf>
55. Cell Proliferation Reagent WST-1 [online]. [cit. 2020-12-06]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=en®ion=SK>
56. Intracellular ROS assay [online]. [cit. 2020-12-07]. Dostupné z: <https://bioquochem.com/product/dcfh-da-probe/>
57. Verma, S. K., Kanwar, S.: Medicinal Pteridophytes Used in the Treatment of Various Diseases by the Inhabitants of Sarkaghat Tehsil, Mandi District, Himachal Pradesh. In: *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol., 12(3), 2020, s. 360-364.
58. Baskaran, X.R., Geo Vigila, A.V., Zhang S.Z., Feng, S.X., Liao, W.B.: A review of the use of pteridophytes for treating human ailments. In: *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 2018;19:85–119. doi: 10.1631/jzus.B1600344.
59. Chai, T.T., Quah, Y., Ooh, K.F., Mohd Ismail, N.I., Ang, Y.V., Elamparuthi, S., Yeoh, L.Y., Ong, H.C., Wong F-C.: Antiproliferative, antioxidant and iron-chelating properties of the tropical highland fern, *Phymatopteris triloba* (Houtt) Pichi Serm (Family Polypodiaceae). In: *Trop J Pharm Res*, 2013; 12(5): 747-753.
60. Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation [online]. [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>
61. Cytotoxicity Detection Kit (LDH) [online]. [cit. 2021-04-17]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11644793001?lang=en®ion=SK>
62. Kuete, V., Karaosmanođlu, O., and Sivas, H. (2017). “Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables,” in *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, ed. V. Kuete (Cambridge, MA: Academic Press), 271–297. doi: 10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8.
63. ROCHE DIAGNOSTICS. Cell Proliferation and Viability Assay Methods. Roche Applied Science [online]. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z: <http://www.roche-applied-science.com/shop/en/cz/products/cell-proliferation-andviability-assay-methods>
64. Mariscal, A., Lopez-Gigosos, M. L., Carnero-Varo, M., Fernandez-Crehuet, J. (2009). Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 773-783.

65. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Almar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421-5426.
66. Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J.: Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. In: *Physiol Rev.*, 2014;94:909–950.
67. Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. In: *J Food Sci Technol* 48: 412-422.
68. Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. In: *Biochem Anal Biochem* 1: 106.
69. Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. In: *Chemické listy, Praha, ČR: Česká společnost chemická, 2004, roč. 98, č. 4, s. 174-179. ISSN 0009-2770.*
70. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In: *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 1995, s. 25-30.
71. ORAC assay to determine antioxidant capacity [online]. [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://www.bmglabtech.com/orac-assay-to-determine-antioxidant-capacity/>
72. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. In: *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 4290–4302.
73. Milan, C., Hana, C., Petko, D., Maria, K., Anton, S., Antonín, L.: Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. In: *Food Control*, 2010, 21, 518–523.