



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA VIABILITU BUNĚK A EXPRESI PROTEINŮ SPOJENÝCH S VÝSKYTEM ALZHEIMEROVA ONEMOCNĚNÍ

EFFECT OF NATURAL COMPOUNDS ON CELL VIABILITY AND PROTEIN EXPRESSION OF PROTEINS
ASSOCIATED WITH ALZHEIMER'S DISEASE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Klára Foltanová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2049/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Klára Foltanová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vliv přírodních látek na viabilitu buněk a expresi proteinů spojených s výskytem Alzheimerova onemocnění

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše k zadanému tématu

Výběr přírodních látek běžně se vyskytujících v lidské stravě nebo sloužících jako doplňky stravy

Studium vlivu vybraných přírodních látek na viabilitu buněčných linií

Ošetřování buněk B–amyloidy a pozorování míry exprese markerů Alzheimerova onemocnění pomocí PCR s využitím reverzní transkripce, a to v přítomnosti přírodních látek i bez nich

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2025:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Klára Foltanová
studentka

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Alzheimerova choroba je podle Světové zdravotnické organizace nejčastější formou demence, která vzniká v důsledku úbytku mozkových buněk. Zatímco dříve postihovala především lidi starší 65 let, dnes se stále častěji objevuje i u čtyřicátníků. První příznaky se mohou projevit po 10 až 20 letech po zasažení mozku Alzheimerovou chorobou. Mezi spouštěče této nemoci odborníci řadí dědičnost, vlivy životního prostředí, virové a bakteriální infekce. Jedním z klíčových znaků je hromadění amyloidu beta, který svým hromaděním poškozuje nervové buňky, což vede k jejich trvalému odumírání. V této práci jsme se věnovali přírodním látkám extrahovaných z běžně dostupných doplňků stravy, které mají podpořit kognitivní funkce.

Cílem této práce bylo stanovit vliv ženšenu, korálovce ježatého a apigeninu na viabilitu buněčných linií MCF-7, ND7/23, C57 BL6 a U87-MG. To bylo provedeno MTT testy, kde byla určena hodnota LD50 každé vybrané přírodní látky na jednotlivé buněčné linie zvlášť. Obecně nejodolnějšími buňkami byly buňky U87-MG, které dosáhly hodnoty LD50 pouze v přítomnosti 25 μ M apigeninu. Z testovaných buněčných linií byly ND7/23 nejcitlivější, protože u nich došlo k poklesu viability pod 50 % jako u prvních při dané koncentraci přírodních látek. Z testů viability byly vybrány vhodné koncentrace pro další měření, a tedy další z cílů této diplomové práce, ověření vlivu vybraných látek na expresi proteinů spojených s výskytem Alzheimerovy choroby. Jako proteinové markery tohoto onemocnění byly vybrány TAU, IL-6, IL-1 β , TNF, Aktin- β a INF γ .

Sledování změn exprese vybraných markerů bylo provedeno pomocí RT-qPCR. Buněčné linie ND7/23 a U87-MG byly kultivovány s vybranými látkami a A β po dobu tří a šesti dnů. Pouze v případě ženšenu došlo po šesti dnech kultivace k signifikantně významnému poklesu exprese proteinu Tau a Il-6 pro buněčnou linii ND7. V případě buněk U87-MG nebyly zjištěny signifikantně významné hodnoty, ale pro korálovce ježatého v šestý den kultivace bylo pro proteinu Tau naměřeno mírné zvýšení Ct hodnoty, tedy snížení exprese Tau proteinu. Snížení exprese těchto proteinů již po šesti dnech kultivace poukazují na možnost využití ženšenu a korálovce ježatého pro případnou prevenci Alzheimerovy choroby a další výzkum s dlouhodobou kultivací.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, ND7/23, U87-MG, ženšen, apigenin, korálovec ježatý, RT-PCR, Tau protein, amyloid beta (A β)

ABSTRACT

The World Health Organization states that Alzheimer's disease is the most common cause of dementia, which is triggered by the degeneration of brain cells. It primarily affects individuals aged 65 and older, but in recent years, it has increasingly been observed in population of people around the age of 40. The first symptoms can appear 10 to 20 years after diagnosis. Experts consider genetic predisposition, environmental factors, and viral or bacterial infections among the triggers of Alzheimer's disease. One of the key hallmarks is the accumulation of beta-amyloid, which damages nerve cells through its buildup, eventually leading to their permanent death.

In this study, we focused on natural compounds extracted from commonly available dietary supplements that are believed to support cognitive functions. The aim of this work was to determine the effect of ginseng, lion's mane mushroom (*Hericium erinaceus*), and apigenin on the viability of MCF-7, ND7/23, C57 BL6, and U87-MG cell lines. This was conducted using MTT assays, where the LD50 value of each selected natural substance was determined for each cell line separately. In general, the most resistant cells were U87-MG, which reached the LD50 value only in the presence of 25 μ M apigenin. The least resistant were the ND7/23 cells, which reached LD50 the earliest among all tested lines.

Based on the viability tests, suitable concentrations were selected for further measurements and thus another objective of this thesis: to evaluate the impact of the selected compounds on the expression of proteins associated with Alzheimer's disease. The selected protein markers for this condition were TAU, IL-6, IL-1 β , TNF, Actin- β , and IFN γ .

Changes in expression of the selected markers were monitored using RT-PCR. The chosen substances were cultured with ND7/23 and U87-MG cell lines for three and six days in the presence of A β . Only in the case of ginseng there was a statistically significant decrease in Tau and IL-6 protein expression observed after six days of cultivation in the ND7 cell line. In the U87-MG cells, no statistically significant results were found; however, for lion's mane mushroom on the sixth day of cultivation, a slight increase in the Ct value for the Tau protein primer was measured, indicating a decrease in Tau protein expression. This opens further possibilities for future testing.

Keywords: Alzheimer's disease, ND7/23, U87-MG, ginseng, apigenin, lion's mane mushroom, RT-PCR, Tau protein, amyloid beta (A β)

FOLTANOVÁ, Klára. *Vliv přírodních látek na viabilitu buněk a expresi proteinů spojených s výskytem Alzheimerova onemocnění*. Online, diplomová práce. Václav BRÁZDA (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162061>. [cit. 2025-04-29].

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu prof. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Velké díky patří také mé konzultantce Ing. Lucii Šislerové za úsilí, čas, trpělivost a rady, které mi věnovala vždy, když jsem je potřebovala. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat kolektivu oddělení Biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR, kde byla provedena experimentální část této práce.

1.	ÚVOD	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Alzheimerova choroba	10
2.1.1	Úloha hematoencefalické bariéry v Alzheimerově chorobě	13
2.2	G-kvadruplexy.....	14
2.3	Buněčné linie.....	15
2.3.1	Neurony.....	15
2.4	Přírodní látky s neuroaktivními účinky	16
2.4.1	Ženšen	17
2.4.1.1	Ginsenosidy	17
2.4.2	Korálovec ježatý.....	18
2.4.3	Apigenin	19
2.4.4	Fluorescenční Thioflavin T test.....	20
2.5	PCR	21
2.5.1	RT-PCR.....	22
2.5.1.1	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)	22
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1	Materiál a přístroje	23
3.1.1	Chemikálie	23
3.1.2	Biologický materiál	24
3.1.2.1	MCF-7	24
3.1.2.2	ND7/23	25
3.1.2.3	U87 MG.....	26
3.1.2.4	Schwannovy buňky C57 BL6	27
3.1.3	Ostatní	29
3.1.4	Roztoky a jejich příprava	29
3.1.5	Laboratorní přístroje a zařízení	30
3.2	Postupy	30
3.2.1	Rozmražení a pasážování buněčných linií	30
3.2.2	Příprava roztoků přírodních látek.....	30
3.2.3	Fluorescenční ThT test	31
3.2.4	MTT test viability.....	31
3.2.5	Kultivace buněk ND7 a U87 s amyloidy beta.....	32

3.2.6	RT-PCR.....	33
3.2.6.1	Izolace RNA	33
3.2.6.2	Reverzně transkripční PCR	33
3.2.7	Gelová elektroforéza	34
3.2.8	Zpracování dat.....	35
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4.1	Fluorescenční Thioflavin T test.....	35
4.2	Stanovení buněčné viability v přítomnosti vybraných přírodních látek.....	39
4.3	Izolace RNA	42
4.4	RT-PCR.....	44
5.	ZÁVĚR.....	48
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	49
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	61

1. ÚVOD

Alzheimerova choroba patří mezi nejrozšířenější neurodegenerativní onemocnění na světě a představuje nejčastější příčinu demence. Obvykle postihuje starší jedince od 65 let, ale je stále více pozorována i u mladších pacientů přibližně kolem 40 let. Typicky se projevuje zhoršením kognitivních schopností, jako je paměť, myšlení či orientace. V současnosti bohužel neexistuje účinná léčba, mimo jiné i kvůli tomu, že přesná příčina vzniku choroby stále není známá. Průměrná doba trvání Alzheimerovy choroby do diagnózy je 10 let, ale může se projevit i po 20 letech od vzniku prvních fyziologických změn v mozku, kdy pacient netrpí žádnými významnými problémy, přes ovlivnění fungování při každodenních činnostech až po problémy s běžnými životními aktivitami. Alzheimerova choroba není v současné době léčitelná a je ireverzibilní [1, 2]. Odborníci zvažují řadu možných spouštěčů a rizikových faktorů. Mezi ně patří například dědičnost, vlivy životního prostředí, různá chronická onemocnění či virové a bakteriální infekce. Jedním z klíčových znaků Alzheimerovy choroby je hromadění amyloidu beta ($A\beta$) – proteinových shluků, které poškozují nervové buňky a vedou k jejich odumírání. Akumulace neurotoxických peptidů $A\beta$ a Tau proteinu spouští kaskády, které vedou k neurodegeneraci, neurozánětu, poruchám synaptických spojů, nerovnováze neurotransmiterů, ztrátě neuronů a dendritickým změnám [3].

Bylinné léčivé prostředky mají dlouhou historii použití v tradiční medicíně. Své místo mají při zlepšení kognitivních funkcí a zmírnění příznaků Alzheimerovy choroby, jako jsou ztráta paměti a deprese. Přestože jejich využití v moderní medicíně poněkud ustupuje, některé rostliny stále přitahují pozornost díky svým nootropním (mozkové funkce podporujícím) a neuroprotektivním vlastnostem [4]. Bioaktivní látky v těchto rostlinách působí různými způsoby – chrání neurony před oxidačním stresem, toxiny či zánětem, podporují jejich růst a regeneraci a mohou zlepšovat paměť, koncentraci i celkové duševní zdraví. Volně prodejné doplňky stravy, které mají podporovat kognitivní zdraví, jsou na trhu hojně dostupné a často obsahují látky podporující s funkcí mozku, paměť a soustředění. Přestože nenahrazují léčbu a jejich účinnost bývá různá, někteří lidé je využívají jako podpůrný prostředek zejména při prevenci kognitivního poškození [5].

Mezi vybrané přírodní látky patří například ženšen, který je tradičně využíváný více než 5 000 let a je jedním z nejlépe prostudovaných bylinných léků. Bioaktivní látkou v ženšenu jsou ginsenosidy, které mají neuroprotektivní účinky a mohou snižovat produkci proteinových markerů Alzheimerovy choroby a $A\beta$. Bioaktivní látky ženšenu dokážou pronikat hematoencefalickou bariérou a mají tak potenciál pro cílenou léčbu neurologických onemocnění [6–8]. Další potenciálně účinným přírodním doplňkem stravy a hojně využívanou houbou v čínské medicíně, je korálovec ježatý. Bioaktivní látky v této houbě jsou například erinaciny, zejména erinacin A, který stimuluje syntézu nervového růstového faktoru. Korálovec ježatý je hojně studován pro své účinky na deprese, úzkosti a neurodegenerativní onemocnění. Poslední studie uvádí, že aktivní látky korálovce ježatého mohou procházet hematoencefalickou bariérou, eliminují buněčnou smrt způsobenou neurodegenerací a naznačují, že konzumací mycelia korálovce ježatého mohou být oddáleny ranné příznaky Alzheimerovy choroby [4, 9, 10]. Díky svému hojnému a dostupnému zastoupení ve stravě, je flavonoid apigenin nadějný prostředek pro dlouhodobou prevenci nebo oddálení nástupu

Alzheimerova onemocnění. Vykazuje antiamyloidigenní účinky a dokáže pronikat hematoencefalickou bariérou, kde se tak dostává do mozku přes krevní oběh. Je bohatě zastoupen v nati petržele, heřmánku, celeru a červeném víně [11–13].

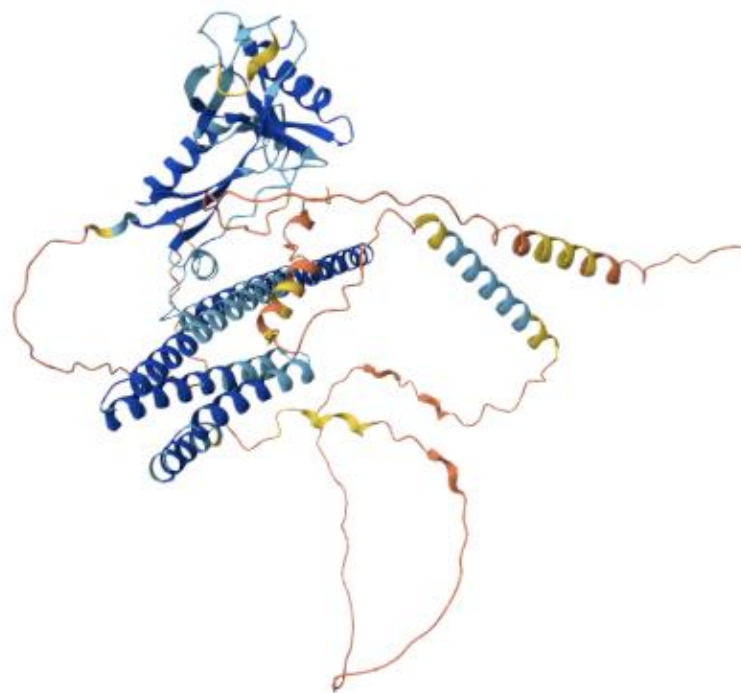
V současné době existují pouze dvě třídy schválených léků k léčbě Alzheimerovy choroby. Tyto léky jsou ale účinné pouze k léčbě příznaků, nikoliv k léčbě onemocnění. Alzheimerova choroba se projevuje pomalu až po několika letech, kdy dojde k fyziologickým změnám v mozku. Proto je důležité cílit na prevenci a předcházet tak možným příčinám tohoto onemocnění [14].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Alzheimerova choroba

Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO, z angl. *World Health Organization*) trpí demencí přibližně 50 milionů lidí na celém světě a každý rok přibývá asi 10 milionů nových případů. Alzheimerova choroba (ACH), pojmenovaná po Aloisi Alzheimerovi [14], je nejčastější příčinou demence, která je způsobena degenerací buněk v mozku. Představuje 60 až 70 % všech případů a postihuje především starší část populace [6]. Jedná se o progresivní, nevratnou a zrychlující se mozkovou poruchu, která má za následek ztrátu kognitivních schopností. Dále vede ke změně chování a postupné ztrátě osobní autonomie [15]. Patogeneze této choroby zůstává dodnes nejasná [16, 17]. Je však dobře známo, že chybné skládání a aglomerace proteinových agregátů v mozku spouští patogenezi. Alzheimerova choroba je charakterizována patologickými znaky, a to intracelulárním ukládáním nadměrně fosforylovaného proteinu Tau, který podporuje tvorbu neurofibrilárních shluků, extracelulárními agregáty peptidu A β ve formě neurotických plaků a ztráta synaptických spojů [18]. Ukládání amyloidu beta, uloženého ve formě amyloidního plaku v hipokampu, vede ke vzniku nerozpustných agregátů, což může způsobovat mitochondriální poškození a synaptickou dysfunkci neuronů [19]. Biomarkery oxidačního stresu nelze u Alzheimerovy choroby klinicky testovat kvůli nutnosti odběru vzorku ze zdroje, tedy z mozku pacienta. Mezi kognitivní biomarkery Alzheimerovy choroby se řadí ztráta paměti, problém při plánování nebo řešení úkolů, záměna času nebo místa, potíže s porozuměním vizuálních obrazů, problémy se slovy, mluvením a psaním [20].

Amyloidový prekursorový protein (APP) hraje zásadní roli jako receptor zapojený do regulace tvorby synapsí, v transportu železa a neuroplasticitě [21]. APP je v přítomnosti β - a γ -sekretáz proteolyticky štěpen na rozpustný amyloid beta sestávající se ze 40 aminokyselin a nerozpustný amyloid beta sestávající se ze 42 aminokyselin [22]. V důsledku toho dochází k tvorbě charakteristických extracelulárních amyloidních plaků, což vede k poškození synapsí [23]. Hromadění těchto plaků je právě jedním z definujících rysů Alzheimerovy choroby a předpokládá se, že narušuje buněčnou funkci a spouští neurodegeneraci. Výzkumy prokazují, že hromadění amyloidních plaků nastává již desítky let před prvními projevy Alzheimerovy choroby. To naznačuje, že akumulace amyloidu beta je jedním z prvních procesů tohoto onemocnění, který spouští kaskádu neurodegenerativních změn. Dalším předpokladem je, že A β hraje roli ve špatném skládání a agregaci proteinu Tau, který také patří mezi klíčové faktory Alzheimerovy choroby. Hladiny amyloidu beta v mozku lze měřit pomocí různých biomarkerů, což z něj činí důležitý cíl pro diagnostiku [19, 24]. V případě Alzheimerovy choroby agregované plaky A β obsahují kovové ionty. Měď je v mozku přítomna v relativně vysokých hladinách a A β může chelátovat kovové ionty, čímž se A β -měď stává přímým zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS) [25]. Obrázek 1 znázorňuje strukturu částečně složeného amyloidu beta.



Obrázek 1: Částečně složená struktura A β ve vodném prostředí [26].

Několik molekulárních drah se podílí na aktivaci imunitních reakcí v mozku, což vede k uvolňování prozánětlivých cytokinů, jako je TNF- α a interleukinů (IL). Tyto cytokiny přispívají k ukládání amyloidu beta, což následně vede k synaptické dysfunkci [27]. Interleukiny, především interleukin-1-beta (IL-1 β), hrají významnou roli v imunitní odpovědi organismu. IL-1 β je produkován primárně aktivovanými imunitními buňkami, jako jsou makrofágy a mikroglie, v důsledku reakce na infekci nebo jiné zánětlivé signály. K neurozánětu přispívají interleukiny aktivací dalších imunitních buněk, například mikroglíí, které podporují uvolňování dalších zánětlivých molekul. Studie prokázaly, že IL-1 β negativně ovlivňuje synaptickou plasticitu a kognitivní funkce, včetně učení a paměti. Tyto mechanismy činí IL-1 β zásadním mediátorem zánětlivé odpovědi při Alzheimerově chorobě. Dalším klíčovým interleukinem s podobnými vlastnostmi je IL6, který je vysoce exprimován u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Přispívá k akumulaci amyloidu beta a kognitivnímu poklesu [28].

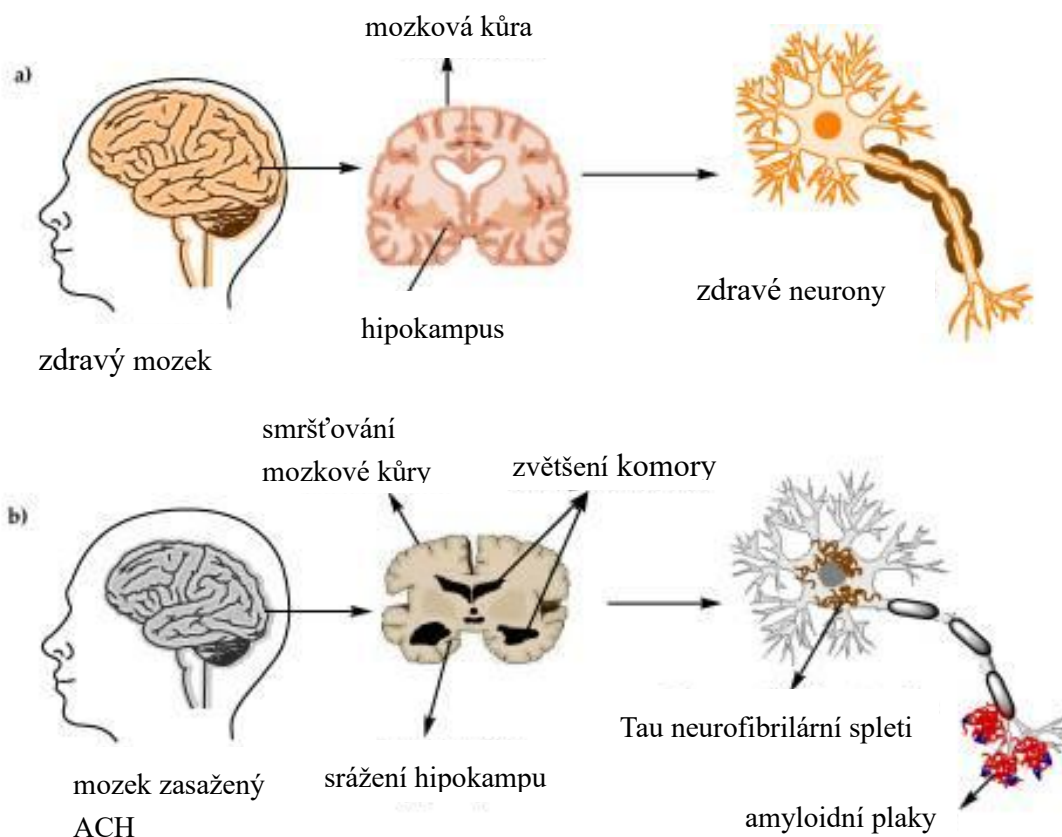
TNF, tumor nekrotizující faktory, jsou skupina prozánětlivých cytokinů, které hrají významnou roli v imunitní odpovědi těla. Existují ve formách TNF- α a TNF- β , ale TNF- α je zvláště významný v souvislosti s Alzheimerovou chorobou. TNF- α je produkován imunitními buňkami a působí jako signální molekula, která reguluje zánět uvolňováním jiných cytokinů, ovlivňuje přežití buněk, diferenciaci a apoptózu. Zvýšené hladiny TNF- α jsou spojeny s kognitivním poklesem a neurodegenerací [29, 30]. Dále ovlivňuje hematoencefalickou bariéru tak, že ji činí propustnější, což umožňuje prostup většímu množství škodlivých látek. V neposlední řadě narušuje TNF- α procesy, které jsou nezbytné pro učení a paměť. Veškeré tyto vlastnosti dělají z TNF- α klíčový cytokin, který při správné hladině přispívá k imunitní regulaci, při zvýšené

hladině ale vede k neurozánětlivým procesům u Alzheimerovy choroby a řídí progresi tohoto onemocnění [31].

Dalším významným cytokinem při Alzheimerově onemocnění je IFN γ , neboli interferon-gama. Je primárně produkován imunitními T buňkami. Hraje klíčovou roli v modulaci imunitní odpovědi, zejména při aktivaci makrofágů [32]. IFN γ je zásadní pro boj s virovými, bakteriálními infekcemi a některými nádorovými interakcemi. U neurozánětlivých stavů, jako je Alzheimerova choroba, se IFN γ podílí na aktivaci mikroglií a indukci produkce zánětlivých mediátorů. Jedná se o kritický imunitní modulátor, který hraje významnou roli při poškození neuronů [33, 34].

Nedávné studie naznačují potenciální propojení aktinu- β , což je protein zapojený do struktury a pohybových vlastností buněk, s Alzheimerovou chorobou prostřednictvím jeho role v cytoskeletu. Jedná se o jednu z izoform aktinu a hraje zásadní roli v udržování cytoskeletu, který dává buňkám tvar a umožňuje jejich pohyb [35]. U Alzheimerovy choroby je hlavním charakteristickým rysem cytoskeletální dysfunkce. Aktinová vlákna, jejichž součástí je aktin- β , jsou zásadní pro zdraví a stabilitu neuronů. Narušení aktinového cytoskeletu může přispět ke kognitivním deficitům a interakcí s Tau proteinem přispívá k tvorbě klubek a poškození neuronů. Aktin- β je také rozhodující pro správnou funkci synapsí. V případě Alzheimerovy choroby je synaptická dysfunkce častým jevem, který vede ke ztrátě paměti a poškození kognitivních funkcí [36]. Studie prokázaly, že amyloidní plaky mohou ovlivnit dynamiku aktinu, destabilizovat aktinová vlákna v neuronech a narušovat cytoskeletální integritu. Změněná regulace aktinu v neuronech byla spojena s patologickými změnami pozorovanými u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Akumulace Amyloidu beta vede k narušení buněčného transportu a neuronální degeneraci [37].

Obrázek 2 znázorňuje porovnání fyziologické struktury mozku a neuronů ve zdravém mozku a v případě Alzheimerovy choroby.



Obrázek 2: Fyziologická struktura mozku a neuronů a) ve zdravém mozku a b) v mozku zasaženém Alzheimerovou chorobou [14].

Oxidační stres hraje klíčovou roli v rozvoji Alzheimerovy choroby i jiných neurodegenerativních onemocnění. Citlivost neuronů k oxidaci je vysoká díky vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin v buněčných membránách, slabé oxidační obraně a vysoké spotřebě kyslíku nervovými buňkami [3, 38].

2.1.1 Úloha hematoencefalické bariéry v Alzheimerově chorobě

Hematoencefalická bariéra (BBB, z angl. *blood-brain barrier*) je rozhraní mezi krevním oběhem a centrální nervovou soustavou (CNS), které zajišťuje striktní kontrolu výměny látek mezi krví a mozkovou tkání. Díky této schopnosti hraje klíčovou roli v udržování homeostázy mozku, jeho ochraně před toxickými látkami a patogeny a v regulaci transportu živin a iontů. Hematoencefalická bariéra se skládá z několika důležitých struktur, především z endotelových buněk, které tvoří těsné spoje zabráňující průniku látek. Dalšími součástmi jsou bazální membrána zajišťující stabilitu bariéry, pericyty regulující její propustnost, astrocyty podporující její vývoj a funkci a mikroglie, které přispívají k imunitní ochraně CNS [39]. To je zásadní pro ochranu před škodlivými látkami, změnami ve složení krve a rozkladem koncentračních gradientů [40, 41].

Hematoencefalická bariéra vykazuje různé mechanismy transportu, mezi které patří pasivní difúze lipofilních molekul, aktivní transport specifických látek jako je glukóza, receptorově zprostředkovaný přenos například inzulinu nebo leptinu a endocytóza větších molekul [42]. Tyto mechanismy umožňují přesnou kontrolu přenosu látek do mozku a z něj. Tato bariéra omezuje průnik většiny léčiv do mozkové tkáně, což komplikuje účinnou terapii. Těsné spoje

mezi endotelovými buňkami a selektivní transportní mechanismy brání přenosu terapeutik, která by mohla přímo ovlivnit patologické procesy v mozku [43].

Významný potenciál mají také přírodní látky, jako je kurkumin nebo resveratrol, které disponují protizánětlivými a neuroprotektivními účinky a jsou schopny pronikat BBB. Dále se zkoumá využití genové terapie, která umožňuje doručit terapeutické geny přímo do CNS pomocí vektorů překonávajících BBB. V posledních letech bylo dosaženo významného pokroku, například při použití transportérů, jako jsou receptory pro inzulin, k vázání léčiv a jejich přenosu do mozku. Rovněž se testují terapeutické přístupy zaměřené na regeneraci hematoencefalické bariéry u neurodegenerativních onemocnění, kde bývá bariéra často narušena [40].

2.2 G-kvadruplexy

V souvislosti s výskytem Alzheimerovy choroby jsou zvláště zajímavé sekundární struktury DNA, a to G-kvadruplexy (G4) [44]. G-kvadruplexové struktury jsou složeny z několika guaninových kvarterů, nejjednodušší vzniká ze dvou, kde každý je tvořen čtyřmi guaniny [45]. Jednotlivé kvartety jsou stabilizovány monokovaletním kationtem ve středu tetrad [46]. G-kvadruplexy se podílejí na regulaci procesů DNA a RNA, jako je replikace, transkripce, translace, lokalizace RNA a degradace. Nedávné studie prokázaly, že se G-kvadruplexy v některých případech tvoří jako důsledek stresu v eukaryotických buňkách [47]. Za nestresových podmínek byly G-kvadruplexy z velké části rozloženy, ale po navýšení vlivu stresových podmínek došlo k jejich složení. Tyto poznatky přinášejí možnost, že by se G-kvadruplexy mohly formovat za zvýšených a chronických stresových podmínek vlivem stárnutí a přítomnosti Alzheimerovy choroby v lidském mozku. To by vedlo k abnormálně vysokým hladinám G-kvadruplexů u starších dospělých osob [48].

Ze všech identifikovaných G-kvadruplexových struktur se zvláštní pozornost v případě Alzheimerovy choroby věnuje pěti a šesti tetradovým G-kvadruplexům, které jsou za fyziologických podmínek stabilní. Tato stabilita naznačuje jejich potenciální roli v regulaci genů spojených s neurodegenerací. V lidském mozku byly G-kvadruplexy identifikovány v genech, jako jsou ALOX5, ATF1, CCNB2 a AEBP1, které mají přímou nebo nepřímou souvislost s Alzheimerovou chorobou [49]. ALOX5 je gen kódující enzym zapojený do metabolických drah zánětlivých procesů, které hrají klíčovou roli v neuroinflamaci – jednom z hlavních faktorů progresivního poškození mozku u pacientů s Alzheimerovou chorobou. AEBP1 byl spojen s adipogenezí a neurodegenerací, zatímco CCNB2 ovlivňuje regulaci buněčného cyklu, jehož narušení může vést k patologickým procesům v nervové tkáni [50, 51].

Díky své stabilitě a umístění v regulačních oblastech těchto genů mohou pěti a šesti skládané G-kvadruplexy významně ovlivňovat expresi klíčových faktorů Alzheimerovy choroby. Mohou fungovat jako transkripční brzdy, které tlumí expresi určitých genů, nebo naopak jako aktivátory, pokud interagují s regulačními proteiny. Tato jejich vlastnost z nich činí potenciální terapeutický cíl, protože modulace jejich stability by mohla ovlivnit progresi neurodegenerativních onemocnění [49].

Studie potvrzující stabilitu těchto struktur naznačují, že budoucí výzkum by se měl zaměřit na vývoj molekulárních nástrojů, které by mohly selektivně stabilizovat nebo destabilizovat

G-kvadruplexy v klíčových genech. To by mohlo otevřít nové možnosti v léčbě Alzheimerovy choroby, ať už prostřednictvím malých molekul, které by cílily na specifické G4 struktury, nebo prostřednictvím genové terapie zaměřené na ovlivnění jejich tvorby [50, 52].

Pro využití G-kvadruplexů byly v této práci využívány oligonukleotidy, které reprezentují příslušné struktury. Například oligonukleotid hTel reprezentuje podmínky přítomné v lidských telomerách. To jsou koncové části chromozomů, které se při buněčném dělení zkracují kvůli neschopnosti enzymu telomerázy syntetizovat konce lineárních nukleových kyselin a mají vysoké hodnoty pravděpodobnosti tvorby G-kvadruplexů [53]. Další strukturou, která je známá pro výskyt G-kvadruplexů je protoonkogen cMYC, který je u lidí kódován genem MYC a je členem rodiny transkripčních faktorů *Myc*. Oligonukleotid mycPU21 reprezentuje strukturu tohoto genu, který je známý tím, že jeho sekvence vytváří kvartérní struktury [54].

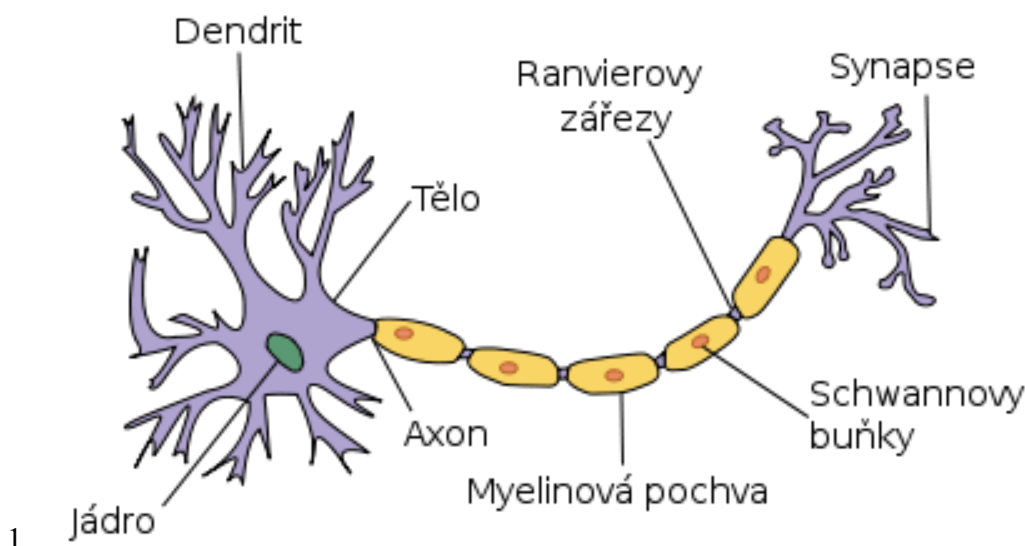
2.3 Buněčné linie

Buněčná linie představuje kulturu buněk, které mají v případě nádorových linií prakticky neomezenou životnost a schopnost neomezeného buněčného dělení. Tento typ kultury vzniká z buněčných kmenů procesem transformace nebo mohou být izolovány přímo z živé tkáně, například nádorové buňky, u kterých dochází k selhání mechanismů regulujících buněčný cyklus. Příkladem mohou být HeLa buňky, izolované v 50. letech 20. století z karcinomu děložního hrdla Henrietty Lacksové [55].

2.3.1 Neurony

Neurony jsou specializované buňky v nervovém systému, odpovědné za přenos informací prostřednictvím chemických signálů. Skládají se ze tří hlavních částí. Z těla buňky (soma), dendritů, které přijímají signály, a axonů, které vysílají signály do jiných neuronů nebo svalů. Hrají klíčovou roli při zpracování a sdělování informací v celém těle [56]. Jedním z problémů kultivace neuronových buněk je to, že zralé neurony neproliferují.

Kvůli neschopnosti dělení nervových buněk se při jejich studiu využívají buněčné linie podobné neuronům nebo nádorové nervové buňky. Tyto modely hrají klíčovou roli v pokroku při studiu neurodegenerativních onemocnění [57]. Studium těchto buněčných modelů může dojít k lepšímu porozumění základním mechanismům onemocnění, jako je Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingtonova choroba [56]. Neuronové modely poskytují platformu pro testování účinnosti potenciální léčby a pochopení toho, jak neurony reagují na různé chemické látky a sloučeniny. Tyto modely lze také manipulovat, aby napodobovaly různé změny podobné onemocnění, což umožňuje studium patologických změn spojených s neurodegenerativními chorobami [58].



Obrázek 3: Grafické znázornění stavby neuronu [59].

Alzheimerova choroba je charakterizována progresivní ztrátou neuronů a synapsí v mozku. Spojení mezi neurony a tímto onemocněním je charakterizováno především degenerací neuronů v oblastech mozku odpovědných za paměť a kognitivní funkce [60].

2.4 Přírodní látky s neuroaktivními účinky

Byliny a bylinná léčiva mají již dlouhou historii využití v medicíně a zdají se tak být bezpečná a účinná. V poslední době se ale od jejich využití upouští. Mnohé rostliny a jejich složky se doporučují v tradičních lékařských postupech ke zlepšení kognitivních funkcí a ke zmírnění příznaků Alzheimerovy choroby, jako jsou ztráta paměti či deprese. Obvykle se doporučuje jedna bylina nebo směs více bylin v závislosti na složitosti stavu pacienta. Důvodem kombinování bylin je, že bioaktivní látky přítomné v jedné bylině mohou modulovat aktivitu jiných složek ze stejné nebo jiné byliny. Rostliny, které jsou považovány za nootropika (látky podporující kognitivní funkce), mají řadu vlastností, které mohou zlepšit paměť, koncentraci, učení a kreativitu [4, 5, 61].

Tyto vlastnosti jsou založeny na jejich aktivních chemických látkách, které působí prostřednictvím různých fyziologických mechanismů ke zlepšení duševního zdraví, paměti, soustředění a celkového zdraví mozku. Mnoho rostlinných nootropik obsahuje silné antioxidanty, které chrání mozkové buňky před oxidačním stresem způsobeným volnými radikály. Tento typ ochrany je zásadní, protože právě oxidační poškození je spojeno s poklesem kognitivních funkcí a rozvinutím neurodegenerativních poruch, jako je právě Alzheimerova choroba. Rostliny, které vykazují neuroprotektivní vlastnosti, pomáhají chránit neurony před poškozením způsobeným toxiny nebo zánětem. Pomáhají tak zachovávat strukturu a funkci mozku v průběhu času. Některé rostliny stimulují produkci proteinů, lipidů a nukleových kyselin, které jsou nezbytné pro růst a opravu neuronů. To je nezbytně důležité k udržení zdravého mozku a opravu poškození, které je způsobeno stárnutím nebo zraněním [4, 62, 63].

Důvodem volby níže uvedených rostlin je jejich dlouhé historické využití v tradiční medicíně v souvislosti s poruchami paměti a zlepšení celkových kognitivních vlastností.

2.4.1 Ženšen

Názvem ženšen označujeme kořeny několika druhů rostliny rodu *Panax*, které jsou známé pro své léčivé vlastnosti. Ženšen je vysoce ceněná rostlina v tradiční medicíně, jejíž využití se datuje již před 5000 lety. Dva nejčastější druhy jsou korejský ženšen (*Panax ginseng*) a americký ženšen (*Panax quinquefolius*). Ženšen byl rozsáhle studován pro své účinky na různé zdravotní stavy a je považován za jeden z nejvíce prozkoumaných bylinných doplňků [7]. Během posledních let vědecké studie, preklinické a klinické testy podpořily příznivé účinky ženšenu na centrální nervový systém [8].

Ženšen byl studován pro své potenciální přínosy v případě léčby či prevence Alzheimerovy choroby díky svým neuroprotektivním vlastnostem. Výzkumy ukazují, že ženšen může mít příznivý vliv na kognitivní deficity u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Dále bylo prokázáno, že ženšen snižuje neurotoxicitu spojenou s amyloidy beta a Tau proteiny, které jsou klíčovými přispěvateli k patologii Alzheimerovy choroby [7].

Ženšen a jeho vztah k hematoencefalické bariéře se opírá o výzkumy zaměřené na jeho bioaktivní složky, zejména ginsenosidy. Studie naznačují, že některé složky ženšenu mohou překonat hematoencefalickou bariéru a mít neuroprotektivní účinky. Bylo zjištěno, že ženšenové nanočástice podobné exozomům efektivně pronikají hematoencefalickou bariérou a hromadí se v mozkové tkáni, zejména v oblastech postižených neurologickými poruchami, jako je Alzheimerova choroba nebo gliomy [64]. To naznačuje potenciální využití ženšenu v léčbě těchto onemocnění, například jako nosiče pro cílenou terapii. Celkově výzkum potvrzuje, že ženšen může ovlivnit mozkové procesy, což otevírá možnosti pro jeho využití v neurovědách a medicíně [65].

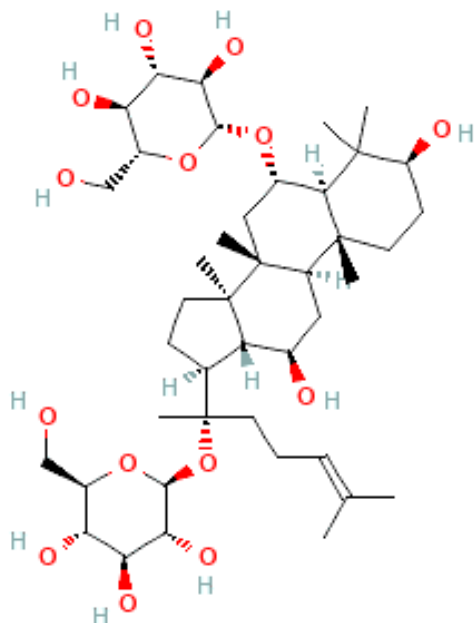
Produkty obsahující ženšen jsou populárně označovány v alternativní medicíně jako adaptogeny. Jsou známé pro údajné navýšení odolnosti vůči fyzickému, chemickému a biologickému stresu a budují obecnou vitalitu. Hlavními účinnými látkami v ženšenu jsou ginsenosidy, což jsou triterpenové saponiny [66]. Díky svým jedinečným příznivým účinkům se ženšen stal cennou součástí tradiční čínské medicíny [67].

2.4.1.1 Ginsenosidy

Jednou z hlavních účinných látek ženšenu je ginsenosid Rg1, který přitahuje pozornost především v prevenci neurologických poruch, zejména demence a deprese. Bylo prokázáno, že ginsenosid Rg1 ovlivňuje Alzheimerovu chorobu v různých fázích jejího výskytu, zejména v časných a středně pozdních fázích. Během časných fází může mírnit příznaky Alzheimerovy choroby zvýšením exprese synaptického proteinu, podporou růstu axonů, inhibicí tvorby A β a nadměrnou fosforylací Tau proteinů. Tyto kroky napomáhají zmírnit tvorbu amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek, které jsou patologickými znaky Alzheimerovy choroby [68].

Ginsenosid Rg1 prokazuje potenciální terapeutické přínosy v různých fázích této choroby, což z něj činí kandidáta pro další klinické zkoumání a vývoj léků. Další významnou aktivní látkou je ginsenosid Rb1, který vykazuje antioxidační, protizánětlivé, neuroprotektivní vlastnosti a dále vykazuje potenciál u kardiovaskulárních a neurologických onemocněních. V neposlední

řadě je další aktivní látkou ženšenu i ginsenosid Rg3. Obrázek 4 znázorňuje chemickou strukturu ginsenosidu Rg1.



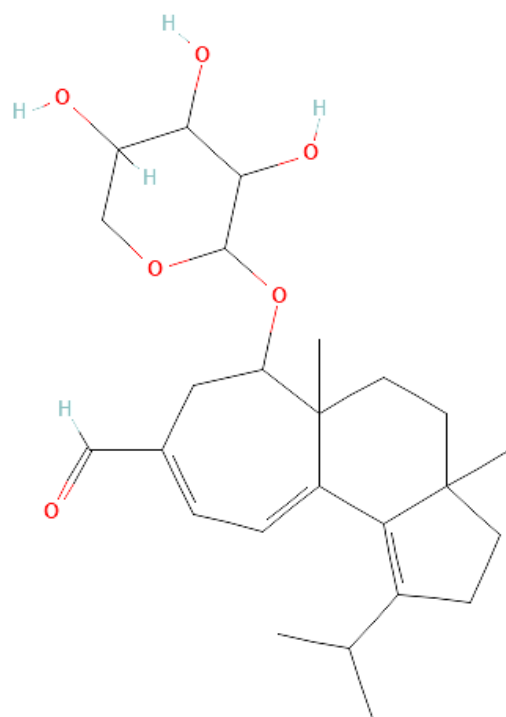
Obrázek 4: Chemická struktura ginsenosidu Rg1 [69].

2.4.2 Korálovec ježatý

Korálovec ježatý, Lion's mane nebo *Hericium erinaceus*, je jedlá houba vyskytující se především ve východní Asii. Je široce využívána jako potravina a jako rostlinný lék v tradiční čínské medicíně. V posledních letech se korálovec ježatý používá ve studiích v souvislosti s úzkostmi a depresí [9]. Různé sloučeniny izolované z této houby indukují expresi neurotrofických faktorů, jako jsou nervové růstové faktory [70]. Studie naznačují, že aktivní látky této houby mohou projít hematoencefalickou bariérou a přispívají tak k neuroprotektivní funkci v centrálním nervovém systému. To aktivním látkám umožňuje uplatnit své neuroprotektivní účinky přímo v mozku, což je vlastnost s vysokým potenciálem pro terapeutické aplikace. Aktivní sloučeniny v korálovci ježatém stimulují syntézu nervového růstového faktoru, který je rozhodující pro přežití a udržení neuronů a jeho nedostatek vede právě k onemocněním jako je Alzheimerova choroba [10, 71]

Klinické studie ukazují, že konzumace mycelia korálovce ježatého by mohla zabránit časným symptomům Alzheimerovy choroby, což přispívá k jeho potenciálu jako bezpečného a účinného doplňku stravy [72, 73]

Hlavní aktivní skupinou látek v korálovci ježatém jsou erinaciny. Erinacin A, hlavní zástupce erinacinové skupiny, má prokázáný zesilující účinek na syntézu nervových růstových faktorů *in vitro*. Toto zvýšené množství nervových růstových faktorů výrazně zvyšuje viabilitu neuronů v různých oblastech mozku zvířecích modelů. Mnohé preklinické studie naznačily, že erinacin A je účinný při eliminaci buněčné smrti vyvolané neurodegenerativním onemocněním [74, 75].

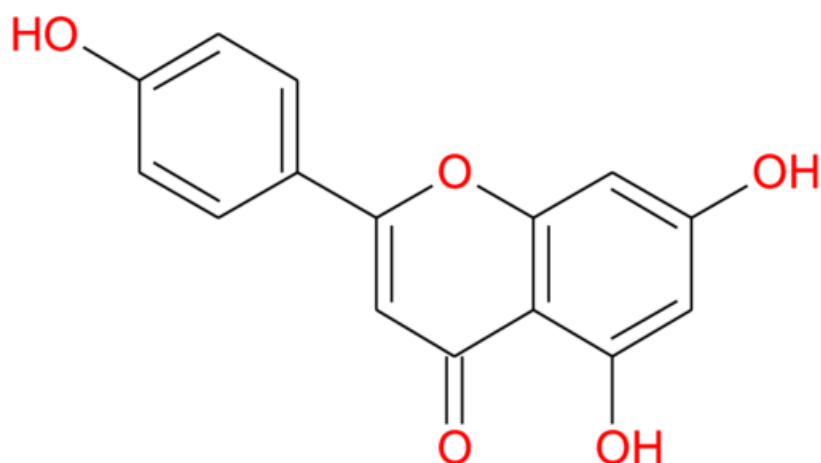


Obrázek 5: Chemická struktura erinacinu A [76].

2.4.3 Apigenin

Apigenin, také 4',5,7-trihydroxyflavon, je flavonoid patřící do skupiny přirozeně se vyskytujících polyfenolů [11]. Je hojně obsažen v petrželi, heřmánku, celeru, dále je součástí červeného vína a piva [13]. Tato bioaktivní látka vykazovala aktivity, které naznačují významnou roli v prevenci proti široké škále chronických chorob [12]. Působí jako lapač volných radikálů a vykazuje antimutagenní a protizánětlivé činky, může ovlivňovat signalizační dráhy spojené s přežitím neuronů a snížením oxidačního stresu, což by mohlo zpomalit progresi neurodegenerace. Jeho potenciální terapeutické využití u Alzheimerovy choroby se tedy opírá o schopnost snižovat zánět a chránit nervové buňky před poškozením [77, 78].

V přírodě se vyskytuje v čisté i glykosylované formě. Čistý apigenin je relativně nestabilní kvůli vysokému počtu hydroxylových skupin, což urychluje proces jeho degradace. Ve své glykosylované formě má lepší rozpustnost ve vodě. Tento fakt je potřeba brát v úvahu při extrakčních metodách využívaných pro výrobu léčiv z rostlinných zdrojů bohatých na apigenin. Ve své čisté formě je apigenin žlutá krystalická látka, která je téměř nerozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná v ethanolu, DMSO a DMF [79].



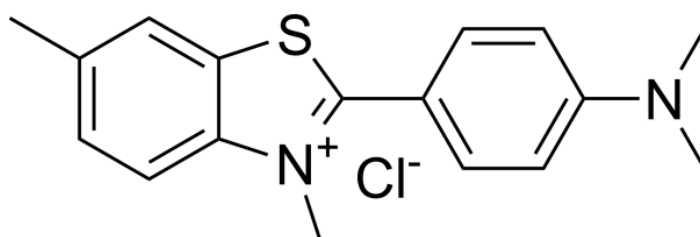
Obrázek 6: Chemická struktura apigeninu [80].

Apigenin je po absorpci do trávicího traktu schopen dostat se do mozku oběhovým systémem, kde může projít hematoencefalickou bariérou [80–82]. Několik přírodních bioaktivních sloučenin, včetně apigeninu, sloužících pro zlepšení paměti a učení, bylo označeno za slibné kandidáty pro další léčbu pacientů s Alzheimerovou chorobou [83]. Apigenin je také aktivní jako antioxidant, protizánětlivá, antiamyloidogenní, neuroprotektivní látka se zajímavým potenciálem při prevenci této choroby. Dietní dostupnost apigeninu by mohla představovat úspěšnou dlouhodobou léčbu k oddálení nástupu symptomů nebo před samotným vznikem onemocnění [84].

2.4.4 Fluorescenční Thioflavin T test

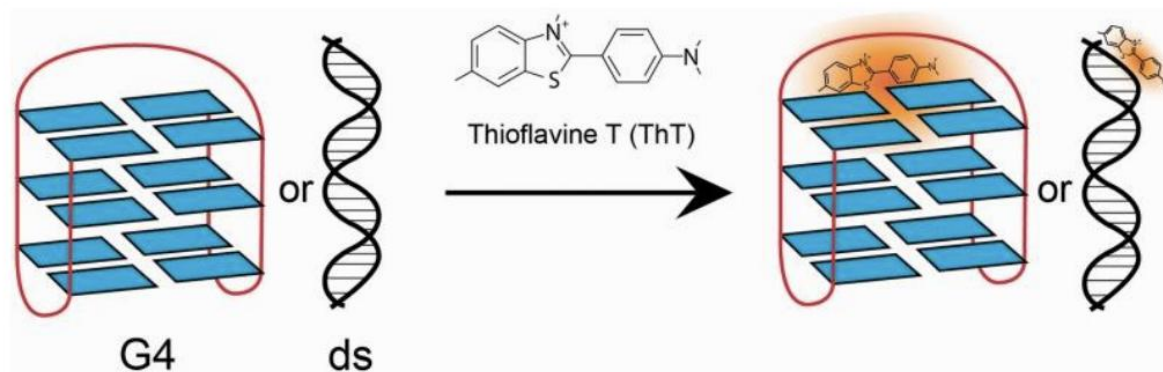
Thioflavin T (ThT) je benzothiazolová sůl získaná methylovací dehydrothiotoluidinu methanolem v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové. Barvivo je široce využíváno k vizualizaci a kvantifikaci přítomnosti chybně složených proteinových agregátů, neboli amyloidů, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, například plaky A β v mozcích pacientů s Alzheimerovou chorobou. Když se ThT váže na struktury bohaté na β -listy (typ prostorového uspořádání proteinu) jako jsou ty v amyloidních agregátech, barvivo vykazuje zvýšenou fluorescenci [85, 86].

Před navázáním na amyloidní fibrilu emituje Thioflavin T slabě kolem 427 nm. Při excitaci při 450 nm produkuje Thioflavin T silný fluorescenční signál při přibližně 482 nm po navázání na amyloidy [87].



Obrázek 7: Molekula Thioflavinu T [88].

Thioflavin T se dále často využívá jako fluoresceční světelná sonda pro identifikaci vytvořených G-kvadruplexů. Po vazbě na kvartérní struktury se stává silně fluorescentním a využívá se tak jako rychlý test k ověření jejich přítomnosti. Schéma testu znázorňuje Obrázek 8.



Obrázek 8: Princip ThT testu za použití Thioflavinu T. Fluorescence ThT je zesílena při interakci s G-kvadruplexem. V případě nízkého fluorescenčního signálu se v sekvenci pravděpodobně G-kvadruplex nenachází [85].

2.5 PCR

Polymerázová řetězová reakce je široce používaná technika molekulární biologie, která umožňuje amplifikaci specifických sekvencí DNA. Tento proces umožňuje tvořit velké množství kopií určitého segmentu DNA z malého počátečního vzorku, což se uplatní například při studiu a analýze DNA.

Fáze jednoho amplifikačního cyklu jsou tedy denaturace, která probíhá 10-30 sekund při teplotě 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových vazeb a tím dojde k rozdělení dvouřetězcového vlákna. Následným krokem je hybridizace primerů, která probíhá 30-60 sekund při 50-68 °C. V tomto kroku nasedají specifické primery na jednovláknový řetězec. Teplota hybridizace primerů je odvozena od jejich teplot tání, přičemž by teplota samotné hybridizace měla být o 2-5 °C nižší. Posledním krokem je syntéza nového řetězce, která probíhá běžně při 72 °C zhruba 15 sekund na 1 kbp. Zde dochází pomocí DNA polymerázy k syntéze DNA ve směru 5'→3' od místa nasednutí primerů.

Kvantitativní nebo real-time PCR (qPCR) se běžně využívá ke kvantifikaci hladin mRNA, což umožňuje posoudit, jak jsou geny exprimovány za různých podmínek nebo ošetření, což poukazuje na hladiny výsledných proteinů. Dále se využívá při studiu regulace genové exprese a účinků různých podnětů na hladiny RNA [89].

V tradiční PCR se detekce a kvantifikace amplifikované sekvence provádí na konci reakce a zahrnuje analýzu, jako je gelová elektroforéza a analýza obrazu. V kvantitativní PCR v reálném čase (real-time PCR) se produkt měří v každém cyklu [90, 91].

PCR má široké spektrum využití, především v oblasti genových technologií, klonování, sekvenování, analýze DNA, dále v medicíně slouží k detekci patogenů u infekčních chorob nebo genetických mutací. PCR nachází využití i ve forezních vědách, enviromentálním testování a další [92].

2.5.1 RT-PCR

Reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce je variací standartní PCR techniky, která je specificky navržena pro amplifikaci RNA sekvencí. Široce se využívá v molekulární biologii ke studiu genové exprese a analýze hladin RNA v různých biologických vzorcích.

Proces RT-PCR začíná přepisem RNA na cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Po syntéze cDNA se provede standardní PCR amplifikace, která probíhá při 25-40 cyklech. To zahrnuje denaturaci, nasedání primerů a prodlužování řetězce, podobně jako u tradiční PCR. Cyklické amplifikaci předchází počáteční iniciace při teplotně denaturačním kroku a po ukončení všech cyklů následuje finální elongace, při které dochází k dosyntetizování řetězce.

Výstupem z měření touto metodou jsou amplifikační křivky, které popisují závislost fluorescence na počtu cyklů. Nejdůležitější hodnotou je hodnota Ct, tedy „threshold cycle“. Udává hodnotu, ve které hodnota fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce. Čím vyšší je hodnota Ct, tím později fluorescenční signál překročí práh detekce a tím je nižší koncentrace templátu v reakční směsi. Díky těmto hodnotám je tak možno porovnat pokles či nárůst exprese sledovaných genů [93].

2.5.1.1 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Analýza křivek tání je technika, která se často používá v molekulární biologii, zejména při studiu produktů po RT-qPCR. Tento proces může poskytnout informace o struktuře a složení DNA fragmentů, což je důležité pro potvrzení specifity PCR produktu a pro identifikaci různých molekulárních anomálií, jako jsou nespecifické produkty nebo dimery primerů [94].

Podrobněji, metoda HRM (z angl. *High Resolution Melting*) sleduje změny ve fluorescenčním signálu během zahřívání vzorků. Jak se zvyšuje teplota, dochází k denuraci DNA, což znamená, že se oddělují vlákna dvoušroubovice. Tento proces je velmi závislý na sekvenčním složení DNA, konkrétně na zastoupení guaninu a cytosinu, které mají vyšší stabilitu díky třem vodíkovým vazbám. Naopak, adenin a thymin se od sebe oddělují při nižších teplotách, což ovlivňuje celkový profil tání DNA [95].

Teplota tání (T_m) je klíčovým parametrem, který odráží, při jaké teplotě dojde k denuraci 50 % molekuly DNA. Tento parametr je citlivý na velikost a složení DNA, což je velmi užitečné při analýze PCR produktů. Metoda HRM využívá DNA saturující barviva, která interagují s dvouřetězcovou DNA, což umožňuje monitorování změn ve fluorescenčním signálu. Tento pokles fluorescence je indikátorem denaturace DNA.

Tato metoda má široké využití, nejen v diagnostice, ale i v detekci mutací, identifikaci polymorfismů nebo pro analýzu chyb v PCR, což může být velmi užitečné pro přesnou a efektivní interpretaci molekulárních dat [96].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

2-mercaptoethanol (SIGMA-ALDRICH)

Apigenin 97% (ALFA AESAR)

Dihydrogenfosforečnan draselný (SIGMA-ALDRICH)

DMEM/F12 1:1 (GIBCO)

DMSO (SIGMA-ALDRICH)

DNAza (BIOLABS)

DNAza pufr (BIOLABS)

Doxorubicin HCL (SIGMA-ALDRICH)

EDTA (SIGMA-ALDRICH)

Ethanol 99,8% pro UV spektroskopii (LACHNER)

Fetal bovine serum (BIOSERA)

Hydrogenfosforečnan sodný (SIGMA-ALDRICH)

Chlorid draselný (SIGMA-ALDRICH)

Chlorid sodný (SIGMA-ALDRICH)

iScrip Reverzně transkripční Supermix (ELIZYME)

Korálovec ježatý (HEALTHY WORLD)

Kyselina octová (SIGMA-ALDRICH)

L-glutamin (SIGMA-ALDRICH)

PCR voda (TOP-BIO)

Penicillin 10,000 units/ml (PENSTREP)

qPCR 2x SYTO-SYBR Master Mix (TOP-BIO)

Reverzní transkriptáza (TOP-BIO)

RNAlater Stabilization Solution (INVITROGEN)

Thioflavin T (SIGMA ALDRICH)

Tris (SIGMA-ALDRICH)

Tris-HCl (DUCHEFA BIOCHEMIE)

Trypsin-EDTA 0,5% 10x (GIBCO)

Žeňšen fermentovaný extrakt kapsle, 400 mg/kapsli (VITALVIBE)

3.1.2 Biologický materiál

Amyloid beta (1-40) peptid (CAYMAN CHEMICAL)

Buněčná linie ND7/23 (Anatomický ústav MUNI)

Buněčná linie C57 BL6 (Anatomický ústav MUNI)

Buněčná linie U-87 MG (AV ČR Biofyzikální ústav)

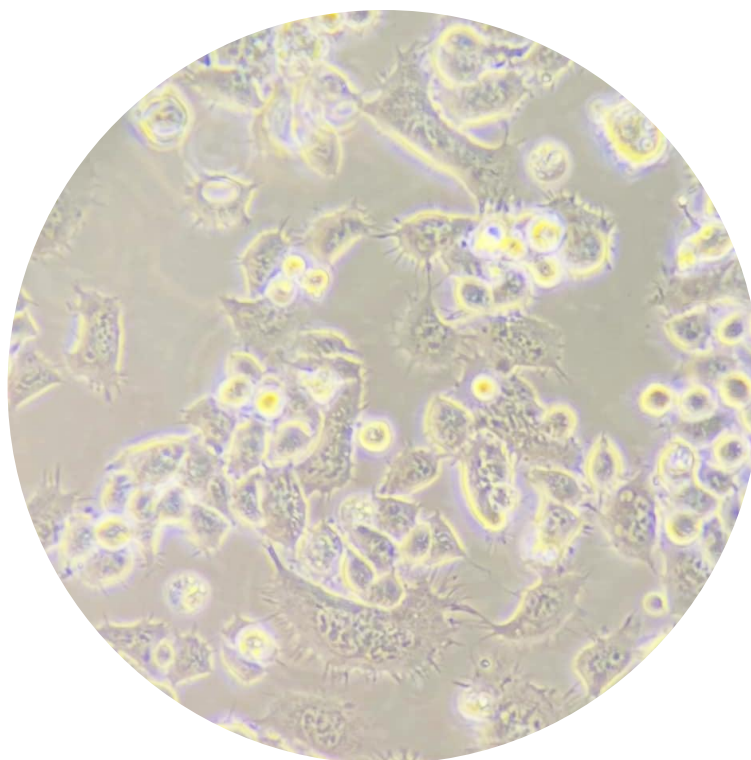
Buněčná linie MCF-7 (dr. Vojtěšek MOU)

Tabulka 1: Použité buněčné linie.

Název linie	Organismus	Linie
ND7/23	Myš/krysa	Myší neuroblastom a krysí dorzální kořenové ganglie neuronů
U-87 MG	Člověk	Glioblastom
C57 BL6	Myš	Schwannovy buňky
MCF7	Člověk	Karcinom prsu

3.1.2.1 MCF-7

Jedná se o buněčnou linii rakoviny prsu jejíž název je odvozen od Michigan Cancer Foundation-7. Tato buněčná linie byla poprvé izolována v roce 1970 z prsní tkáně nemocné ženy, která prodělala mastektomii. Byl tak odhalen maligní adenokarcinom v pleurálním výpotku, ze kterého vznikla linie MCF-7. Tyto buňky jsou využívány pro studium karcinomu *in vitro*, protože zachovává například schopnost zpracovávat estrogen ve formě estradiolu prostřednictvím estrogenových receptorů v buněčné cytoplazmě [97]. Obrázek 9 zachycuje buňky MCF-7 v médiu pod mikroskopem v přiblížení 40x.



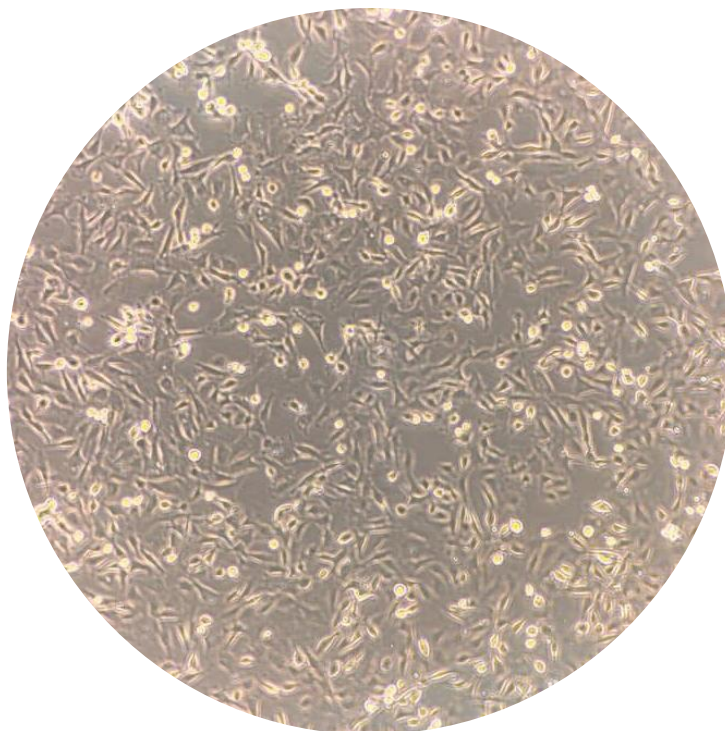
Obrázek 9: Mikroskopický snímek buněk MCF-7 se zvětšením 40x.

3.1.2.2 *ND7/23*

ND7 buňky jsou hybridní buněčná linie, která byla odvozena z potkaních glanglií v embryonálním stádiu a myších neuroblastomových buněk. Díky svým unikátním vlastnostem kombinujícím charakteristiku sensorických neuronů a nádorových buněk se staly klíčovým modelovým systémem v neurobiologickém výzkumu. Buňky ND7 jsou široce využívány ke studiu neurogeneze, diferenciaci, apoptózy a molekulárních procesů souvisejících s funkcí neuronů [98].

Dalším významným přínosem buněk ND7 je jejich využití při studiu epigenetických mechanismů. Tyto buňky umožňují zkoumat, jak epigenetické změny, jako je acetylace a methylace histonů, ovlivňují proliferaci a diferenciaci neuronů. Buňky ND7 tak poskytují jedinečný pohled na epigenetickou regulaci neurogeneze [99]. Buňky se rovněž používají k modelování neuronálních procesů, jako je transport proteinů a tvorba synaptických spojení. Jejich hybridní povaha umožňuje studium molekulárních mechanismů, které jsou zásadní pro funkci neuronů. Kromě toho slouží jako model pro analýzu apoptózy a neurotoxicity.

Díky těmto vlastnostem jsou buňky ND7 využívány i při testování terapeutických strategií zaměřených na regeneraci sensorických neuronů a léčbu neurodegenerativních onemocnění. Jejich schopnost reagovat na různé chemické a biologické faktory z nich činí cenný nástroj při vývoji léčiv. Výhodou buněk ND7 je jejich snadná kultivace a manipulace v laboratorních podmínkách. Lze je snadno geneticky modifikovat, což umožňuje detailní studium funkcí specifických genů nebo proteinů. [98]. Obrázek 10 zachycuje buňky ND7/23 pod mikroskopem v médiu po přiblížení 40x.



Obrázek 10: Mikroskopický snímek buněk ND7/23 se zvětšením 40x.

3.1.2.3 U87 MG

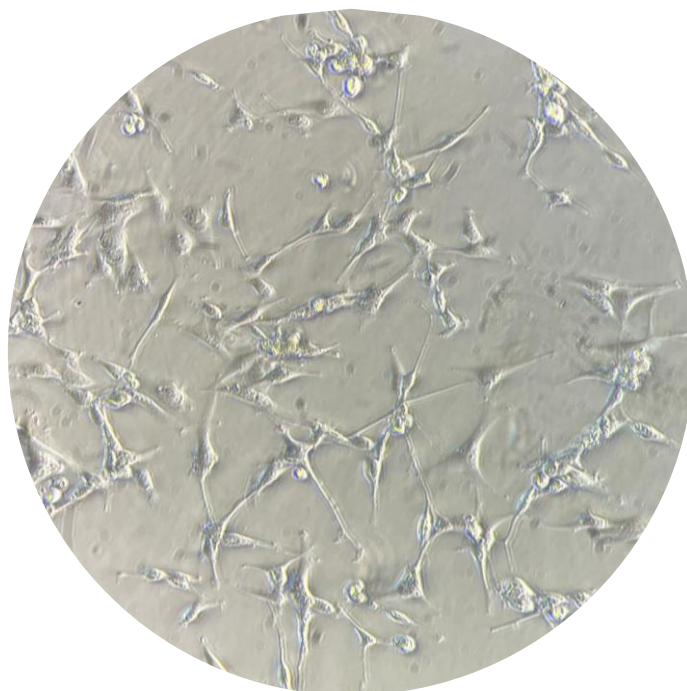
Buněčná linie U87 MG, získaná v roce 1968 od 44leté pacientky, pochází z lidského glioblastomu a je charakteristická svými onkogenními vlastnostmi. Tato adherentní linie je hojně využívána v *in vitro* modelech pro výzkum glioblastomů a také pro *in vivo* studie, kdy jsou buňky U87 transplantovány do modelových organismů, jako jsou myši nebo potkani. Po transplantaci vznikají homogenní nádory, které jsou dobře prostoupeny cévami. Tyto nádory vykazují zvýšenou expresi proteinů p53, ale zároveň mají nízkou expresi GFAP, což je marker, který je běžně přítomen u gliových buněk [99, 100].

Buněčná linie U87 MG se vyznačuje expresí mutantních proteinů, jako je PTEN a proteiny dráhy PI3K/Akt. Ačkoliv je tato linie původem z glioblastomu, buňky U87 neexprimují S100 β , což je neurotrofní faktor typický pro jiné glioblastomové linie. Dále je třeba zmínit, že při dlouhodobé kultivaci buněk U87 může docházet ke genetickým změnám, které jsou pravděpodobně důsledkem selekčního tlaku, což může vést k odchylkám od původní linie.

Buňky U87 MG vykazují značnou odolnost vůči stresu a na rozdíl od jiných glioblastomových linií jsou méně citlivé na léky zaměřené na metabolismus purinů. Při kultivaci vytvářejí shluky buněk, které mohou být využívány jako trojrozměrné modely pro studium různých patologií. V centrech větších shluků se nacházejí nekrotické buňky, které přecházejí do apoptických buněk směrem k okrajům, kde jsou přítomny buňky viabilní. Shluky buněk U87 se tvoří přirozeně, ale po delší kultivaci již nemají tendenci dále růst. Velikost těchto shluků ovlivňuje průchodnost metabolitů z kultivačního prostředí do jejich vrstev.

Buňky U87 MG po diferenciaci rovněž vykazují schopnost interagovat s imunitními buňkami, podobně jako lidský imunitní systém v kooperaci s cholinergními neurony. Tato buněčná linie

tedy nejen poskytuje model pro výzkum glioblastomů, ale také otevírá nové možnosti pro studium neuronálních procesů a interakcí mezi imunitními a nervovými buňkami [101–103].



Obrázek 11: Mikroskopický snímek buněk U87 se zvětšením 40x.

3.1.2.4 Schwannovy buňky C57 BL6

Schwannovy buňky se nacházejí v periferním nervovém systému. Hrají zásadní roli při tvorbě myelinových pochv kolem axonů, což jsou dlouhé výběžky nervových buněk, které přenášejí elektrický signál. Myelinové pochvy izolují axony a usnadňují rychlé vedení elektrických impulzů, což je nezbytné pro přenos nervových signálů. Schwannovy buňky poskytují metabolickou podporu neuronů, čímž pomáhají udržovat jejich zdraví a funkci. Podílejí se na opravě a regeneraci poškozených neuronových buněk tím, že poskytují základní signály a podněty pro přežití poškozených neuronů a regeneraci axonů [104]. Tyto buňky se podílejí na rozkladu myelinu, přitahují makrofágy a podporují vaskularizaci a navádějí axony zpět do jejich cílových tkání po poranění. Dále čistí zbytky myelinu, produkují cytokiny a spolupracují s jinými buňkami na vytvoření prostředí vedoucího k opravě a regeneraci nervů [105]. Obrázek 12 zachycuje buňky C57 BL6 pod mikroskopem v médiu s přiblížením 40x.



Obrázek 12: Mikroskopický snímek buněk C57 BL6 se zvětšením 40x.

Vybrané primery markerů Alzheimerovy choroby (Anatomický ústav MUNI)

Tabulka 2: Přehled použitých primerů markerů Alzheimerovy choroby.

Gen	Primer T	Primer F	Velikost fragmentu
Aktin- β	GTTTGAGACCTTCAACACCC	CCAATGGTGATGACCTGG CC	384 pb
Tau	GAAGCAGCATGGCTGAACCC	GCTTGAGTCACATGCCCA GC	175 pb
Il-1 β	CCAGGATGAGACCCAAGCA	TCCCGACCATTGCTGTTTC C	518 pb
Il6	CTTCCAGCCAGTTGCCTTCT	GAGAGCATTGGAAGTTGG GG	496 pb
TNF α	ATGAGCACAGAAAGCATGAT G	TACAGGCTTGTCACTCGAA TT	276 pb
IFN γ	ACACTCATTGAAAGCCTAGAA AGTCTG	ATTCTTCTTATTGGCACAC TCTCTACC	432 pb

Syntetické oligonukleotidy hTel24, mycPU21 1, Random 22-1, hTel 24 2 (SIGMA-ALDRICH)

Tabulka 3: Název a sekvence použitých oligonukleotidů. G4 skóre vyjadřuje pravděpodobnost zformování G4 na základě matematického výpočetního modelu. Při skóre 1,2 a vyšším je vysoká pravděpodobnost zformování G4.

Název	Sekvence	G4 skóre
mycPU21 1	AGCTTGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAA	1,89
hTel24 1	AGCTTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAA	1,20
Random 22-1	TAGATCTGGATTGACTCTATGA	0,18

3.1.3 Ostatní

QuickGene RNA Tissue kit SII (KURABO)

3.1.4 Roztoky a jejich příprava

10x PBS 1 litr

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 14,4 g Na₂HPO₄
- 2,4 g KH₂PO₄

50x TAE 1 litr

- 242 g Tris
- 18,6 g EDTA
- 57,1 ml kyselina octová

DMEM médium

- 500 ml médium
- 50 ml FBS 10%
- 0,5 ml penicillin
- 3,75 ml L-glutamin

Korálovec ježatý

- 5 kapslí rozpuštěno ve vodě
- Alkoholová extrakce
- Centrifugace při 13 000 rpm
- Přidání 99,8% ethanolu
- Vakuové odpaření
- Přídavek 200 µl DMSO a 800 µl vody

Ženšen

- 5 kapslí rozpuštěno ve vodě
- Alkoholová extrakce
- Centrifugace při 13 000 rpm
- Přidání 99,8% ethanolu
- Vakuové odpaření
- Přídavek 150 µl DMSO a 850 µl vody

MTT na jednu 96-jamkovou destičku

- 10 mg MTT
- 2 ml PBS
- 10 ml DMEM média

3.1.5 Laboratorní přístroje a zařízení

Centrifuga 5804 R (EPPENDORF)

Flow box (TELSTAR)

Inkubátor (MEMMERT)

QuickGene-Mini80 (FUJIFILM)

3.2 Postupy

3.2.1 Rozmražení a pasážování buněčných linií

Buněčné linie nervových buněk ND7, Schwannových buněk C57, buněk karcinomu prsu MCF7 a buněk lidského glioblastomu U87 v kryozkumavkách byly vytaženy z -80 °C a po rozmražení byl jejich obsah převeden do sterilních zkumavek s 5 ml kultivačního DMEM média. Buňky byly následně centrifugovány při 400 otáčkách/min 10 minut. Po odstředění byl odsán supernatant a buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml DMEM média. Buňky byly přeneseny do sterilních kultivačních nádob o ploše 25 cm² a bylo přidáno 5 ml DMEM média. Takto byly buňky kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

Při 90% konfluenci buněk bylo stávající médium odsáto, buňky byly promyty 5 ml PBS a po přidání 1 ml trypsinu byly inkubovány 5 minut v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Následně byl přidán 1 ml DMEM média a roztok s buňkami byl rozdělen do dvou sterilních kultivačních nádob. Do každé nádoby o ploše 75 cm² bylo přidáno 10 ml DMEM média a následně byly uloženy zpět do inkubátoru.

3.2.2 Příprava roztoků přírodních látek

Zásobní roztoky přírodních látek byly připraveny z volně prodejných doplňků stravy. Kvůli obsahu β-glukanů a dalších nežádoucích látek nestačilo kapsle rozpustit ve vodě, ale bylo nutné využít alkoholovou extrakci.

Ze zakoupeného balení ženšenu bylo dvacet kapslí rozpuštěno ve vodě, abychom se zbavili ve vodě rozpustných látek a roztok byl stočen v centrifugační zkumavce na 13 000 rpm po dobu

10 minut. Supernatant s ve vodě rozpustnými látkami byl slit a pelet byl následně byl rozpuštěn v 99,8% ethanolu a obsah zkumavky byl centrifugován na 13 000 rpm po dobu 10 minut. Aktivní látky zůstaly rozpuštěné v ethanolu a balastní látky utvořily na dně zkumavky pelet. Přebytečný ethanol byl odpařen na vakuové odparce a k získaným aktivním látkám bylo po odpaření přidáno 150 μ l DMSO a 850 μ l vody. Koncentrace získaného roztoku byla odvozena z údajů uvedených výrobcem na obalu. Ze zakoupeného balení ženšenu byl získán roztok o koncentraci 260 mg/ml ginsenosidů, z toho 30,8 mg byly ginsenosidy Rg1, Rb1 a Rg3.

Ze zakoupeného balení korálovce ježatého bylo také dvacet kapslí rozpuštěno ve vodě, následně byl přidán alkohol a provedena alkoholová extrakce, kde aktivní látky zůstaly rozpuštěny v alkoholové fázi. Roztok byl centrifugován při 13 000 rpm. Následně byl přidán 99,8% ethanol a byl odpařen na vakuové odparce. K získané sušině bylo přidáno 200 μ l DMSO a 800 μ l vody. Výsledná koncentrace byla opět určena dle údajů od výrobce, roztok aktivních látek tedy měl koncentraci 1 000 mg/ml.

3.2.3 Fluorescenční ThT test

Pomocí této metody byla testována schopnost vybraných přírodních látek vázat se na strukturu G-kvadruplexu a vytěsnit tak z vazby molekulu Thioflavinu T. Byly použity syntetické oligonukleotidy, jejichž sekvence a názvy jsou uvedeny v Tabulka 3. Oligonukleotidy byly naředěny vodou na koncentraci 100 μ M a následně na koncentraci 2 μ M ve 100mM Tris-HCl a 100mM KCl. Vzorky byly následně zahřívány na 95 °C po dobu 5 minut a pomalu ochlazovány na laboratorní teplotu. Mikrozkušavky byly obaleny parafilmem, aby nedošlo k odpaření vzorků. Thioflavin T byl vodou naředěn na koncentraci 2 μ M. Měření probíhalo v černé 384-jamkové destičce při laboratorní teplotě.

Vybrané oligonukleotidy byly smíchány s ThT a vybranými přírodními látkami ve zvolené koncentrační řadě (10 μ l oligonukleotidu, 5 μ l 2 μ M ThT a 5 μ l testovaných přírodních látek). Fluorescence byla měřena při 490 nm po excitaci při 425 nm. Všechny vzorky byly měřeny v tripletech za laboratorní teploty.

3.2.4 MTT test viability

Tato metoda byla provedena ke stanovení metabolické aktivity buněk po přidání testovaných přírodních látek v různých koncentracích. Žluté MTT, neboli (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] – 2,5-difenylyltetrazolium bromid), se vlivem mitochondriálních enzymů dýchacího řetězce mění na fialový, v médiu nerozpustný, formazan tvořící krystalky a zůstává uvnitř buněk. Tento test je založen na měření absorbance v jamkách při 590 nm. Čím vyšší absorbance je naměřena, tím více živých buněk v jamce je.

Buňky byly počítány pomocí Bürkerovy komůrky a dále ředěny na hustotu 750 000 buněk na mililitr a doplněny DMEM médiem do objemu 20 ml do sterilní centrifugační zkumavky. Následně byl roztok buněk převeden do kultivační 96jamkové destičky po 200 μ l pro každou buněčnou linii zvlášť. Destičky byly ponechány v inkubátoru 48 hodin. Roztoky ženšenu a korálovce ježatého byly připraveny ze zakoupených kapslí a jejich koncentrace byla vyhodnocena z údajů uvedených výrobcem na obalu. Z toho důvodu jsou roztoky použitých přírodních látek v jiných jednotkách, než roztoky apigeninu a doxorubicinu, které byly

připraveny ze zakoupených standardů. Následně bylo odsáto médium z jamek a bylo nahrazeno roztoky DMEM média a vybraných přírodních látek v koncentracích 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 mg/ml pro korálovec ježatý a ženšen. V případě apigeninu byla koncentrační řada 200; 100; 50; 25; 12,5 μmol . Současně byla připravena i pozitivní kontrola, kde bylo pouze DMEM médium. Jako negativní kontrola byla připravena koncentrační řada doxorubicinu o koncentracích 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63 μmol . Destičky byly inkubovány 24 hodin v inkubátoru.

Po uplynutí doby inkubace bylo médium odsáto, buňky byly promyty 120 μl PBS a bylo přidáno 120 μl roztoku MTT do každé jamky. Destičky byly inkubovány 3 hodiny v inkubátoru. Po inkubaci byl obsah jamek odsán a do každé jamky bylo přidáno 150 μl roztoku isopropanolu a kyseliny chlorovodíkové v poměru 500:1. Následně byly destičky inkubovány 15 minut na třepačce. Absorbance v jednotlivých jamkách byla měřena readerem při 590 nm. Tento test byl proveden pro buněčné kultury ND7, C59, U87 a MCF7.

3.2.5 Kultivace buněk ND7 a U87 s amyloidy beta

Buňky ND7 byly ve 12-jamkové destičce kultivovány v hustotě 750 000 buněk na mililitr s A β a extraktem z ženšenu nebo korálovce ježatého podle Tabulka 4. Všechny jamky byly doplněny DMEM médiem do konečného objemu 1 ml. Takto připravená destička byla ponechána ke kultivaci v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Odběry vzorků byly provedeny třetí a šestý den od začátku kultivace. Ve třetí den inkubace bylo médium z jamek pro pozitivní kontrolu (PK) a šestý den odběru odsáto a vyměněno za nové společně s přidavkem ostatních komponent z Tabulka 4. Odebraný roztok buněk byl centrifugován 8 minut na 13 000 otáček/minutu, následně byl odebrán supernatant a pelet byl resuspendován v 200 μl RNAlater pufru. Takto připravené vzorky byly uloženy na -20 °C.

Tabulka 4: Komponenty pro přípravu vzorků na kultivaci buněk ND7 a U87 s A β a přírodními látkami.

Ženšen			
	roztok buněk (μl)	A β (μl)	ženšen (μl)
PK	100,0	25,0	0,0
3. den	300,0	25,0	0,5
6. den	100,0	25,0	0,5
Korálovec ježatý			
	roztok buněk (μl)	A β (μl)	korálovec ježatý (μl)
PK	100,0	25,0	1,0
3. den	300,0	25,0	1,0
6. den	100,0	25,0	1,0

V případě buněk U87 bylo měření nejprve provedeno s přidavkem A β a i bez. Výsledky byly totožné a proto dále nebyly do jednotlivých jamek přidány A β . Rovnost naměřených hodnot s a bez A β je způsobena tím, že tento typ buněk má porušenou expresi Tau proteinu [106]. Buňky byly kultivovány v 6-jamkové destičce, kvůli větším nárokům na místo vlivem rychlejšího růstu. Celkový objem po doplnění DMEM médiem byl 2 ml.

3.2.6 RT-PCR

3.2.6.1 Izolace RNA

Izolace RNA z buněk U87 a ND7 byla provedena komerčně zakoupeným kitem QuickGene RNA tissue kit SII. Vzorky z odběru ze třetího a šestého dne byly vytaženy z -20 °C a ponechány k rozmrznutí na ledu. Následně byly vzorky centrifugovány 8 minut na 13 000 otáček/minutu. Supernatant byl odebrán a nahrazen 500 μ l roztoku LRT a 10 μ l 2-mercaptoethanolu. Po resuspendaci byly vzorky opět centrifugovány 3 minuty na 14 000 otáček/minutu při pokojové teplotě. Následně bylo odebráno 385 μ l supernatantu do nových sterilních mikrozkušavek a bylo přidáno 175 μ l SRT roztoku. Vzorky byly vortexovány 15 sekund. Následně bylo přidáno 140 μ l 99% ethanolu a mikrozkušavky byly vortexovány 1 minutu. Obsah mikrozkušavek byl převeden na extrakční kolony s porézní membránou. Ty byly následně vloženy do přístroje QuickGene-Mini80. Vzorky byly přístrojem přefiltrovány přes porézní membránu, kde byly zachyceny nukleové kyseliny a následně promyty 750 μ l WRT promývacím pufrem. Celý objem byl opět přefiltrován přístrojem přes membránu. Následně bylo přidáno 40 μ l připravené DNAsy o koncentraci 2 U/ μ l a ponecháno k inkubaci 5 minut při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 750 μ l WTR pufru a vzorky byly dvakrát extrahovány přístrojem přes membránu.

Pod extrakční kolony byly umístěny sterilní mikrozkušavky, na membránu bylo nanášeno 100 μ l roztoku CRT a po 2 minutové inkubaci byla výsledná RNA eluována. Koncentrace takto získané RNA byla ihned měřena na přístroji NanoDrop. Jako slepý vzorek byl použit roztok CRT a na optickou část přístroje bylo vždy nanášeno 1,5 μ l vzorku.

3.2.6.2 Reverzně transkripční PCR

Vzorky RNA získané izolací byly nejprve převedeny reverzní transkripcí na komplementární DNA (cDNA). Všechny vzorky izolované RNA byly naředěny na stejnou koncentraci, a to na 400 ng/ μ l. Od každého vzorku RNA byly připraveny čtyři stejné vzorky pro reverzní transkripci, a to následovně podle Tabulka 5.

Tabulka 5: Jednotlivé složky pro přípravu jednoho vzorku pro reverzní transkripci.

iScrip Reverzně transkripční Supermix	4 μ l
Reverzní transkriptáza	1 μ l
RNA	Dle přepočtu na 400 ng/ μ l
PCR voda	Do celkového objemu vzorku 20 μ l

Převedení RNA na cDNA bylo provedeno pomocí přístroje Rotor-gene 6 000, kde byly nastaveny jednotlivé reakční parametry dle následující Tabulka 6.

Tabulka 6: Reakční podmínky pro reverzní transkripci.

	Teplota (°C)	Čas (min)
Nasedání primerů	25	5
Reverzní transkripce	46	20
Inaktivace reverzní transkriptázy	95	1

Takto nachystaná cDNA byla dále využita k přípravě vzorků na samotnou PCR. Z každého vzorku cDNA bylo připraveno šest zkumavek s reakční směsí pro PCR, a to pro každý primer jedna. Jednotlivé složky reakční směsi pro jeden vzorek jsou vypsány v tabulce. Samotná PCR byla provedena přístrojem Rotor-gene 6000, který byl nastaven podle parametrů zapsaných v Tabulka 7.

Tabulka 7: Reakční směs pro jeden vzorek na PCR.

PCR voda	6,5 µl
SYTO PCR SYBR Master Mix	12,5 µl
Primer F (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer R (10 pmol/µl)	1,0 µl
cDNA	6,0 µl (120 ng)

Tabulka 8: Reakční podmínky PCR.

Číslo kroku	Krok PCR	Teplota/čas
1	Denaturace DNA před prvním cyklem	95 °C/2 min
2	Denaturace DNA	95 °C/30 s
3	Nasedání primerů	51 °C/30 s
4	Syntéza řetězce DNA	72 °C/60 s
	Počet cyklů	35

Získaná data byla analyzována softwarem přístroje Rotor-Gene 6 000.

3.2.7 Gelová elektroforéza

Pro ověření správnosti výsledků z PCR byl připraven 1% agarózový gel, na který byly amplifikované vzorky nanесeny. Gel byl připraven rozpuštěním 2 g agarózy v 200 ml 1x koncentrovaného TAE pufu. Tato směs byla následně rozehrívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění všech krystalů agarózy. Po mírném ochlazení pod tekoucí vodou bylo do gelu přidáno 5 µl interkalačního barviva GelRed a roztok přelit do již připravené formy na gel, byl vložen hřebínek na vytvoření jamek a byl ponechán do úplného ztuhnutí. Následně byl gel

vyjmut z formy a uložen do elektroforetické vany. Gel byl zalit 1xTAE pufrem a aparatura byla připojena ke zdroji elektrického napětí na 90 V po dobu 90 minut. Po uplynutí 90 minut byl gel vyjmut z elektroforetické vany a přenesen na transiluminátor k vizualizaci výsledků.

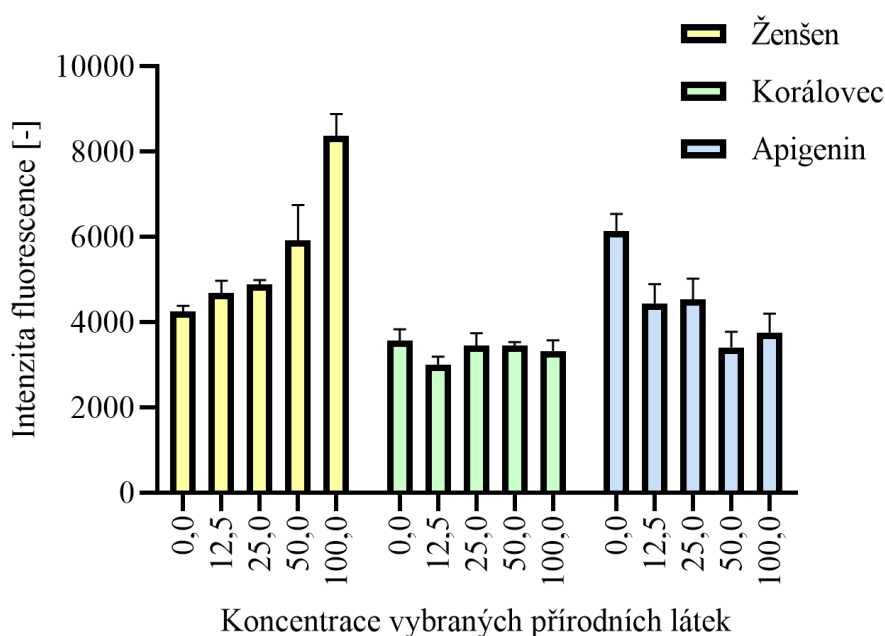
3.2.8 Zpracování dat

Veškerá získaná data byla následně zpracována v programu Prism, kde byla provedena i základní statistická analýza, jako je stanovení směrodatné odchylky a pro některá vyhodnocení i analýza rozptylu. Pro analýzu rozptylu byla stanovena hodnota p (hladina významnosti) na 0,05 a výsledky jsou považovány za významně odlišné, pokud je jejich výsledná hodnota p nižší než 0,05.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

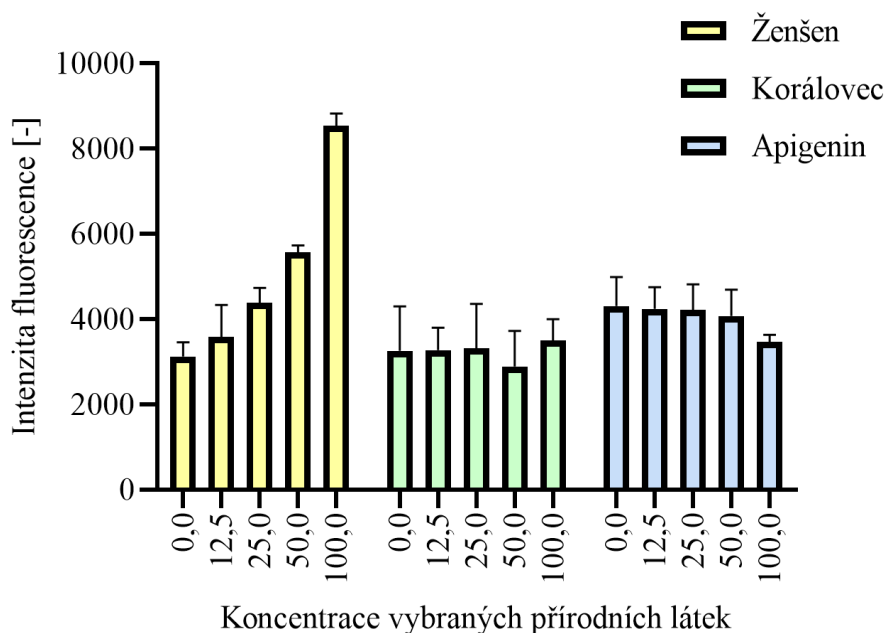
4.1 Fluorescenční Thioflavin T test

Byly testovány syntetické oligonukleotidy v přítomnosti ThT a vybraných přírodních látek. Zvolená koncentrační řada pro korálovce ježatého a ženšen byla 12,5; 25; 50 a 100 mg/ml. Pro apigenin byla zvolena koncentrační řada o stejných hodnotách, ale v jednotkách μM , kvůli ředění ze zakoupeného standardu. Tímto testem byla ověřována schopnost vybraných přírodních látek vázat se ke struktuře G-kvadruplexů a tím je případně stabilizovat. Výsledná data byla zaznamenána do grafů rozdělených podle jednotlivých oligonukleotidů.



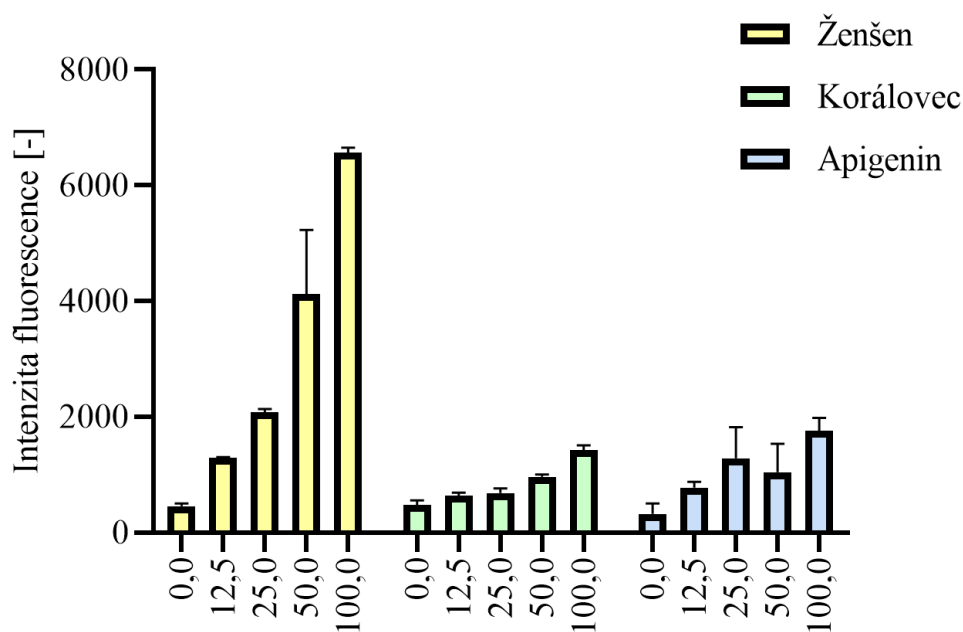
Obrázek 13: Graf intenzity fluorescence pro jednotlivé přírodní látky ve zvolené koncentrační řadě pro oligonukleotid mycPU21. Jednotka koncentrace není v grafu uvedena kvůli odlišné jednotce koncentrace apigeninu (μM) a ženšenu s korálovcem ježatým (mg/ml).

V tomto competičním testu s klesající intenzitou fluorescence dochází k vazbě přírodní látky na strukturu G-kvadruplexu v sekvenci oligonukleotidu a je tím tak vytlačováno ThT z vazby. Z výsledků v Obrázek 13 pozorujeme, že v případě ženšenu dochází s rostoucí koncentrací k navýšení intenzity fluorescence. V případě korálovce ježatého nedochází k významným změnám oproti negativní kontrole, tedy vzorku bez přítomnosti přírodních látek. To značí, že bioaktivní látky korálovce ježatého s G4 pravděpodobně neinteragují. Pro apigenin pozorujeme klesající trend, tedy že s rostoucí koncentrací apigeninu dochází k vytlačení ThT z vazby na G-kvadruplexu a snížení intenzity fluorescence.



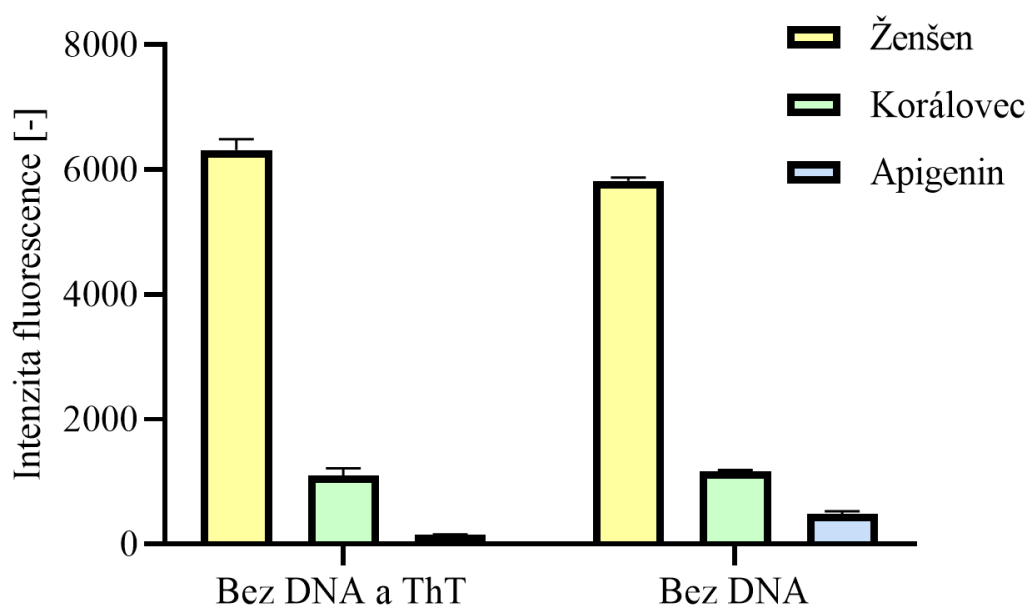
Obrázek 14: Graf intenzity fluorescence pro jednotlivé přírodní látky ve zvolené koncentrační řadě pro oligonukleotid hTel24. Jednotka koncentrace není v grafu uvedena kvůli odlišné jednotce koncentrace apigeninu (μM) a ženšenu s korálovcem ježatým (mg/ml).

Obdobné výsledky byly naměřeny pro oligonukleotid hTel24. Pro korálovce ježatého zde opět nebylo naměřeno žádné výrazné zvýšení nebo snížení intenzity fluorescence, u ženšenu opět s rostoucí koncentrací látky rostla intenzita naměřené fluorescence. U apigeninu zde nedocházelo k výraznému poklesu intenzity záření, až pro nejvyšší zvolenou koncentraci byl naměřen mírný pokles. Lze tedy říct, že v případě tohoto oligonukleotidu nedošlo k výrazné vazbě apigeninu na struktury G-kvadruplexů. To je pravděpodobně způsobeno tím, že oligonukleotid hTel24 má nižší G4 skóre než mycPU21, které vypovídá o schopnosti sekvence formovat G-kvadruplex. Dále může roli hrát samotná konformace G-kvadruplexu, kde mycPU21 tvoří paralelní G-kvadruplex, zatímco hTel24 hybridní. Je tedy možné, že apigenin se váže preferenčně na paralelní G-kvadruplex.



Obrázek 15: Graf intenzity fluorescence pro jednotlivé přírodní látky ve zvolené koncentrační řadě pro oligonukleotid Random22. Jednotka koncentrace není v grafu uvedena kvůli odlišné jednotce koncentrace apigeninu (μM) a žeňšenu s korálovcem ježatým (mg/ml).

Posledním testovaným oligonukleotidem byl Random 22, který se svým velmi nízkým G4 skóre pravděpodobně netvoří strukturu G-kvadruplexu. I přes to, že oligonukleotid neobsahuje kvartérní strukturu byla naměřena významná intenzita záření pro všechny testované přírodní látky. Z toho důvodu bylo provedeno měření k otestování, zda samotné látky bez přítomnosti oligonukleotidů a ThT nejsou fluorescenčně aktivní.

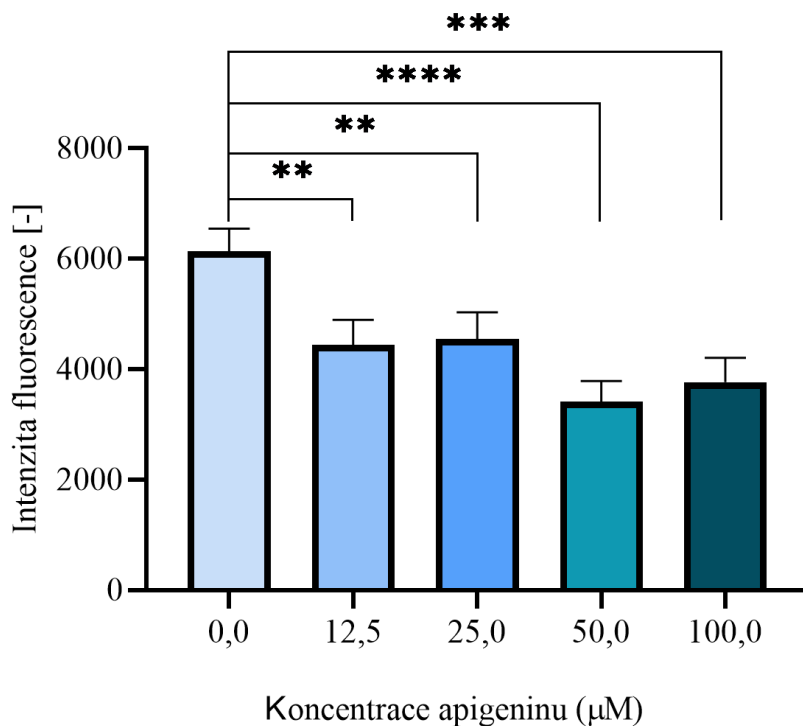


Obrázek 16: Graf intenzity fluorescence testovaných přírodních látek bez oligonukleotidů a bez oligonukleotidů a ThT.

Z Obrázek 16 vyplývá, že ženšen vykazuje sám od sebe vysokou intenzitu fluorescence při měřené vlnové délce 490 nm, která s rostoucí koncentrací přirozeně stoupá. Fluorescenční signál vykazuje i korálovec ježatý, ale výrazně méně než ženšen. Získané hodnoty intenzity záření se výrazně neliší v přítomnosti ThT a bez něj. Apigenin jako jediný nevykazuje fluorescenční záření bez přítomnosti oligonukleotidu a ThT, mírné záření bylo naměřeno pouze v přítomnosti ThT. Pravděpodobně dochází k vazbě ThT na apigenin a tím dochází k mírnému zvýšení měřeného signálu.

Získaná data z měření ženšenu pro všechny testované oligonukleotidy tak nelze vyhodnotit, protože intenzita fluorescence samotného ženšenu je velmi významná. To stejné platí i pro korálovec ježatý, jehož fluorescence je sice výrazně menší než u ženšenu, ale pravděpodobně nedochází k interakci s G4. Při této vlnové délce by ginsenosidy neměli emitovat fluorescenci. Ginsenosidy jsou fluorescenčně detekovatelné při excitaci při 270 nm a emisi při 310 nm [107]. Vzhledem k tomu, že v této práci byl použit extrakt získaný z doplňku stravy, jedná se tak o směs látek, kde některé z nich fluorescenční aktivitu vykazovat mohou. Ženšen obecně obsahuje mastné kyseliny, fytosteroly, uhlovodíky, polyacetyleny, polyfenoly a mnoho dalších složek. Extrakty z ženšenu jsou bohaté na nenasycené mastné kyseliny, které tvoří přibližně 80–90 % jeho celkových mastných kyselin [108]. Ženšen dále obsahuje širokou škálu fenolických sloučenin včetně maltolu, kyseliny salicylové, kyseliny vanilové, kyseliny p-kumarové, kyseliny ferulové, kyseliny p-hydroxybenzoové, kyseliny gentisové a kyseliny skořicové [109]. V ženšenu je také hojné zastoupení flavonoidů a polyfenolů, například kyselina chlorogenová a kvercetin [110, 111]. Ty mají emisní maximum kolem 450 nm, což by mohlo vysvětlovat vysokou fluorescenční aktivitu námi měřeného extraktu z ženšenu [113].

Pro apigenin s oligonukleotidem mycPU21 byla provedena analýza rozptylu, která posuzuje, zda jsou naměřené hodnoty signifikantně rozdílné v porovnání s intenzitou fluorescence vzorku bez přítomnosti apigeninu. Míra signifikantní rozdílnosti je znázorněna množstvím hvězdiček nad jednotlivými sloupci v Obrázek 17.



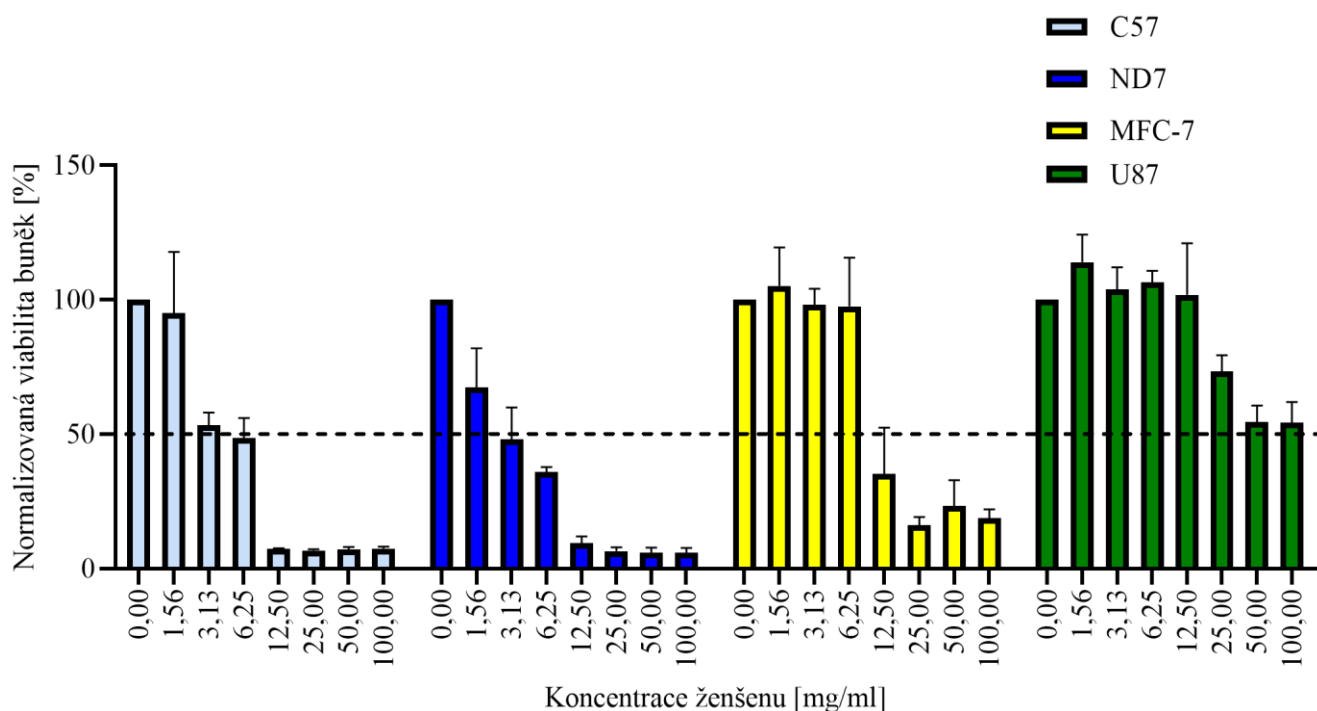
Obrázek 17: Graf analýzy rozptylu pro apigenin a oligonukleotid mycPU21.

Ze získaných dat je tedy zřejmé, že s rostoucí koncentrací apigeninu ve vzorku dochází k významné vazbě na G-kvadruplexy. Nejvyšší pokles intenzity fluorescence byl naměřen pro koncentraci 50 µM.

4.2 Stanovení buněčné viability v přítomnosti vybraných přírodních látek

Viabilita buněk ND7, U87, C57 a MCF-7 v přítomnosti vybraných přírodních látek byla stanovována pomocí MTT testů. Z hodnot naměřených pomocí readeru byly sestaveny grafy závislosti absorbance na koncentraci přírodních látek. Pro každou buněčnou linii byly provedeny dva testy viability, pro každou látku a koncentraci v tetraplikátech. Naměřená data byla následně normalizována a za hodnotu 100 % je považována hodnota bez přídavku přírodních látek.

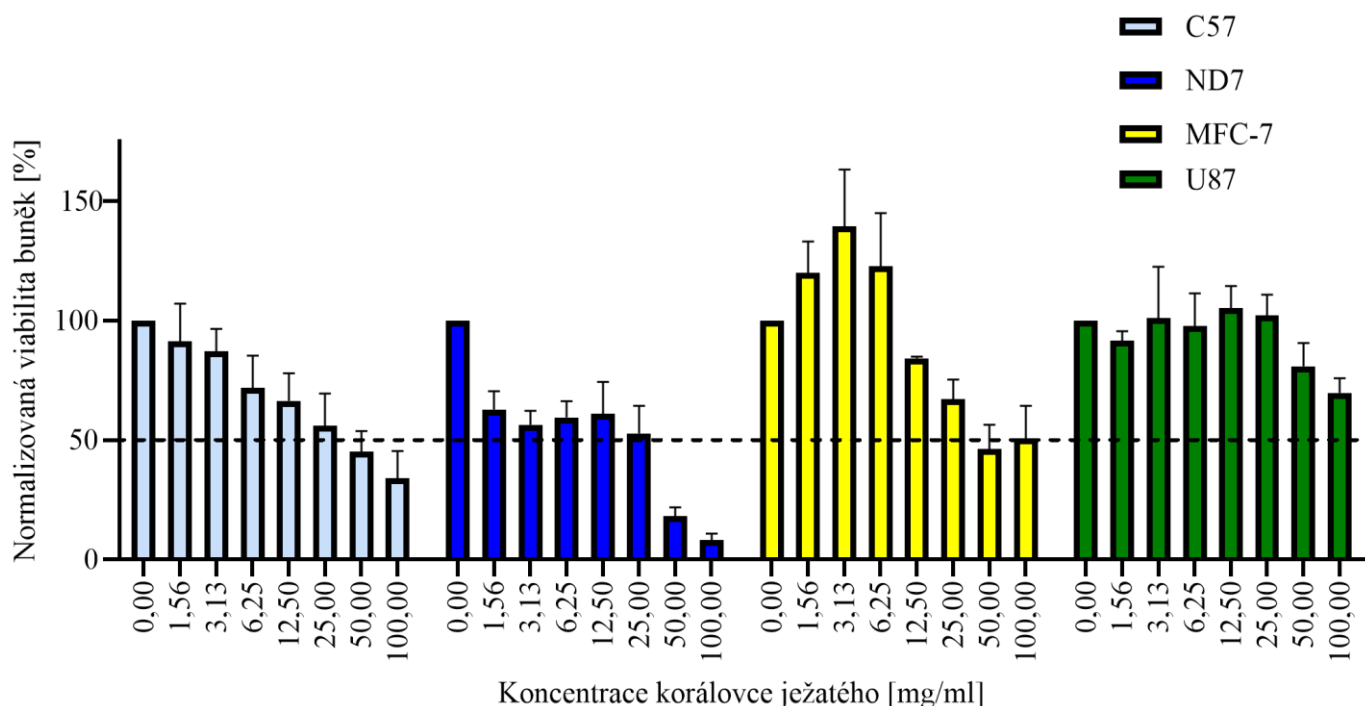
Obrázek 18, Obrázek 19 a Obrázek 20 zobrazují grafické porovnání viability jednotlivých buněk pro každou zvolenou přírodní látku zvlášť.



Obrázek 18: Grafické znázornění závislosti viability buněk na koncentraci ženšenu jednotlivých buněčných linií.

V případě ženšenu je patrný opakující se trend u buněk ND7, C57 a MCF-7, a to že při navýšení koncentrace ženšenu z 6,25 mg/ml na 12,5 mg/ml dochází k prudkému poklesu buněčné viability. V případě buněk U87 dochází k poklesu jen mírnému, a to až od koncentrace 25 mg/ml. Dále pozorujeme navýšení buněčné viability buněk MCF-7 a U87 v případě koncentrace 1,56 mg/ml. U buněk U87 dochází k mírnému navýšení viability i v následujících koncentracích 3,13 a 6,25 mg/ml. K dalšímu měření, tedy RT-PCR, byly vybrány pouze buňky ND7 a U87 s koncentrací ženšenu 0,5 mg/ml, což je ekvivalentem 1/520 původní kapsle. Tyto linie byly vybrány proto, že se jedná o neurony. Buňky MCF-7 sloužili jako porovnání s jiným typem buněk. Buňky C57 byly použity také pro porovnání, ale proto, že se v přirozeném stavu vyskytují společně s neurony.

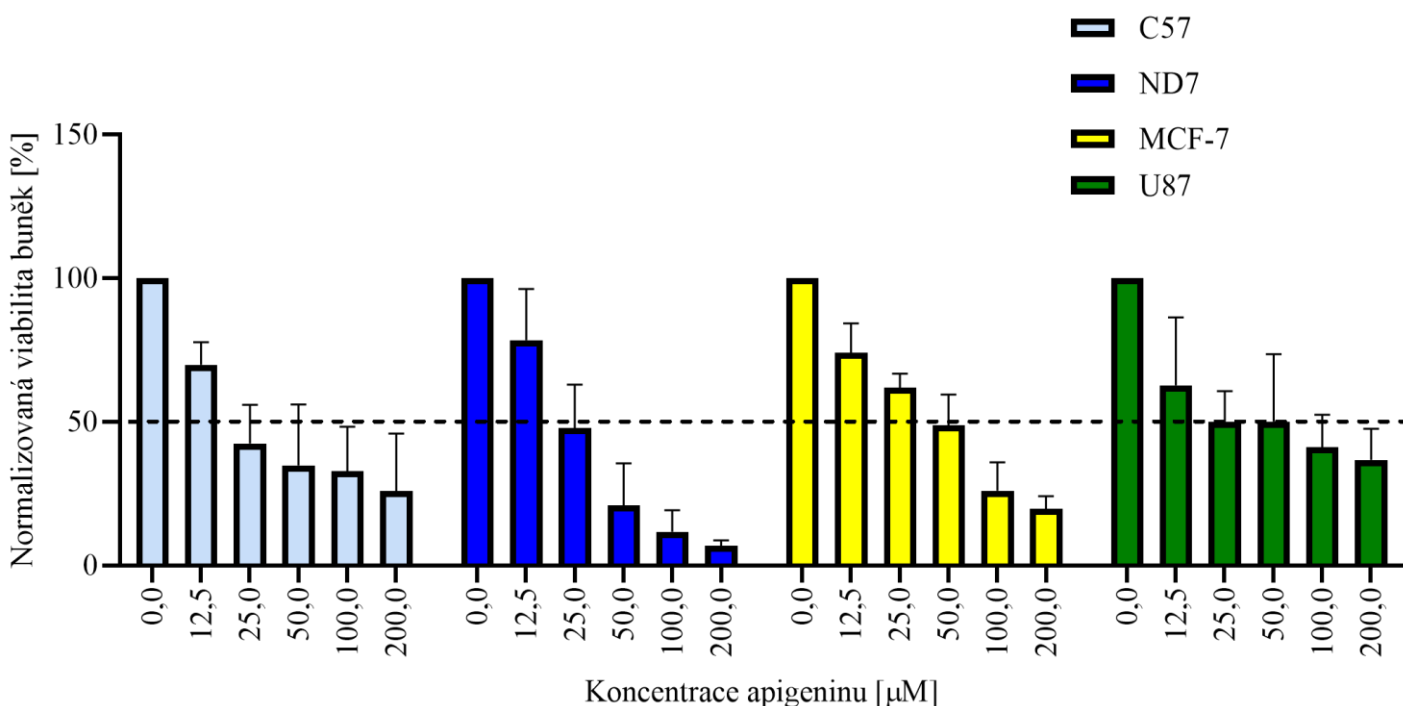
Hodnotou 50 % prochází linka, která znázorňuje hodnotu LD50, tedy úroveň snížení viability jednotlivých buněčných linií pod 50 %. Nejcitlivější na přítomnost ženšenu byly buňky ND7, které se dostali pod úroveň LD50 při koncentraci 3,13 mg/ml. Nejvíce odolné pak byly buňky U87, které hodnoty LD50 při námi zvolených koncentracích ženšenu nedosáhly.



Obrázek 19: Grafické znázornění závislosti viability buněk jednotlivých buněčných linií na koncentraci korálovce ježatého.

V případě korálovce ježatého dochází u buněk C57 a ND7 k postupnému poklesu buněčné viability. V koncentracích 1,56; 3,13 a 6,25 mg/ml měl korálovec ježatý pozitivní vliv na buněčnou linii MCF-7. Docházelo zde k výraznému navýšení viability buněk, od vyšší koncentrace docházelo k očekávanému poklesu. V případě buněk U87 docházelo s rostoucí koncentrací korálovce ježatého k mírným poklesům i nárůstům buněčné viability, nedošlo ale k výraznému snížení. Pro další měření byly vybrány buňky ND7 a U87 ze stejných důvodů jako v případě ženšenu a koncentrace korálovce ježatého 1 mg/ml, což je ekvivalentem 1/400 původní kapsle.

Jako v předchozím grafu je i zde vyznačena linka procházející hodnotou 50 %, tedy vyznačující hodnotu LD50. Zde došlo k překročení této úrovně až při koncentraci 50 mg/ml a to u buněk C57, ND7 a MCF-7. U buněk U87 opět nedošlo ve zvolené koncentrační řadě k dosažení úrovně LD50.



Obrázek 20: Grafické znázornění závislosti viability buněk jednotlivých buněčných linií na koncentraci apigeninu.

U apigeninu byl pozorován klesající trend pro všechny testované buněčné linie. S rostoucí koncentrací přidané přírodní látky docházelo k výraznému a lineárnímu poklesu buněčné viability. Hodnoty LD50 nejrychleji dosáhly buňky C57, ND7 a U87, u kterých bylo měřeno snížení viability o 50 % již při koncentraci 25 µM. Nejvyšší odolnost vůči apigeninu prokázaly buňky MCF-7, které dosáhly hodnoty LD50 až při koncentraci 50 µM.

Z porovnání měření všech testovaných přírodních látek vyplývá, že nejhůře se dařilo buňkám ND7 při kultivaci s ženšenem. Obecně si špatnou snášenlivost buněk ND7 vysvětlujeme tím, že v přirozeném stavu jim slouží Schwannovy buňky jako metabolická podpora a filtr živin [104]. Proto pravděpodobně jako samotné hůř snáší přítomnost přírodních látek. Nejlépe na tom byly buňky U87, které v případě ženšenu a korálovce ježatého LD50 nedosáhly. Nejvyšší nárůst viability byl naměřen u buněk MCF-7 při kultivaci s korálovcem ježatým.

4.3 Izolace RNA

Po izolaci RNA z buněk ND7 a U87 kultivovaných s ženšenem a korálovcem ježatým, byla měřena čistota a koncentrace jednotlivých vzorků na přístroji Nano Drop. Výsledné hodnoty zachycuje Tabulka 9 a Tabulka 10.

Tabulka 9: Naměřené hodnoty z přístroje Nano Drop pro buňky U87.

3. den			
Vzorek	Koncentrace (ng/μl)	A260/280	A260/230
Kontrola 1 bez Aβ	173,7	2,0	1,6
Korálovec 1	198,7	2,0	1,8
Korálovec 2	216,9	2,0	1,9
Kontrola 2 bez Aβ	218,9	1,9	1,8
Ženšen 1	245,4	2,0	1,9
Ženšen 2	153,8	2,1	1,7
6. den			
Vzorek	Koncentrace (ng/μl)	A260/A280	A260/230
Kontrola 1 s Aβ	177,1	2,0	1,9
Kontrola 2 s Aβ	280,2	2,0	2,0
Ženšen 1	269,6	2,0	2,0
Ženšen 2	192,5	2,0	1,9
Korálovec 1	75,3	2,0	1,6
Korálovec 2	141,1	1,9	1,7

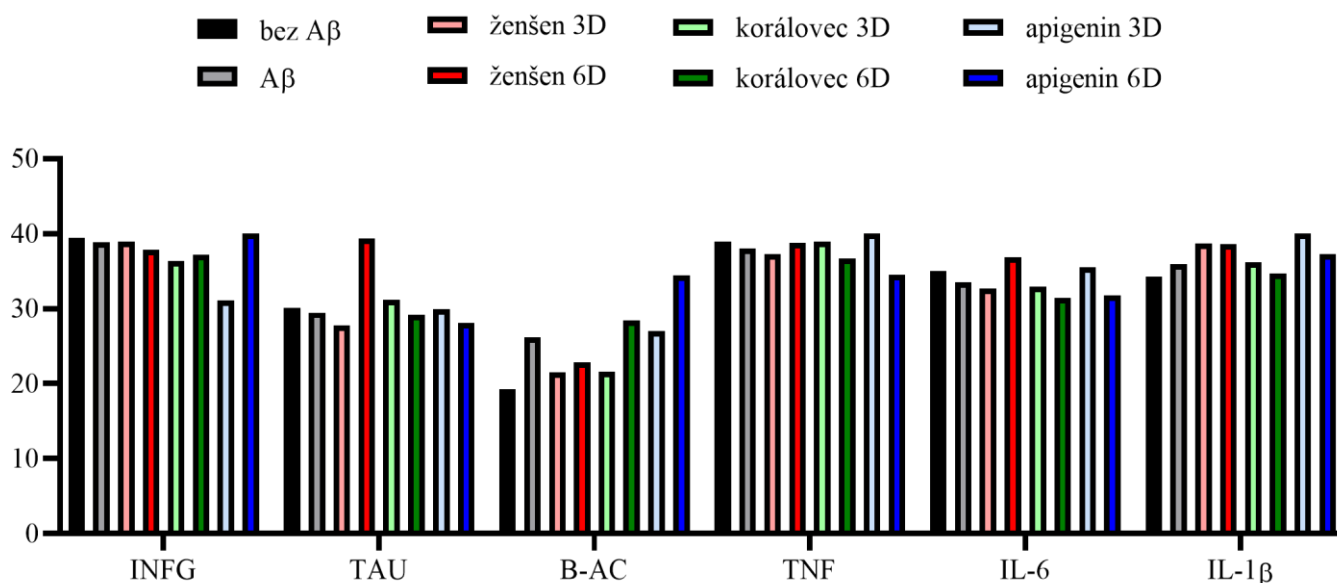
Tabulka 10: Naměřené hodnoty z přístroje Nano Drop pro buňky ND7.

3. den			
Vzorek	Koncentrace (ng/μl)	A260/280	A260/230
Kontrola s Aβ	26,7	2,0	1,7
Ženšen 1	44,9	2,0	1,9
Ženšen 2	154,1	2,0	1,8
Korálovec 1	56,3	2,0	1,8
Korálovec 2	104,1	2,1	1,9
6. den			
Vzorek	Koncentrace (ng/μl)	A260/A280	A260/230
Kontrola 1 bez Aβ	137,9	2,1	1,9
Kontrola 2 bez Aβ	151,5	2,0	2,0
Ženšen 1	141,9	1,9	1,9
Ženšen 2	21,0	2,0	2,0
Korálovec 1	97,9	2,1	1,9
Korálovec 2	31,7	2,0	1,8

Všechny hodnoty naměřené u testovaných buněk pro poměr absorbancí A260/A280 se pohybují okolo hodnoty 2,0. Při 260 nm absorbuje DNA a při 280 nm absorbují proteiny. Tento poměr se využívá k identifikaci izolované nukleové kyseliny, pro DNA je to 1,8 a pro RNA 2,0. V tomto případě se tedy jedná ve všech vzorcích o RNA.

4.4 RT-PCR

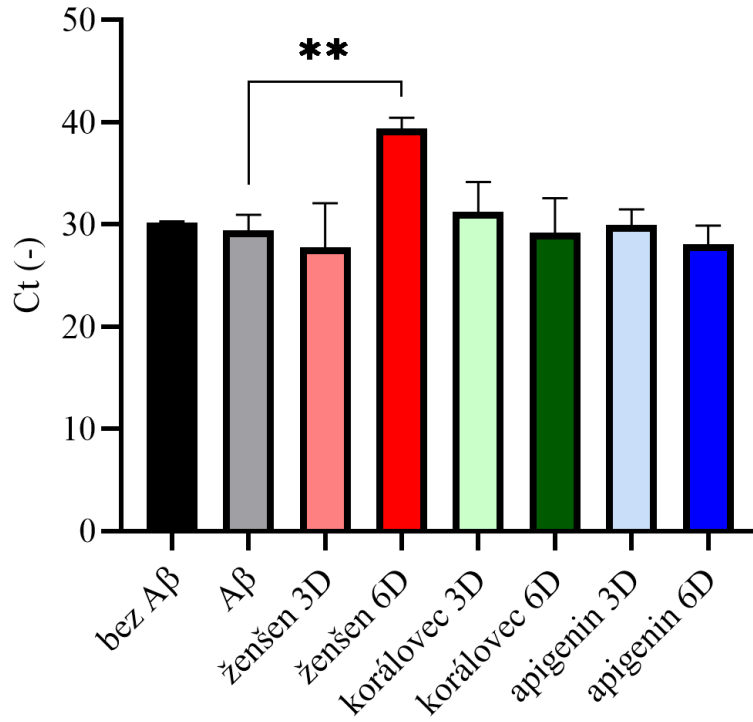
Vzorky RNA získané izolací z připravených buněk byly nejprve procesem reverzní transkripce převedeny na cDNA a následně byla provedena metoda PCR. Každý vzorek byl připraven ve dvou opakováních ze dvou různých kultivací buněk. Po skončení měření byly porovnávány hodnoty Ct vzorků patřičně mezi sebou. Zásadní bylo porovnání naměřených hodnot Ct jednotlivých primerů mezi vzorky kontroly v přítomnosti A β , ale bez přírodních látek, a vzorky kultivovanými v přítomnosti A β i přírodních látek 6 dní.



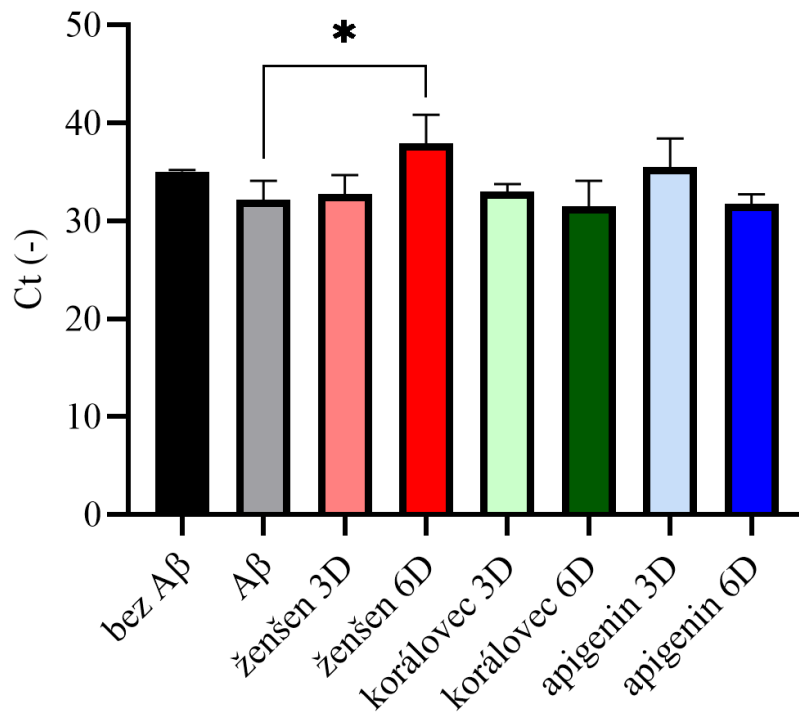
Obrázek 21: Graf porovnání naměřených Ct hodnot vzorků buněk ND7 pro jednotlivé primery. Třetí den kultivace je označen jako 3D, šestý den kultivace je označen jako 6D.

Z grafu je patrné, že u primeru INF γ dochází k nárůstu hodnoty Ct v případě šestého dne kultivace buněk s apigeninem a u primeru TAU a IL-6 šestý den kultivace s ženšenem. Pro primer TAU a IL-6, jako důležité markery Alzheimerova onemocnění, byla provedena analýza rozptylu k určení, zda jsou naměřené hodnoty signifikantně rozdílné v porovnání s buňkami ošetřenými A β a bez přítomnosti přírodních látek. Analýza rozptylu zohledňuje i případné odchylky měření a na základě toho posuzuje, zda zde dochází k rozdílu alespoň o 5 % oproti kontrolní hodnotě, tedy buňky kultivované s A β bez přítomnosti přírodních látek.

Z grafů analýzy rozptylu vyplývá, že signifikantně významný výsledek je v případě obou primerů právě v šestém dni kultivace buněk ND7 s ženšenem. Tato analýza tak potvrzuje, že u buněk kultivovaných pouze šest dní s ženšenem o koncentraci 0,5 mg/ml dochází k významnému zvýšení Ct hodnoty, která vypovídá o snížení exprese proteinů Tau a IL-6.

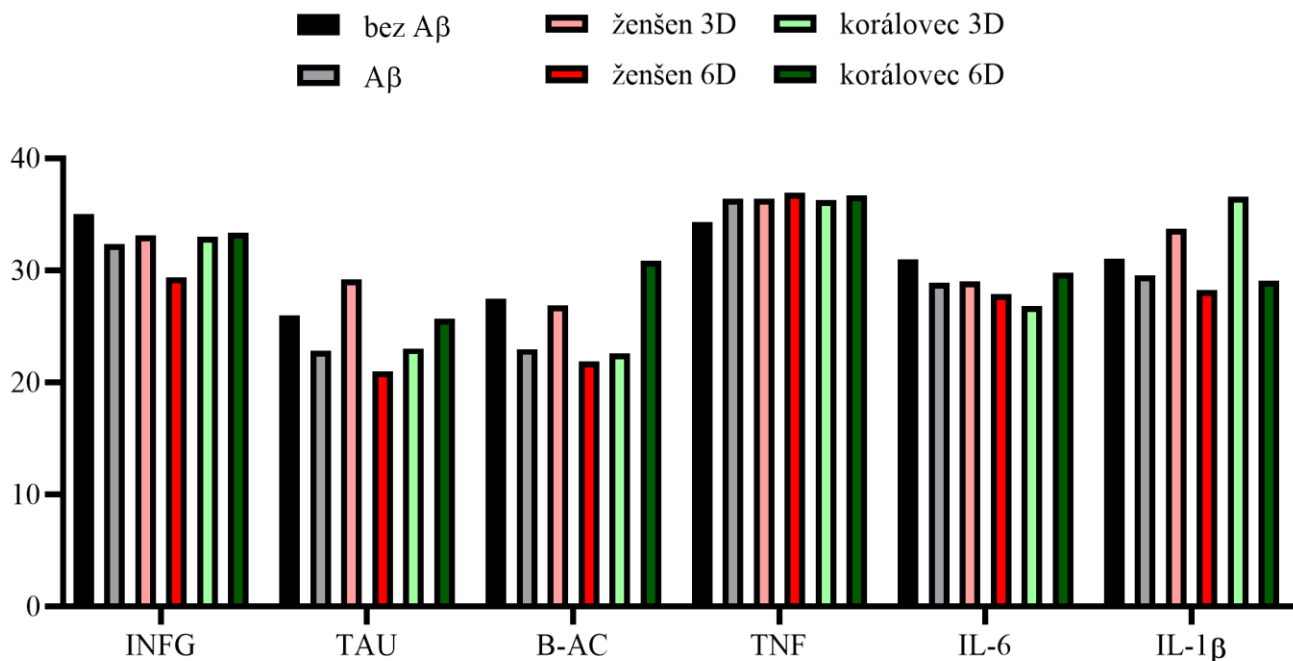


Obrázek 22: Graf analýzy rozptylu pro prumer TAU a buňky ND7. Symbolem * je vyznačena míra signifikantnosti měření. Ostatní výsledky označeny nejsou, protože jsou nesignifikantní.



Obrázek 23: Graf analýzy rozptylu pro prumer IL-6 a buňky ND7. Symbolem * je vyznačena míra signifikantnosti měření. Ostatní výsledky označeny nejsou, protože jsou nesignifikantní.

V případě kultivace buněk U87 byl z měření RT-PCR vyřazen apigenin, vzhledem k nevýznamnosti výsledků v případě předešlého měření.

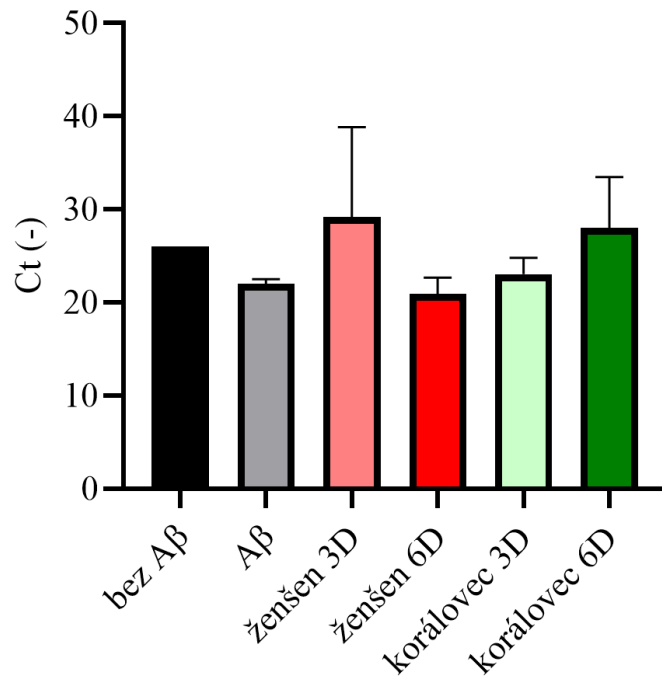


Obrázek 24: Graf porovnání naměřených Ct hodnot vzorků buněk U87 pro jednotlivé primery. Třetí den kultivace je označen jako 3D, šestý den kultivace je označen jako 6D.

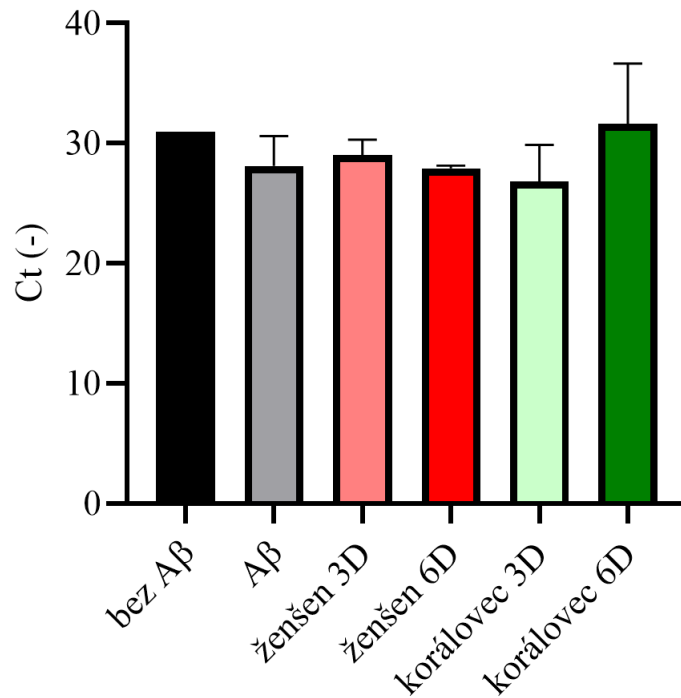
Z grafu výsledků pro buňky U87 vyplývá, že v porovnání se vzorky buněk s Aβ dochází k nárůstu Ct hodnot u korálovce ježatého při šestém dni kultivace u primerů TAU a IL-6, dále pro třetí den kultivace korálovce ježatého u primeru IL-1β. Pro vzorky s primery pro protein Tau a IL-6 byla provedena analýza rozptylu, podobně jako pro buňky ND7.

Analýza rozptylu neprokázala žádný signifikantně významný výsledek ani u jednoho z primerů. V grafech zobrazených na Obrázek 25 a Obrázek 26 ale pozorujeme, že pro primer TAU došlo k výraznému nárůstu Ct hodnot pro vzorek ženšenu ve třetí den kultivace a pro korálovce ježatého šestý den kultivace. Vzhledem k velikosti odchylky tyto výsledky nebyly analýzou rozpoznány jako signifikantně významné, z naměřených hodnot ale vyplývá viditelný pokles exprese proteinu Tau. Další viditelný výsledek je v případě primeru IL-6 u vzorku korálovce ježatého kultivovaného s buňkami šest dní. I zde je patrný nárůst Ct hodnoty, a tedy i zde lze předpokládat, že došlo ke snížení exprese proteinu IL-6.

Také v případě ženšenu ve třetí den kultivace pro primery TAU a IL-1β pozorujeme významný nárůst Ct hodnoty. V šestý den kultivace ale došlo opět k výraznému poklesu. To bylo pravděpodobně způsobeno změnou prostředí buněk a následnou adaptací na okolní prostředí. Stejný případ lze pozorovat i u korálovce ježatého ve třetí den kultivace pro primer IL-1β.



Obrázek 25: Graf analýzy rozptylu pro primer TAU a buňky U87.



Obrázek 26: Graf analýzy rozptylu pro primer IL-6 a buňky U87.

5. ZÁVĚR

V této práci byl testován vliv vybraných přírodních látek extrahovaných z běžně dostupných doplňků stravy na viabilitu neuronů, Schwannových buněk a buněk karcinomu prsu a jejich vliv na expresi proteinů, které jsou považovány za markery Alzheimerovy choroby. Interakce vybraných buněčných linií a přírodních látek byla testována metodami *in vitro*. Buněčné linie vybrané pro tuto práci byly buňky glioblastomu U87-MG, hybridní buněčná linie ND7/23, buněčná linie Schwannových buněk C57 BL6 a buněčná linie karcinomu prsu MCF-7.

Teoretická část práce popisuje současnou známou charakteristiku Alzheimerovy choroby, její souvislost s A β a nejčastější projevy. Dále se věnuje popisu vybraných přírodních látek, tedy ženšenu, korálovce ježatého a apigeninu, jejich aktivním látkám, struktuře a vlastnostem, které by mohly mít vliv na projevy nebo prevenci Alzheimerovy choroby. V neposlední řadě se věnuje podrobnějšímu popisu použitých metod k ověření vlivu vybraných látek na viabilitu vybraných buněčných linií a vlivu na expresi zvolených proteinových markerů Alzheimerovy choroby. Zvolené markery Alzheimerovy choroby byly testovány pomocí připravených primerů, konkrétně pro geny proteinu Tau, interleukinu-1-beta, interleukinu-6, TNF, aktinu-beta a INF γ .

V experimentální části byl nejprve stanovován vliv ženšenu, korálovce ježatého a apigeninu ve zvolené koncentrační řadě na viabilitu buněčných linií pomocí MTT testu. Z naměřených a normalizovaných dat byla stanovena hodnota LD50. Obecně nejodolnějšími buňkami byly buňky U87-MG, které dosáhly hodnoty LD50 pouze v přítomnosti 25 μ M apigeninu. Z testovaných buněčných linií byly ND7/23 nejcitlivější, protože u nich došlo k poklesu viability pod 50 % jako u prvních při dané koncentraci přírodních látek. Ženšen obecně snižoval viabilitu testovaných buněčných linií nejvíce. K dalšímu měření byla zvolena koncentrace ženšenu 0,5 mg/ml, tedy 1/520 zakoupené kapsle. Pro korálovce ježatého byla zvolena koncentrace 1 mg/ml, tedy 1/400 zakoupené kapsle a pro apigenin byla zvolena koncentrace 12,5 μ M.

Následně byla ověřena schopnost vybraných látek interagovat s G-kvadruplexy pomocí fluorescenčního ThT testu a vybraných syntetických oligonukleotidů hTel24, mycPU21 a Random22. Z naměřených dat ale vyplynulo, že roztoky ženšenu a korálovce ježatého vykazují při použité exitační vlnové délce fluorescenční aktivitu samy o sobě. Měření tak nebylo možné pro tyto látky vyhodnotit. Pro oligonukleotid mycPU21 byla provedena analýza rozptylu, která potvrdila, že s rostoucí koncentrací apigeninu, roste vazba ke G-kvadruplexu. To otevírá nové možnosti pro využití apigeninu zacíleného na kvartérní struktury v mozku zasaženém Alzheimerovou chorobou.

Pro ověření vlivu vybraných přírodních látek na expresi proteinových markerů Alzheimerovy choroby bylo využito metody RT-qPCR pro buněčné linie ND7/23 a U87-MG. Buňky byly kultivovány tři a šest dní v přítomnosti vybraných přírodních látek o zvolených koncentracích a v přítomnosti A β . Ze všech odebraných vzorků byla izolována RNA a následně využita pro RT-qPCR. Díky izolaci RNA byla získána informace o úrovni exprese daného genu. Získaná data byla porovnávána se vzorkem buněk kultivovaných pouze s A β bez přírodních látek. Z naměřených hodnot byla provedena analýza rozptylu, která potvrdila, že signifikantně významný výsledek poklesu hladin exprese testovaných proteinových markerů byl pro

buněčnou linii ND7/23 v šestý den kultivace s ženšenem pro primer TAU a IL-6. U buněčné linie U87-MG nebyl naměřen žádný signifikantně významný výsledek, pouze v případě korálovce ježatého v šestý den kultivace pro primer TAU pozorujeme mírné zvýšení Ct hodnoty, tedy snížení exprese proteinu Tau.

Výsledky této práce ukazují, že ženšen má potenciálně příznivý vliv na snížení exprese proteinových markerů spojených s Alzheimerovou chorobou. Již během šesti dnů a při velmi nízké koncentraci (odpovídající 1/420 kapsle) došlo k měřitelnému poklesu těchto markerů, což naznačuje rychlý nástup účinku. Tyto výsledky podporují myšlenku, že ženšen může představovat slibný doplněk stravy pro prevenci neurodegenerativních onemocnění, zejména Alzheimerovy choroby.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SUTHERLAND, Greg T., Belal CHAMI, Priscilla YOUSSEF a Paul K. WITTING. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? *Redox Report: Communications in Free Radical Research* [online]. 2013, **18**(4), 134–141. ISSN 1743-2928. Dostupné z: doi:10.1179/1351000213Y.0000000052
- [2] ZELIGER, Harold I. *Oxidative stress: its impact on human health and disease onset*. London, United Kingdom: Academic Press, 2023. ISBN 978-0-323-91890-9.
- [3] SINGH, Anju, Ritushree KUKRETI, Luciano SASO a Shrikant KUKRETI. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* [online]. 2019, **24**(8), 1583. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24081583
- [4] MALÍK, Matěj a Pavel TLUSTOŠ. Nootropic Herbs, Shrubs, and Trees as Potential Cognitive Enhancers. *Plants* [online]. 2023, **12**(6), 1364. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants12061364
- [5] GIURGEA, C. [Pharmacology of integrative activity of the brain. Attempt at nootropic concept in psychopharmacology]. *Actualites Pharmacologiques*. 1972, **25**, 115–156. ISSN 0567-8854.
- [6] SHAN, Mengyao, Yunfan BAI, Xiaoxue FANG, Xintian LAN, Yegang ZHANG, Yiming CAO, Difü ZHU a Haoming LUO. American Ginseng for the Treatment of Alzheimer's Disease: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2023, **28**(15), 5716. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28155716
- [7] MANCUSO, Cesare a Rosaria SANTANGELO. Panax ginseng and Panax quinquefolius: From pharmacology to toxicology. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2017, **107**, 362–372. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2017.07.019
- [8] LEE, Jayeul, Euiju LEE, Donghyun KIM, Junhee LEE, Junghee YOO a Byunghee KOH. Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2009, **122**(1), 143–148. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2008.12.012

- [9] Lion's Mane. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [online]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012 [vid. 2024-08-23]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK599740/>
- [10] LI, I-Chen, Han-Hsin CHANG, Chuan-Han LIN, Wan-Ping CHEN, Tsung-Han LU, Li-Ya LEE, Yu-Wen CHEN, Yen-Po CHEN, Chin-Chu CHEN a David Pei-Cheng LIN. Prevention of Early Alzheimer's Disease by Erinacine A-Enriched *Hericium erinaceus* Mycelia Pilot Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Frontiers in Aging Neuroscience* [online]. 2020, **12**, 155. ISSN 1663-4365. Dostupné z: [doi:10.3389/fnagi.2020.00155](https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00155)
- [11] MAJMA SANAYE, Pantea, Mohammad Reza MOJAVERI, Roohollah AHMADIAN, Mehdi SABET JAHROMI a Roodabeh BAHRAMSOLTANI. Apigenin and its dermatological applications: A comprehensive review. *Phytochemistry* [online]. 2022, **203**, 113390. ISSN 1873-3700. Dostupné z: [doi:10.1016/j.phytochem.2022.113390](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113390)
- [12] SALEHI, Bahare, Alessandro VENDITTI, Mehdi SHARIFI-RAD, Dorota KRĘGIEL, Javad SHARIFI-RAD, Alessandra DURAZZO, Massimo LUCARINI, Antonello SANTINI, Eliana SOUTO, Ettore NOVELLINO, Hubert ANTOLAK, Elena AZZINI, William SETZER a Natália MARTINS. The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(6), 1305. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms20061305](https://doi.org/10.3390/ijms20061305)
- [13] TANG, Ding, Keli CHEN, Luqi HUANG a Juan LI. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. 2017, **13**(3), 323–330. ISSN 1744-7607. Dostupné z: [doi:10.1080/17425255.2017.1251903](https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1251903)
- [14] BREIJYEH, Zeinab a Rafik KARAMAN. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2020, **25**(24), 5789. ISSN 1420-3049. Dostupné z: [doi:10.3390/molecules25245789](https://doi.org/10.3390/molecules25245789)
- [15] PRITAM, Pingal, Rahul DEKA, Anuradha BHARDWAJ, Rashi SRIVASTAVA, Dhruv KUMAR, Abhimanyu Kumar JHA, Niraj Kumar JHA, Chiara VILLA a Saurabh Kumar JHA. Antioxidants in Alzheimer's Disease: Current Therapeutic Significance and Future Prospects. *Biology* [online]. 2022, **11**(2), 212. ISSN 2079-7737. Dostupné z: [doi:10.3390/biology11020212](https://doi.org/10.3390/biology11020212)
- [16] LIU, Pei-Pei, Yi XIE, Xiao-Yan MENG a Jian-Sheng KANG. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2019, **4**(1), 29. ISSN 2059-3635. Dostupné z: [doi:10.1038/s41392-019-0063-8](https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8)
- [17] LONG, Justin M. a David M. HOLTZMAN. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* [online]. 2019, **179**(2), 312–339. ISSN 1097-4172. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cell.2019.09.001](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001)
- [18] GONZÁLEZ, Andrea, Sandeep Kumar SINGH, Macarena CHURRUCA a Ricardo B. MACCIONI. Alzheimer's Disease and Tau Self-Assembly: In the Search of the Missing

- Link. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(8), 4192. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23084192
- [19] HAMPEL, Harald, John HARDY, Kaj BLENNOW, Christopher CHEN, George PERRY, Seung Hyun KIM, Victor L. VILLEMAGNE, Paul AISEN, Michele VENDRUSCOLO, Takeshi IWATSUBO, Colin L. MASTERS, Min CHO, Lars LANNFELT, Jeffrey L. CUMMINGS a Andrea VERGALLO. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry* [online]. 2021, **26**(10), 5481–5503. ISSN 1359-4184, 1476-5578. Dostupné z: doi:10.1038/s41380-021-01249-0
- [20] COLLIN, Fabrice, Clémence CHEIGNON a Christelle HUREAU. Oxidative Stress as a Biomarker for Alzheimer's Disease. *Biomarkers in Medicine* [online]. 2018, **12**(3), 201–203. ISSN 1752-0363, 1752-0371. Dostupné z: doi:10.2217/bmm-2017-0456
- [21] MULLER, U. C. a H. ZHENG. Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2012, **2**(2), a006288–a006288. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006288
- [22] BAUMKOTTER, F., N. SCHMIDT, C. VARGAS, S. SCHILLING, R. WEBER, K. WAGNER, S. FIEDLER, W. KLUG, J. RADZIMANOWSKI, S. NICKOLAUS, S. KELLER, S. EGGERT, K. WILD a S. KINS. Amyloid Precursor Protein Dimerization and Synaptogenic Function Depend on Copper Binding to the Growth Factor-Like Domain. *Journal of Neuroscience* [online]. 2014, **34**(33), 11159–11172. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.0180-14.2014
- [23] TZIORAS, Makis, Robert I. MCGEACHAN, Claire S. DURRANT a Tara L. SPIRES-JONES. Synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* [online]. 2023, **19**(1), 19–38. ISSN 1759-4758, 1759-4766. Dostupné z: doi:10.1038/s41582-022-00749-z
- [24] MAWUENYEGA, Kwasi G., Wendy SIGURDSON, Vitaliy OVOD, Ling MUNSELL, Tom KASTEN, John C. MORRIS, Kevin E. YARASHESKI a Randall J. BATEMAN. Decreased Clearance of CNS β -Amyloid in Alzheimer's Disease. *Science* [online]. 2010, **330**(6012), 1774–1774. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1197623
- [25] ZHAO, Zhongwei. Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease. *Aging Medicine (Milton (N.S.W))* [online]. 2019, **2**(2), 82–87. ISSN 2475-0360. Dostupné z: doi:10.1002/agm2.12074
- [26] VIVEKANANDAN, Subramanian, Jeffrey R. BRENDER, Shirley Y. LEE a Ayyalusamy RAMAMOORTHY. A partially folded structure of amyloid-beta(1–40) in an aqueous environment. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2011, **411**(2), 312–316. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.133
- [27] SU, Fan, Feng BAI a Zhijun ZHANG. Inflammatory Cytokines and Alzheimer's Disease: A Review from the Perspective of Genetic Polymorphisms. *Neuroscience Bulletin* [online]. 2016, **32**(5), 469–480. ISSN 1673-7067, 1995-8218. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-016-0055-4

- [28] MRAK, Robert E. a W. Sue T. GRIFFIN. Interleukin-1 and the Immunogenetics of Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* [online]. 2000, **59**(6), 471–476. ISSN 0022-3069, 1554-6578. Dostupné z: doi:10.1093/jnen/59.6.471
- [29] THAKUR, Sujata, Rishika DHAPOLA, Phulen SARMA, Bikash MEDHI a Dibbanti HariKrishna REDDY. Neuroinflammation in Alzheimer’s Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics. *Inflammation* [online]. 2023, **46**(1), 1–17. ISSN 0360-3997, 1573-2576. Dostupné z: doi:10.1007/s10753-022-01721-1
- [30] SAITO, Takashi a Takaomi C. SAIDO. Neuroinflammation in mouse models of Alzheimer’s disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* [online]. 2018, **9**(4), 211–218. ISSN 1759-1961, 1759-1961. Dostupné z: doi:10.1111/cen3.12475
- [31] DIONISIO-SANTOS, Dawling A., John A. OLSCHOWKA a M. Kerry O’BANION. Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer’s disease. *Journal of Neuroinflammation* [online]. 2019, **16**(1), 74. ISSN 1742-2094. Dostupné z: doi:10.1186/s12974-019-1453-0
- [32] JÜRGENS, Birgit, Ursula HAINZ, Dietmar FUCHS, Thomas FELZMANN a Andreas HEITGER. Interferon- γ -triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. *Blood* [online]. 2009, **114**(15), 3235–3243. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-12-195073
- [33] GIRI, Ranjit K., Suresh K. SELVARAJ a Vijay K. KALRA. Amyloid Peptide-Induced Cytokine and Chemokine Expression in THP-1 Monocytes Is Blocked by Small Inhibitory RNA Duplexes for Early Growth Response-1 Messenger RNA. *The Journal of Immunology* [online]. 2003, **170**(10), 5281–5294. ISSN 0022-1767, 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.170.10.5281
- [34] ANDERSON, G. a Jo OJALA. Alzheimer’s and seizures: interleukin-18, indoleamine 2,3-dioxygenase and quinolinic Acid. *International journal of tryptophan research: IJTR* [online]. 2010, **3**, 169–173. ISSN 1178-6469. Dostupné z: doi:10.4137/IJTR.S4603
- [35] XIAO, Qingli, Ping YAN, Xiucui MA, Haiyan LIU, Ronaldo PEREZ, Alec ZHU, Ernesto GONZALES, Danielle L. TRIPOLI, Leah CZERNIEWSKI, Andrea BALLABIO, John R. CIRRITO, Abhinav DIWAN a Jin-Moo LEE. Neuronal-Targeted TFEB Accelerates Lysosomal Degradation of APP, Reducing A β Generation and Amyloid Plaque Pathogenesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* [online]. 2015, **35**(35), 12137–12151. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.0705-15.2015
- [36] LUO, Rongcan, Ling-Yan SU, Guiyu LI, Jing YANG, Qianjin LIU, Lu-Xiu YANG, Deng-Feng ZHANG, Hejiang ZHOU, Min XU, Yu FAN, Jiali LI a Yong-Gang YAO. Activation of PPARA-mediated autophagy reduces Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model. *Autophagy* [online]. 2020, **16**(1), 52–69. ISSN 1554-8635. Dostupné z: doi:10.1080/15548627.2019.1596488

- [37] DOLCE, Vincenza, Giuseppe FIERMONTE, Michael J. RUNSWICK, Ferdinando PALMIERI a John E. WALKER. The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(5), 2284–2288. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.031430998
- [38] CHEIGNON, C., M. TOMAS, D. BONNEFONT-ROUSSELOT, P. FALLER, C. HUREAU a F. COLLIN. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* [online]. 2018, **14**, 450–464. ISSN 2213-2317. Dostupné z: doi:10.1016/j.redox.2017.10.014
- [39] PETTY, Margaret A a Eng H LO. Junctional complexes of the blood–brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Progress in Neurobiology* [online]. 2002, **68**(5), 311–323. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-0082(02)00128-4
- [40] CARDOSO, Filipa Lourenço, Dora BRITES a Maria Alexandra BRITO. Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Reviews* [online]. 2010, **64**(2), 328–363. ISSN 01650173. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresrev.2010.05.003
- [41] SOLÁR, Peter, Václav BRÁZDA, Martin BAREŠ, Alemeh ZAMANI, Parisa EMAMIAREF, Andrea JOUKAL, Lucie KUBÍČKOVÁ, Erik KROČKA, Klaudia HAŠANOVÁ a Marek JOUKAL. Inflammatory changes in the choroid plexus following subarachnoid hemorrhage: the role of innate immune receptors and inflammatory molecules. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. 2024, **18**, 1525415. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2024.1525415
- [42] ZLOKOVIC, Berislav V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* [online]. 2008, **57**(2), 178–201. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003
- [43] VAN VLIET, E. A., S. DA COSTA ARAUJO, S. REDEKER, R. VAN SCHAIK, E. ARONICA a J. A. GORTER. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* [online]. 2007, **130**(2), 521–534. ISSN 0006-8950, 1460-2156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awl318
- [44] KALLWEIT, Lena, Eric D. HAMLETT, Hannah SATERNOS, Anah GILMORE, Ann-Charlotte GRANHOLM a Scott HOROWITZ. A New Role for RNA G-quadruplexes in Aging and Alzheimer's Disease. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology* [online]. 2024, 2023.10.02.560545. ISSN 2692-8205. Dostupné z: doi:10.1101/2023.10.02.560545
- [45] SHAFER, Richard H. Stability and Structure of Model DNA Triplexes and Quadruplexes and Their Interactions with Small Ligands. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* [online]. B.m.: Elsevier, 1997 [vid. 2023-01-11], s. 55–94. ISBN 978-0-12-540059-6. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6603(08)61029-6
- [46] LYU, Kaixin, Eugene Yui-Ching CHOW, Xi MOU, Ting-Fung CHAN a Chun Kit KWOK. RNA G-quadruplexes (rG4s): genomics and biological functions. *Nucleic Acids Research* [online]. 2021, **49**(10), 5426–5450. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkab187

- [47] NAKANISHI, Chuya a Hiroyuki SEIMIYA. G-quadruplex in cancer biology and drug discovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2020, **531**(1), 45–50. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2020.03.178
- [48] VIJAY KUMAR, M. J., Rodrigo MORALES a Andrey S. TSVETKOV. G-quadruplexes and associated proteins in aging and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging* [online]. 2023, **4**, 1164057. ISSN 2673-6217. Dostupné z: doi:10.3389/fragi.2023.1164057
- [49] BARTAS, Martin, Václav BRÁZDA, Václav KARLICKÝ, Jiří ČERVENĚ a Petr PEČINKA. Bioinformatics analyses and in vitro evidence for five and six stacked G-quadruplex forming sequences. *Biochimie* [online]. 2018, **150**, 70–75. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2018.05.002
- [50] KALLWEIT, Lena, Eric Daniel HAMLETT, Hannah SATERNOS, Anah GILMORE, Ann-Charlotte GRANHOLM a Scott HOROWITZ. Chronic RNA G-quadruplex accumulation in aging and Alzheimer's disease. *eLife* [online]. 2025, **14**, RP105446. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.105446
- [51] CHEN, Anna M., Martin GAJDOŠÍK, Wajiha AHMED, Sinyeob AHN, James S. BABB, Esther M. BLESSING, Allal BOUTAJANGOUT, Mony J. DE LEON, Ludovic DEBURE, Naomi GAGGI, Mia GAJDOŠÍK, Ajax GEORGE, Mobeena GHUMAN, Lidia GLODZIK, Patrick HARVEY, Christoph JUCHEM, Karyn MARSH, Rosemary PERALTA, Henry RUSINEK, Sulaiman SHERIFF, Alok VEDVYAS, Thomas WISNIEWSKI, Helena ZHENG, Ricardo OSORIO a Ivan I. KIROV. Retrospective analysis of Braak stage- and APOE4 allele-dependent associations between MR spectroscopy and markers of tau and neurodegeneration in cognitively unimpaired elderly. *NeuroImage* [online]. 2024, **297**, 120742. ISSN 1095-9572. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroimage.2024.120742
- [52] HUPPERT, Julian L. a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(2), 406–413. ISSN 1362-4962, 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl1057
- [53] PHILIPPI, C., B. LORETZ, U.F. SCHAEFER a C.M. LEHR. Telomerase as an emerging target to fight cancer — Opportunities and challenges for nanomedicine. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, **146**(2), 228–240. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.03.025
- [54] FINVER, S N, K NISHIKURA, L R FINGER, F G HALUSKA, J FINAN, P C NOWELL a C M CROCE. Sequence analysis of the MYC oncogene involved in the t(8;14)(q24;q11) chromosome translocation in a human leukemia T-cell line indicates that putative regulatory regions are not altered. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1988, **85**(9), 3052–3056. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.85.9.3052
- [55] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše. NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 978-80-246-1069-6.

- [56] GORDON, Jennifer, Shohreh AMINI a Martyn K. WHITE. General overview of neuronal cell culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2013, **1078**, 1–8. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-640-5_1
- [57] ARMSTRONG, Richard. What causes neurodegenerative disease? *Folia Neuropathologica* [online]. 2020, **58**(2), 93–112. ISSN 1641-4640. Dostupné z: doi:10.5114/fn.2020.96707
- [58] MOUJALLED, Diane, Andreas STRASSER a Jeffrey R. LIDDELL. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death & Differentiation* [online]. 2021, **28**(7), 2029–2044. ISSN 1350-9047, 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/s41418-021-00814-y
- [59] FITZGERALD, Maurice J. T. *Neuroanatomy: basic and clinical*. Second edition. London: Baillière Tindall, 1992. ISBN 978-0-7020-1432-1.
- [60] GHIASVAND, Kianoush, Mehdi AMIRFAZLI, Parvaneh MOGHIMI, Fatemeh SAFARI a Mohammad Ali TAKHSHID. The role of neuron-like cell lines and primary neuron cell models in unraveling the complexity of neurodegenerative diseases: a comprehensive review. *Molecular Biology Reports* [online]. 2024, **51**(1), 1024. ISSN 0301-4851, 1573-4978. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-024-09964-x
- [61] SARAN, Parmeshwar Lal, Susheel SINGH, Vanrajsinh H. SOLANKI, Ravish CHOUDHARY a Ponnuchamy MANIVEL. Evaluation of Asparagus adscendens accessions for root yield and shatavarin IV content in India. *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY* [online]. 2021, **45**(4), 475–483. ISSN 1303-6173. Dostupné z: doi:10.3906/tar-2006-42
- [62] WAHL, Devin, Samantha M. SOLON-BIET, Victoria C. COGGER, Luigi FONTANA, Stephen J. SIMPSON, David G. LE COUTEUR a Rosilene V. RIBEIRO. Aging, lifestyle and dementia. *Neurobiology of Disease* [online]. 2019, **130**, 104481. ISSN 09699961. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2019.104481
- [63] JALBERT, J. J., L. A. DAIELLO a K. L. LAPANE. Dementia of the Alzheimer Type. *Epidemiologic Reviews* [online]. 2008, **30**(1), 15–34. ISSN 0193-936X, 1478-6729. Dostupné z: doi:10.1093/epirev/mxn008
- [64] KIM, Jisu, Ying ZHU, Sunhui CHEN, Dongdong WANG, Shuya ZHANG, Jiaxuan XIA, Shiyi LI, Qiuju QIU, Hyukjin LEE a Jianxin WANG. Anti-glioma effect of ginseng-derived exosomes-like nanoparticles by active blood-brain-barrier penetration and tumor microenvironment modulation. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2023, **21**(1), 253. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/s12951-023-02006-x
- [65] WANG, Na, Xianlei WANG, Mengjiao HE, Wenxiu ZHENG, Dongmei QI, Yongqing ZHANG a Chun-Chao HAN. Ginseng polysaccharides: A potential neuroprotective agent. *Journal of Ginseng Research* [online]. 2021, **45**(2), 211–217. ISSN 1226-8453. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgr.2020.09.002
- [66] KIEFER, David a Traci PANTUSO. Panax ginseng. *American Family Physician*. 2003, **68**(8), 1539–1542. ISSN 0002-838X.

- [67] YI, Young-Su. New mechanisms of ginseng saponin-mediated anti-inflammatory action via targeting canonical inflammasome signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2021, **278**, 114292. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2021.114292
- [68] YANG, Shao-Jie, Jing-Ji WANG, Ping CHENG, Li-Xia CHEN, Jia-Min HU a Guo-Qi ZHU. Ginsenoside Rg1 in neurological diseases: From bench to bedside. *Acta Pharmacologica Sinica* [online]. 2023, **44**(5), 913–930. ISSN 1745-7254. Dostupné z: doi:10.1038/s41401-022-01022-1
- [69] CAS COMMON CHEMISTRY. *Ginsenoside Rg1* [online]. B.m.: CAS, a division of the American Chemical Society, n.d. Dostupné z: https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=22427-39-0 (retrieved 2024-08-27) (CAS RN: 22427-39-0). Licensed under the Attribution-Noncommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).
- [70] KAWAGISHI, Hirokazu, Motoharu ANDO, Hideki SAKAMOTO, Satoshi YOSHIDA, Fumihiko OJIMA, Yukio ISHIGURO, Nobuo UKAI a Shoei FURUKAWA. Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Letters* [online]. 1991, **32**(35), 4561–4564. ISSN 00404039. Dostupné z: doi:10.1016/0040-4039(91)80039-9
- [71] LI, Tsung-Ju, Tung-Yen LEE, Yun LO, Li-Ya LEE, I-Chen LI, Chin-Chu CHEN a Fang-Chia CHANG. *Herichium erinaceum* mycelium ameliorate anxiety induced by continuous sleep disturbance in vivo. *BMC complementary medicine and therapies* [online]. 2021, **21**(1), 295. ISSN 2662-7671. Dostupné z: doi:10.1186/s12906-021-03463-3
- [72] SHIMBO, Mari, Hirokazu KAWAGISHI a Hidehiko YOKOGOSHI. Erinacine A increases catecholamine and nerve growth factor content in the central nervous system of rats. *Nutrition Research* [online]. 2005, **25**(6), 617–623. ISSN 02715317. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2005.06.001
- [73] UM, Min Young, Hyejin YANG, Jin Kyu HAN, Jin Young KIM, Seung Wan KANG, Minseok YOON, Sangoh KWON a Suengmok CHO. Rice bran extract supplement improves sleep efficiency and sleep onset in adults with sleep disturbance: A randomized, double-blind, placebo-controlled, polysomnographic study. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1), 12339. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-48743-8
- [74] LI, I.-Chen, Li-Ya LEE, Tsai-Teng TZENG, Wan-Ping CHEN, Yen-Po CHEN, Young-Ju SHIAO a Chin-Chu CHEN. Neurohealth Properties of *Herichium erinaceum* Mycelia Enriched with Erinacines. *Behavioural Neurology* [online]. 2018, **2018**, 5802634. ISSN 1875-8584. Dostupné z: doi:10.1155/2018/5802634
- [75] APFEL, Stuart C. a John A. KESSLER. Neurotrophic Factors in the Treatment of Peripheral Neuropathy. In: Gregory R. BOCK a Jamie A. GOODE, ed. *Novartis Foundation Symposia* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2007 [vid. 2024-08-23], s. 98–119. ISBN 978-0-471-95721-8. Dostupné z: doi:10.1002/9780470514863.ch8

- [76] SETHI, Jaswinder K. a Antonio J. VIDAL-PUIG. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of Lipid Research* [online]. 2007, **48**(6), 1253–1262. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R700005-JLR200
- [77] PATEL, Deendayal, Sanjeev SHUKLA a Sanjay GUPTA. Apigenin and cancer chemoprevention: Progress, potential and promise (Review). *International Journal of Oncology* [online]. 2007 [vid. 2023-01-11]. ISSN 1019-6439, 1791-2423. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.30.1.233
- [78] CALDERARO, Antonella, Giuseppe Tancredi PATANÈ, Ester TELLONE, Davide BARRECA, Silvana FICARRA, Francesco MISITI a Giuseppina LAGANÀ. The Neuroprotective Potentiality of Flavonoids on Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(23), 14835. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232314835
- [79] ZHU, Yi, Yeqing MAO, Hong CHEN, Yiwei LIN, Zhenghui HU, Jian WU, Xin XU, Xianglai XU, Jie QIN a Liping XIE. Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells. *Cancer Cell International* [online]. 2013, **13**(1), 54. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2867-13-54
- [80] SHETTI, Priya a Sunil S. JALALPURE. A single robust stability-indicating RP-HPLC analytical tool for apigenin quantification in bulk powder and in nanoliposomes: a novel approach. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, **7**(1), 122. ISSN 2314-7253. Dostupné z: doi:10.1186/s43094-021-00268-6
- [81] JÄGER, A. K., K. KRYDSFELDT a H. B. RASMUSSEN. Bioassay-guided isolation of apigenin with GABA-benzodiazepine activity from *Tanacetum parthenium*. *Phytotherapy Research* [online]. 2009, **23**(11), 1642–1644. ISSN 0951-418X, 1099-1573. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.2816
- [82] WASOWSKI, Cristina, Mariel MARDER, Haydeé VIOLA, Jorge Horacio MEDINA a Alejandro Constantino PALADINI. Isolation and Identification of 6-Methylapigenin, a Competitive Ligand for the Brain GABA_A Receptors, from *Valeriana wallichii*. *Planta Medica* [online]. 2002, **68**(10), 934–936. ISSN 0032-0943, 1439-0221. Dostupné z: doi:10.1055/s-2002-34936
- [83] NABAVI, Seyed Fazel, Haroon KHAN, Grazia D'ONOFRIO, Dunja ŠAMEC, Samira SHIROOIE, Ahmad Reza DEHPOUR, Sandro ARGÜELLES, Solomon HABTEMARIAM a Eduardo SOBARZO-SANCHEZ. Apigenin as neuroprotective agent: Of mice and men. *Pharmacological Research* [online]. 2018, **128**, 359–365. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2017.10.008
- [84] VENIGALLA, Madhuri, Sandra SONEGO, Erika GYENGESI a Gerald MÜNCH. Curcumin and Apigenin - novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research* [online]. 2015, **10**(8), 1181. ISSN 1673-5374. Dostupné z: doi:10.4103/1673-5374.162686
- [85] RENAUD DE LA FAVERIE, Amandine, Aurore GUÉDIN, Amina BEDRAT, Liliya A. YATSUNYK a Jean-Louis MERGNY. Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for

- G4 formation. *Nucleic Acids Research* [online]. 2014, **42**(8), e65–e65. ISSN 1362-4962, 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gku111
- [86] XUE, Christine, Tiffany Yuwen LIN, Dennis CHANG a Zhefeng GUO. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science* [online]. 2017, **4**(1), 160696. ISSN 2054-5703. Dostupné z: doi:10.1098/rsos.160696
- [87] BIANCALANA, Matthew a Shohei KOIDE. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2010, **1804**(7), 1405–1412. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2010.04.001
- [88] CHU, Tak-Ho, Karen CUMMINS, Joseph S. SPARLING, Shigeki TSUTSUI, Craig BRIDEAU, K. Peter R. NILSSON, Jeffrey T. JOSEPH a Peter K. STYS. Axonal and myelinic pathology in 5xFAD Alzheimer's mouse spinal cord. *PloS One* [online]. 2017, **12**(11), e0188218. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0188218
- [89] BACHMAN, Julia. Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, 2013 [vid. 2024-08-24], s. 67–74. ISBN 978-0-12-420037-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6
- [90] VILJOEN, Gerrit J., L. H. NEL a J. R. CROWTHER. *Molecular diagnostic PCR handbook*. Dordrecht: Springer, 2005. ISBN 978-1-4020-3403-9.
- [91] MURRAY, Robert K., ed. *Harper's illustrated biochemistry*. 26. ed. New York, NY: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003. A Lange medical book. ISBN 978-0-07-138901-3.
- [92] HEID, C A, J STEVENS, K J LIVAK a P M WILLIAMS. Real time quantitative PCR. *Genome Research* [online]. 1996, **6**(10), 986–994. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.6.10.986
- [93] NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M.J. CASTAÑO a J. SOLERA. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, **439**, 231–250. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2014.10.017
- [94] HJELMSØ, Mathis Hjort, Lars Hestbjerg HANSEN, Jacob BÆLUM, Louise FELD, William E. HOLBEN a Carsten Suhr JACOBSEN. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, **80**(12), 3568–3575. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.03923-13
- [95] WILLIS, Charles E. a Thomas L. SLOVIS. The ALARA concept in pediatric CR and DR: dose reduction in pediatric radiographic exams--a white paper conference. *AJR. American journal of roentgenology* [online]. 2005, **184**(2), 373–374. ISSN 0361-803X. Dostupné z: doi:10.2214/ajr.184.2.01840373
- [96] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry* [online]. 2014, **158**, 245–254. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111

- [97] MCF-7 CELL LINE - BREAST CANCER CELL LINES. *MCF-7 Cells* [online]. 19. červen 2014. Dostupné z: <https://mcf7.com/>
- [98] BOSHNJAKU, Vanda, Shunsuke ICHI, Yueh-Wei SHEN, Rahul PURANMALKA, Barbara MANIA-FARNELL, David G. MCLONE, Tadanori TOMITA a Chandra S.K. MAYANIL. Epigenetic regulation of sensory neurogenesis in the dorsal root ganglion cell line ND7 by folic acid. *Epigenetics* [online]. 2011, **6**(10), 1207–1216. ISSN 1559-2294, 1559-2308. Dostupné z: doi:10.4161/epi.6.10.17592
- [99] MA, Qiufu, Chris KINTNER a David J ANDERSON. Identification of neurogenin, a Vertebrate Neuronal Determination Gene. *Cell* [online]. 1996, **87**(1), 43–52. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81321-5
- [100] VRAZHNOV, Denis, Anastasia KNYAZKOVA, Maria KONNIKOVA, Oleg SHEVELEV, Ivan RAZUMOV, Evgeny ZAVJALOV, Yury KISTENEV, Alexander SHKURINOV a Olga CHERKASOVA. Analysis of Mouse Blood Serum in the Dynamics of U87 Glioblastoma by Terahertz Spectroscopy and Machine Learning. *Applied Sciences* [online]. 2022, **12**(20), 10533. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app122010533
- [101] QI, Songtao a Yawei LIU. Differences in protein expression between the u251 and u87 cell lines. *Turkish Neurosurgery* [online]. 2016 [vid. 2025-04-02]. ISSN 1019-5149. Dostupné z: doi:10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1
- [102] BELL, H. S., I. R. WHITTLE, M. WALKER, H. A. LEAVER a S. B. WHARTON. The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems*. *Neuropathology and Applied Neurobiology* [online]. 2001, **27**(4), 291–304. ISSN 0305-1846, 1365-2990. Dostupné z: doi:10.1046/j.0305-1846.2001.00319.x
- [103] LI, Yali, Deshu CHENG, Ran CHENG, Xinyu ZHU, Tao WAN, Jianmiao LIU a Rongying ZHANG. Mechanisms of U87 Astrocytoma Cell Uptake and Trafficking of Monomeric versus Protofibril Alzheimer's Disease Amyloid- β Proteins. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(6), e99939. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0099939
- [104] SALZER, James L. Schwann Cell Myelination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2015, **7**(8), a020529. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a020529
- [105] JESSEN, K. R. a R. MIRSKY. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of Physiology* [online]. 2016, **594**(13), 3521–3531. ISSN 0022-3751, 1469-7793. Dostupné z: doi:10.1113/JP270874
- [106] PAGANO, Alessandra, Gilles BREUZARD, Fabrice PARAT, Aurélie TCHOHANDJIAN, Dominique FIGARELLA-BRANGER, Tiphany Coralie DE BESSA, Françoise GARROUSTE, Alexis DOUENCE, Pascale BARBIER a Hervé KOVACIC. Tau Regulates Glioblastoma Progression, 3D Cell Organization, Growth and Migration via the PI3K-AKT Axis. *Cancers* [online]. 2021, **13**(22), 5818. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13225818

- [107] FUZZATI, N. Analysis methods of ginsenosides. *Journal of Chromatography B* [online]. 2004, **812**(1–2), 119–133. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(04)00645-2
- [108] PARK, Hwa-Jin, Jung-Hee LEE, Yong-Bum SONG a Ki-Hyun PARK. Effects of Dietary Supplementation of Lipophilic Fraction from *Panax ginseng* on cGMP and cAMP in Rat Platelets and on Blood Coagulation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 1996, **19**(11), 1434–1439. ISSN 0918-6158, 1347-5215. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.19.1434
- [109] TRUONG, Van-Long a Woo-Sik JEONG. Red ginseng (*Panax ginseng* Meyer) oil: A comprehensive review of extraction technologies, chemical composition, health benefits, molecular mechanisms, and safety. *Journal of Ginseng Research* [online]. 2022, **46**(2), 214–224. ISSN 1226-8453. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgr.2021.12.006
- [110] GUAN, Yongxia, Jianwei FAN, Chenghong SUN, Yiqing YANG, Jianye QUAN, Guimin ZHANG a Na GUO. Differences in the chemical composition of *Panax ginseng* roots infected with red rust. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2022, **283**, 114610. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2021.114610
- [111] NAVARRO-ORCAJADA, Silvia, Adrián MATENCIO, Cristina VICENTE-HERRERO, Francisco GARCÍA-CARMONA a José Manuel LÓPEZ-NICOLÁS. Study of the fluorescence and interaction between cyclodextrins and neochlorogenic acid, in comparison with chlorogenic acid. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1), 3275. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-82915-9
- [112] NAVARRO-ORCAJADA, Silvia, Adrián MATENCIO, Cristina VICENTE-HERRERO, Francisco GARCÍA-CARMONA a José Manuel LÓPEZ-NICOLÁS. Study of the fluorescence and interaction between cyclodextrins and neochlorogenic acid, in comparison with chlorogenic acid. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1), 3275. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-82915-9
- [113] MISHRA, Beena, Atanu BARIK, K. Indira PRIYADARSINI a Hari MOHAN. Fluorescence spectroscopic studies on binding of a flavonoid antioxidant quercetin to serum albumins. *Journal of Chemical Sciences* [online]. 2005, **117**(6), 641–647. ISSN 0253-4134, 0973-7103. Dostupné z: doi:10.1007/BF02708293

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACH – Alzheimerova choroba	ThT – Thioflavin T
APP – amyloidový prekurzorový protein	T _m – teplota tání
A β – amyloid beta	TNF – tumor nekrotizující faktor
BBB – hematoencefalická bariéra	WHO – světová zdravotnická organizace
cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina	
CNS – centrální nervová soustava	
C _t – treshold cykle	
DMF – dimethylformamid	
DMSO – dimethylsulfoxid	
DNA – deoxyribonukleová kyselina	
G4 – G-kvadruplexy	
HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání	
IFN – interferon	
IL – interleukin	
kbp – kilobáze	
LD50 – letální dávka 50	
MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid	
PBS – fosfátový pufr	
PCR – polymerázová řetězová reakce	
PK – pozitivní kontrola	
prn – otáček za minutu	
qPCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase	
RNA – ribonukleová kyselina	
ROS – reaktivní formy kyslíku	
RT-PCR – reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce	