

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení cytotoxicity nově syntetizovaných terpenoidů

Bc. Eliška Hejná

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Hejná**
Osobní číslo: **C20470**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Stanovení cytotoxicity nově syntetizovaných terpenoidů**
Téma práce anglicky: **Determination Of Cytotoxicity Of New Synthesized Terpenoids**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Seznamte se s literárními údaji týkající se terpenů a jejich derivátů – struktura, rozdělení, zástupci a jejich biologické (protinádorové, antimikrobiální, antifungální, protizánětlivé, antioxidační, antidepressivní, atd.) účinky.

Experimentální část:

1. Stanovte cytotoxicitu vybraných nově syntetizovaných terpenoidů vůči buněčné linii MCF-7 a A549. Ke stanovení cytotoxicity použijte test kvantifikace aktivity mitochondriálních dehydrogenáz prostřednictvím XTT a monitorování cytotoxicity v reálném čase pomocí systému xCELLigence.
2. Zhodnoťte všechny získané výsledky vzhledem k výsledkům publikovaným v dostupné recentní literatuře.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení cytotoxicity nově stanovených terpenoidů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28.4.2022

.....

Bc. Eliška Hejná

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D., za odborné vedení, vstřícnost, cenné rady, věcné připomínky při konzultacích a pomoc při vypracování diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat paní laborantce Bc. Ivaně Fousové za její trpělivost, ochotu a velmi cenné rady při práci v buněčné laboratoři.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá studiem cytotoxicity šesti nově syntetizovaných terpenoidů, které by mohly do budoucna být použity jako potenciálně terapeutické látky. Pro testování cytotoxicity terpenoidů byly použity dvě nezávislé metody, test redukce tetrazoliové soli XTT a analýza buněk v reálném čase pomocí systému xCELLigence. K testování cytotoxicity byly použity buňky lidského adenokarcinomu prsu MCF7 a buňky lidského adenokarcinomu plic A549.

Všechny testované terpenoidy vykazovaly pouze mírný cytotoxický účinek. Největší cytotoxický efekt vůči buňkám MCF7 vykazoval terpenoid s označením 4-OBn. Terpenoid s označením 3-Me byl nejvíce cytotoxický vůči buňkám A549. Terpenoid označený 4-Me neměl na obě použité buněčné linie prakticky žádný vliv. Vzhledem k nízké cytotoxické aktivitě se tyto terpenoidy jeví jako perspektivní sloučeniny pro další studium.

KLÍČOVÁ SLOVA

terpenoidy, cytotoxicita, viabilita, MCF7, A549

TITLE

Determination Of Cytotoxicity Of New Synthesized Terpenoids

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the study of cytotoxicity of six new synthesized terpenoids, which could be used in the future as potential therapeutic agent. To test the cytotoxic effect of terpenoids were used two different methods: tetrazolium salt (XTT) reduction assay and analysis of cell proliferation in real-time using the xCELLigence system. The cytotoxicity tests were performed using human breast adenocarcinoma (MCF7) and human lung adenocarcinoma (A549) cells.

All tested terpenoids showed only mild cytotoxic effect. The most cytotoxic terpenoid against MCF7 cells was 4-OBn. The terpenoid labeled 3-Me was the most cytotoxic against A549 cells. The terpenoid labeled 4-Me was the least cytotoxic against both cell lines. These terpenoids appear to be promising compounds for further study due their low cytotoxic activity.

KEYWORDS

terpenoids, cytotoxicity, viability, MCF7, A549

OBSAH

ÚVOD.....	13
1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	14
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	15
2.1 Charakteristika terpenů a jejich derivátů	15
2.2 Klasifikace terpenů a terpenoidů.....	16
2.2.1 Monoterpeny	16
2.2.1.1 Mentol	17
2.2.1.2 Limonen	17
2.2.1.3 Geraniol.....	18
2.2.1.4 Pinen	18
2.2.1.5 Myrcen	19
2.2.2 Seskviterpeny	20
2.2.2.1 Azuleny	21
2.2.2.2 Humulen.....	22
2.2.2.3 Bisabolem	22
2.2.2.4 Farnesol.....	23
2.2.3 Diterpeny.....	23
2.2.3.1 Retinol (Vitamín A)	24
2.2.3.2 Fytol	25
2.2.4 Triterpeny.....	25
2.2.4.1 Skvalen.....	25
2.2.4.2 Ambrein	26
2.2.4.3 Lanosterol	27
2.2.5 Tetraterpeny	28
2.2.5.1 Karotenoidy a karoteny.....	28
2.2.5.2 Lutein	28
2.2.5.3 Lykopen	29
2.2.6 Polyterpeny	30
2.2.6.1 Kaučuk	30
2.2.6.2 Gutaperča	31
2.3 Biologická aktivita terpenů	31
2.3.1 Antimikrobiální účinky	32
2.3.2 Protizánětlivé účinky.....	33
2.3.3 Protinádorové účinky	34

2.3.3.1	Protinádorové účinky monoterpenů	34
2.3.3.2	Protinádorové účinky seskviterpenů	35
2.3.3.3	Protinádorové účinky diterpenů	35
2.3.3.4	Protinádorové účinky triterpenů.....	36
2.3.4	Antifungální účinky	36
2.3.5	Antivirové účinky	38
2.3.6	Antioxidační aktivita.....	38
2.3.7	Terpeny jako antidepresivum.....	40
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
3.1	Použité přístroje a pomůcky.....	41
3.2	Použité chemikálie a roztoky	41
3.2.1	Příprava médií	43
3.2.2	Příprava koncentrační řady terpenoidů	44
3.3	Použité buněčné linie	44
3.3.1	Rozmrazení buněk.....	44
3.3.2	Pasážování a počítání buněk	45
3.4	Stanovení cytotoxicity pomocí XTT testu	45
3.4.1	Postup.....	46
3.4.1.1	Titrační experiment	47
3.5	Analýza proliferace buněk v reálném čase pomocí systému xCELLigence RTCA SP... 48	
3.5.1	Postup.....	49
3.6	Statistická analýza.....	50
4	VÝSLEDKY.....	51
4.1	Stanovení cytotoxicity pomocí XTT testu	51
4.1.1	Buněčná linie MCF7	51
4.1.2	Buněčná linie A549.....	55
4.2	Stanovení cytotoxicity terpenoidů pomocí systému xCELLigence RTCA SP.....	59
4.2.1	Buněčná linie MCF7	59
4.2.2	Buněčná linie A549.....	63
5	DISKUZE.....	67
6	ZÁVĚR.....	72
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 - Struktura jedné izoprenové jednotky.....	15
Obrázek 2 - Chemická struktura mentolu	17
Obrázek 3 - Chemická struktura D-limonenu	18
Obrázek 4 - Chemická struktura geraniolu	18
Obrázek 5 - Chemická struktura α -pinenu.....	19
Obrázek 6 - Chemická struktura β -myrcenu	20
Obrázek 7 - Chemická struktura azulenu	21
Obrázek 8 - Chemická struktura α -humulenu.....	22
Obrázek 9 - Chemická struktura bisabolenu	23
Obrázek 10 - Chemická struktura farnesolu.....	23
Obrázek 11 - Chemická struktura retinolu	24
Obrázek 12 - Chemická struktura fytolu	25
Obrázek 13 - Chemická struktura skvalenu	26
Obrázek 14 - Chemická struktura ambreinu	27
Obrázek 15 - Chemická struktura lanosterolu.....	27
Obrázek 16 - Chemická struktura β -karotenu	28
Obrázek 17 - Chemická struktura luteinu	29
Obrázek 18 - Chemická struktura lykopenu.....	30
Obrázek 19 - Chemická struktura přírodního kaučuku	30
Obrázek 20 - Chemická struktura gutaperči.....	31
Obrázek 21 - Schéma redukce XTT tetrazoliové soli na oranžový formazan	46
Obrázek 22 - Komponenty systému xCELLigence RTCA SP	48
Obrázek 23 - Průběh analýzy pomocí systému xCELLigence RTCA.....	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Přehled testovaných terpenoidů.....	42
Tabulka 2 - Ředění zásobních roztoků terpenoidů pro XTT test.....	44
Tabulka 3 - Pipetovací schéma destičky pro titrační experiment	47

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 3-Me	51
Graf 2 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 4-COOHCP	52
Graf 3 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 4-OBn.....	53
Graf 4 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 4-Cl.....	53
Graf 5 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 4-Me	54
Graf 6 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu PyOx.....	54
Graf 7 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 3-Me.....	55
Graf 8 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 4-COOHCP.....	56
Graf 9 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 4-OBn	56
Graf 10 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 4-Cl.....	57
Graf 11 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 4-Me.....	58
Graf 12 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu PyOx	58
Graf 13 - Vliv terpenoidu 3-Me na proliferaci buněčné linie MCF7	59
Graf 14 - Vliv terpenoidu 4-COOHCP na proliferaci buněčné linie MCF7	60
Graf 15 - Vliv terpenoidu 4-OBn na proliferaci buněčné linie MCF7.....	61
Graf 16 - Vliv terpenoidu 4-Cl na proliferaci buněčné linie MCF7	61
Graf 17 - Vliv terpenoidu 4-Me na proliferaci buněčné linie MCF7	62
Graf 18 - Vliv terpenoidu PyOx na proliferaci buněčné linie MCF7	62
Graf 19 - Vliv terpenoidu 3-Me na proliferaci buněčné linie A549	63
Graf 20 - Vliv terpenoidu 4-COOHCP na proliferaci buněčné linie A549.....	64
Graf 21 - Vliv terpenoidu 4-OBn na proliferaci buněčné linie A549	64
Graf 22 - Vliv terpenoidu 4-Cl na proliferaci buněčné linie A549	65
Graf 23 - Vliv terpenoidu 4-Me na proliferaci buněčné linie A549	66
Graf 24 - Vliv terpenoidu PyOx na proliferaci buněčné linie A549	66

SEZNAM ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CCT α	Fosfocholin cytidyltransferáza α
CF	Karboxyfluorescein
CI	Cell index
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPBS	Fosfátový pufr
ECR	Electron coupling reagent
EMEM	Minimum essential medium Eagle
FBS	Fetální bovinní sérum
FPP	Farnesylpyrofosfát
FXR	Farnesoidní X receptor
GP	Gutaperča
GSH	Glutathion
HCl	Kyselina chlorovodíková
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductáza
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductáza
HSV1	virus herpes simplex typu 1
HSV2	virus herpes simplex typu 2
IL-1	Interleukin 1
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
iNOS	Indukovatelná NO syntáza
M6P/IGF II	Insulin-like growth factor-2 / mannose-6-phosphate
MEM	Minimum essential medium
MPO	Myeloperoxidáza
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid
NF- κ B	Nukleární faktor kappab
NO	Oxid dusnatý

PBS	Fosfátový pufr
PHA	Polyhydroxyalkonát
PPAR	Receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem
PSA	Prostatický specifický antigen
RBP4	Retinol vázající protein 4
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RTCA	Real-time cell analyzer
SL	Seskviterpenové laktony
SOD	Superoxid dismutáza
SP	Single plate
TGF- β 1	Transformující růstový faktor beta
TNF- α	Tumor necrosis factor α (faktor nádorové nekrózy α)
XTT	2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

ÚVOD

Terpeny a terpenoidy se řadí mezi chemické sloučeniny, které jsou v naprosté většině rostlinného původu (de Matos, 2019). Celkem bylo popsáno více než 76 000 terpenů a terpenoidů. Společně tak tvoří největší a strukturně nejrozmanitější skupinu přírodních produktů. V současné době se získávají buď přírodní extrakcí, nebo chemickou syntézou (Li, 2016, Rudolf, 2020). Tyto chemické sloučeniny jsou charakterizovány různou kombinací izoprenových jednotek C_5H_8 . Terpeny, které ve své molekule obsahují do třech jednotek izoprenu, jsou vysoce těkavé a těkavost se snižuje se zvyšujícím se počtem jednotek izoprenu (de Matos, 2019).

Jelikož terpeny a terpenoidy patří mezi sekundární metabolity léčivých rostlin, jsou velmi významným přírodním zdrojem potenciálních terapeutických látek pro širokou škálu farmaceutických účelů (de Matos, 2019). Terpeny jsou zejména velmi významné díky své antimikrobiální aktivitě, jelikož jsou aktivní vůči široké škále mikroorganismů, včetně gramnegativních i grampozitivních bakterií a hub (Solórzano-Santos, 2012). Mnoho terpenů má také inhibiční účinky na různé lidské nádorové buňky, a tak se používají jako protinádorová léčiva (například Taxol). Kromě antimikrobiální a protinádorové aktivity vykazují zejména ještě protizánětlivé, antioxidační, nebo antifungální účinky, a navíc napomáhají při hojení různých kožních ran (de Matos, 2019, Muhseen, 2019). Mimo farmaceutický průmysl se terpeny využívají ještě například v kosmetickém a potravinářském průmyslu a také jako biopaliva (Li, 2016).

1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

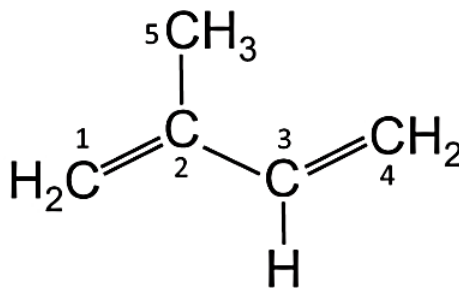
Cílem této diplomové práce bylo stanovit možný cytotoxický účinek šesti nově syntetizovaných terpenoidů. Cílem teoretické části bylo seznámit se s literárními údaji, které se týkají biologických účinků terpenů a jejich derivátů. Cílem experimentální části pak bylo stanovit pomocí testu kvantifikace aktivity mitochondriálních dehydrogenáz (XTT test) a pomocí monitorování cytotoxicity v reálném čase systémem xCELLigence cytotoxicitu nově syntetizovaných terpenoidů vůči buněčným liniím MCF7 a A549.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika terpenů a jejich derivátů

Terpeny se řadí mezi významné organické sloučeniny, které jsou v naprosté většině rostlinného původu (Thurman, 2020). Z chemického hlediska jsou klasifikovány jako jednoduché uhlovodíky, které jsou odvozené od izoprenu. Terpeny jsou dost často zaměňovány s terpenoidy, které jsou také známé pod názvem izoprenoidy, protože jsou všechny syntetizovány kondenzací izoprenových jednotek. Terpenoidy jsou deriváty terpenů, protože kromě samotných izoprenových jednotek obsahují navíc funkční skupinu zahrnující kyslík. Taková funkční skupina může být aldehydická, ketonická, alkoholová nebo karboxylová (Boncan, 2020, Aharoni, 2003). Terpeny a terpenoidy jsou těkavé, silně aromatické sloučeniny a tvoří rozšířenou skupinou sekundárních metabolitů. Vyskytují se zejména v jehličnatých nebo stálezelených rostlinách (v květech, listech, kořenech i plodech) a tvoří hlavní složku pryskyřice těchto rostlin, která se nazývá terpentýn (Thurman, 2020). Jsou také hlavní složkou éterických olejů, které se vyskytují například v jehličnanech nebo konopí, a tudíž jsou často zodpovědné za charakteristickou vůni těchto rostlin (Sommano, 2020). Tyto sloučeniny jsou známé pro svoje vlastnosti, jako je těkavost, chuť, aroma nebo toxicita, a proto hrají důležitou roli v obraně rostlin, komunikaci mezi nimi (Aharoni, 2003). Molekuly jednotlivých terpenů nebo terpenoidů se skládají ze dvou či více pětiuhlíkatých izoprenových jednotek. Izoprenové jednotky jsou buď cyklické nebo acyklické (lineární) (Thurman, 2020).

Izopren (2-methylbuta-1,3-dien) je nenasycený uhlovodík, který je odvozený od 1,3-butadienu a je jednou z nejhojněji produkovaných biogenních těkavých organických sloučenin na Zemi a zároveň je vysoce reaktivní. Většina izoprenu je obsažena právě v suchozemských rostlinách. Také je základní stavební jednotkou přírodního kaučuku (McGenity, 2018).



Obrázek 1 - Struktura jedné izoprenové jednotky (Hillier, 2019)

Terpeny a terpenoidy jsou obecně jedním z nejdůležitějších zdrojů pro potravinářský a farmaceutický průmysl, ale také pro výrobu kosmetických produktů. Izolace jednotlivých terpenů a terpenoidů z jejich přírodních zdrojů je dosud hlavní výrobní cestou, a to i přesto, že tento proces může být časově náročný, zdlouhavý a drahý. Chemická syntéza těchto přírodních sloučenin je vzhledem k jejich strukturní složitosti dosti obtížná a v mnoha případech i neúčinná (Alemdar, 2017).

2.2 Klasifikace terpenů a terpenoidů

Molekulový vzorec terpenů je $(C_5H_8)_n$; kde n určuje počet zúčastněných izoprenových jednotek. Terpeny jsou klasifikovány do několika skupin, a to právě podle počtu těchto izoprenových jednotek a počtu obsažených uhlíků:

- Monoterpeny – 2 izoprenové jednotky, 10 atomů uhlíku
- Seskviterpeny – 3 izoprenové jednotky, 15 atomů uhlíku
- Diterpeny – 4 izoprenové jednotky, 20 atomů uhlíku
- Triterpeny – 6 izoprenových jednotek, 30 atomů uhlíku
- Tetraterpeny – 8 izoprenových jednotek, 40 atomů uhlíku
- Polyterpeny – velký počet izoprenových jednotek (Elaine, 2009).

Terpenoidy jsou také klasifikovány na základě počtu jejich izoprenových jednotek a počtu uhlíků na monoterpenoidy (C10), seskviterpenoidy (C15), diterpenoidy (C20), triterpenoidy (C30), tetraterpenoidy (C40) a polyterpenoidy, které obsahují více než 40 uhlíků (Boncan, 2020).

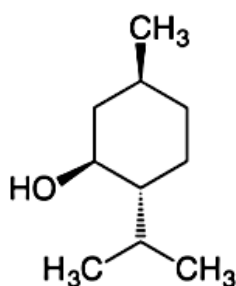
2.2.1 Monoterpeny

Monoterpeny se skládají ze dvou izoprenových jednotek, tzn. že se v jejich molekule nachází 10 atomů uhlíku (Elaine, 2009). Monoterpeny mohou být jak acyklické, monocyklické, tak bicyklické. Jsou to přírodní látky, které mají charakteristickou vůni a uplatňují se v důležitých procesech, jako je regulace růstu, reprodukční cyklus, nebo obranné mechanismy. Monoterpeny se řadí do sekundárních metabolitů rostlin. Sekundární metabolity jsou v tomto případě látky, které postrádají veškerou roli v úplně základních rostlinných procesech. To znamená, že daná rostlina je produkuje, ale nevyužívá je jako zdroj energie nebo zásobní látku. Tyto metabolity slouží rostlině jako obranná látka, atraktant, nebo detoxikační faktor. Monoterpeny jsou tedy významné tím, že zprostředkovávají interakce mezi rostlinou a prostředím, chrání rostlinu před škůdci nebo vysycháním. Významné jsou však nejen pro rostliny, ale i vyšší organismy. Monoterpeny jsou také součástí silic. (Dvořáková, 2011). Silice neboli éterické oleje jsou směsi, které jsou

tvořené nízkomolekulárními těkavými látkami, a to zejména monoterpeny, či seskviterpeny, nebo benzoidy, deriváty mastných kyselin a fenylypropanoidy (Adorjan, 2010). Silice se získávají parní nebo suchou destilací, hydrolyzací, nebo nějakou jinou metodou z určité rostliny, či její části (Rubiolo, 2010). Monoterpeny jsou hojně využívány v kosmetice nebo farmacii pro své charakteristické aroma, v potravinářství anebo jako insekticidy a herbicidy z důvodu své toxicity. Také se řadí se mezi takzvané „bioaktivní sloučeniny“, a to zejména díky svým antimikrobiálním a protinádorovým účinkům (Dvořáková, 2011).

2.2.1.1 Mentol

Mentol je z chemického hlediska monocyklický terpenový alkohol, který je součástí silice máty peprné. Přírodní mentol je možné izolovat například z *Mentha canadensis*, což je druh máty pocházející ze Severní Ameriky, ale může být syntetizován i průmyslově různými procesy. Díky mentolu má máta peprná charakteristickou vůni a chuť a pro tyto vlastnosti je to jedna z nejpoužívanějších aromatických přísad vedle vanilky a citrusů. Mentol je také známý pro jeho chladivé účinky. Z tohoto důvodu se hojně využívá pro výrobu různých spotřebních produktů, jako jsou čokoláda nebo žvýkačky, ale také ve výrobcích, které se používají pro péči o zubní dutinu, jako jsou zubní pasty, a také ve volně prodejných léčivech (Kamatou, 2013). Mentol působí také lokálně antisepticky, tlumí bolest a má znecitlivující účinky, chladí a přináší úlevu zejména u zánětlivých onemocnění kloubů a měkkých tkání (Pergolizzi, 2018).

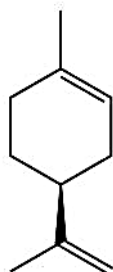


Obrázek 2 - Chemická struktura mentolu (Pergolizzi, 2018)

2.2.1.2 Limonen

Limonen je jeden z nejhojněji rozšířených monocyklických monoterpenových uhlovodíků v rostlinné říši. Vyskytuje se ve dvou optických izomerech, které jsou nazývány D- a L-limonen. Nejběžnější, D-limonen je bezbarvá kapalina s charakteristickou citronovou vůní, která se běžně získává lisováním za studena z citrusových slupek a dužniny. Zatímco L-limonen je více přítomen u jiných rostlinných druhů, jako jsou *Mentha spp.*, anebo se nachází u různých éterických olejů. Oba optické izomery jsou běžnými přísadami

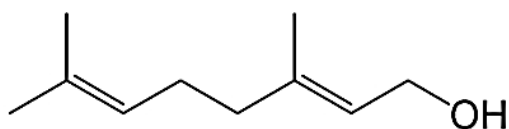
v kosmetice, potravinách nebo léčivech. Limonen vykazuje taktéž antimikrobiální aktivitu proti běžným alimentárním bakteriím, jako jsou *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* (Ibáñez, 2020).



Obrázek 3 - Chemická struktura D-limonenu (Hyatt, 2007)

2.2.1.3 Geraniol

Geraniol je z chemického hlediska acyklický monotерpen, který se získává z éterických olejů aromatických rostlin, například z *Cinnamomum tenuipilum*, což je rostlina z rodu skořicovník (Lei, 2019). Geraniol se jako primární složka nachází v éterických olejích pelargonií, citronové trávy nebo růží a má typickou žlutou barvu. Díky svému výraznému květinovému aroma je jednou z nejoblíbenějších složek vonných produktů, jako jsou různé deodoranty, parfémy a kosmetické krémy. Geraniol se však nepoužívá jen u kosmetických produktů, ale má také široké uplatnění ve farmaceutickém průmyslu z důvodu jeho protinádorové, protizánětlivé, antioxidační a antimikrobiální aktivity, kardioprotektivních a neuroprotektivních účinků (Chacón, 2019, Lei, 2019).

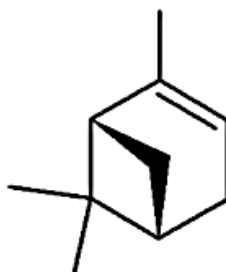


Obrázek 4 - Chemická struktura geraniolu (Lüddecke, 2012)

2.2.1.4 Pinen

Pinen je bicyklický terpen ze skupiny monotерpenů, který se nachází ve formě dvou optických izomerů α - a β -pinenu nebo racemátu (Salehi, 2019). Tyto optické izomery se vzájemně zrcadlově nepřekrývají a liší se svou interakcí s polarizovaným světlem, a tím pádem mohou vykazovat rozdíly v toxicitě a biologické aktivitě (Rivas da Silva, 2012). α -pinen je bezbarvá kapalina, která je nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v ethanolu. β -pinen je taktéž bezbarvá kapalina, která je však ve vodě a ethanolu nerozpustná. V přírodě se nalézá jako součást pryskyřice jehličnatých stromů, zejména borovic (Salehi, 2019). Lze

je najít i v éterických olejích rozmarýnu, levanduli a terpetýnu. U rostlin vykazují pineny antifungální aktivitu. Pineny se vyznačují širokou škálou farmakologických aktivit, včetně modulace antibiotické rezistence, antimikrobiálních, antikoagulačních, protinádorových, antioxidačních účinků a účinků proti oxidativnímu stresu (Rivas da Silva, 2012).

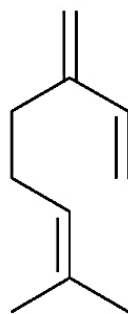


Obrázek 5 - Chemická struktura α -pinenu (Rivas da Silva, 2012)

2.2.1.5 Myrcen

Myrcen se řadí mezi acyklické monoterpenové uhlovodíky, který se nachází u rostlin nebo potravin (Uyeda, 2016). V přírodě se vyskytuje výhradně jako β -myrcen a lze ho extrahovat z velkého množství rostlin. β -myrcen se přirozeně vyskytuje zejména v esenciálních olejích rostlin, jako je chmel, konopí, citronová tráva, bobkový list a sporýš klasnatý. Nachází se i v citrusových plodech, citrusových šťávách a mangu. Myrcen je také hlavní složkou chmelové silice a může tvořit až 70 % objemu této silice. Díky tomu je v pivovarnictví považován za jednu z nejsilnějších aromatických chuťových složek. Kromě výrazné chuti chmele se β -myrcen významně podílí na charakteristické vůni a nasládlé chuti konopí. Myrcen má kořenité, zemité a pižmové aroma (Surendran, 2021).

Kmeny konopí, které obsahují vysoké koncentrace myrcenu ($> 0,5$ %), pravděpodobně vyvolávají sedativní účinky. Vysoké koncentrace myrcenu se například vyskytují u *Cannabis indica* (konopí indické). Na druhou stranu kmeny konopí s nízkým obsahem β -myrcenu ($< 0,5$ %) vyvolávají stimulační účinky. Myrcen může také hrát roli při napomáhání vstřebávání kanabinoidů přes hematoencefalickou bariéru. Průmyslově se však β -myrcen získává hlavně pyrolýzou β -pinenu. Obvykle se využívá jako výchozí materiál při výrobě parfémů, vůní, ale také farmaceutických přípravků (Yang, 2020). Myrcen je významný pro své analgetické, sedativní, antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální a protinádorové účinky (Surendran, 2021).



Obrázek 6 - Chemická struktura β -myrcenu (Pellati, 2018).

2.2.2 Seskviterpeny

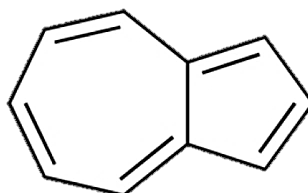
Seskviterpeny se řadí mezi terpeny, jejichž molekuly obsahují 15 uhlíků a skládají se ze tří izoprenových jednotek (Chen, 2011). Jsou to bezbarvé sloučeniny lipofilního charakteru. Jejich biosyntéza probíhá v rostlinách prostřednictvím FPP (farnesylpyrofosfátu) v endoplazmatickém retikulu (Chadwick, 2013). Seskviterpeny se řadí, stejně jako monoterpeny, mezi sekundární metabolity především vyšších rostlin, ale i hub nebo bezobratlých. Mohou být cyklické nebo alifatické, z nichž nejfunkčnější jsou právě cyklické formy (Chadwick, 2013, Bártíková, 2014). Nejvyšší zastoupení seskviterpenů se nachází u rostlin z čeledi *Cactaceae* (kaktusovitě), *Euphorbiaceae* (praskyřovitě), *Araceae* (áronovitě), *Solanaceae* (lilkovitě). V naprosté většině však převládají u rostlin z čeledi *Asteraceae*, což jsou hvězdicovité rostliny a představují významnou část suché hmotnosti u těchto zmíněných rostlin. Seskviterpeny se typicky nacházejí ve specializovaných sekrečních buňkách produkujících latex, a to zejména u většiny hvězdicovitých rostlin, ale lze je nalézt také například ve vakuolách jiných buněk rostliny, a to konkrétně v případě, když jsou produkovány v reakci na biotický stres (Chadwick, 2013).

Seskviterpeny jsou významné nejen jako atraktanty, či odpuzovače hmyzu, nebo pro důležitost přežití rostliny, ale vyznačují se četnými biologickými účinky. Mezi takové účinky patří například protinádorová, protizánětlivá, antimikrobiální, analgetická, antifugální, antimigrenózní nebo protivředová aktivita (Ren, 2016, Chadwick, 2013). Také bylo zjištěno, že by seskviterpeny mohly být nápomocné při léčbě kardiovaskulárních chorob, nádorových onemocnění nebo pro prevenci neurodegenerace. Kardiovaskulární účinky jsou výsledkem schopnosti seskviterpenů relaxovat tkáň hladkého svalstva inhibicí iNOS (indukovatelné NO-syntázy) a následným zvýšením hladin NO (oxidu dusnatého). Obecně se předpokládá, že příčinou tohoto účinku je inhibice NF- κ B (nukleárního faktoru kappa B). Některé seskviterpeny navíc chrání žaludeční výstelku před nepříjemným vznikem vředů (Chadwick, 2013).

V současné době si rostoucí pozornost získávají především seskviterpenové laktony (SL). SL tvoří rozmanitou skupinu chemických látek co se týče struktury. Liší se zejména počtem a velikostí uhlovodíkových kruhů. Jeden kruh je obvykle laktonový. Jsou to sekundární metabolity odvozené od seskviterpenů a nacházejí se především u planě rostoucích rostlin z čeledi *Apiaceae* (miříkovité), *Asteraceae* (hvězdicovité), ale byly také izolovány i u rostlin z čeledi *Magnoliaceae* (šácholanovité), *Lauraceae* (vavřínovité), a *Rutaceae* (routovité). SL mohou být přítomny ve všech částech rostliny, a to v různých koncentracích. Pro rostlinu plní obrannou funkci tím, že odpuzují hmyz díky jejich hořké chuti. SL se také vyznačují velkým množstvím biologických účinků. Mezi tyto účinky patří antimikrobiální, cytotoxická, antifugální, antiprotozoální nebo imunomodulační aktivita. Mezi biologicky nejvýznamnější seskviterpenové laktony patří například thapsigargin, cynaropikrin, parthenolid a artemisinin (Peterková, 2019).

2.2.2.1 Azuleny

Azuleny jsou bicyklické aromatické uhlovodíky, izomerní s naftalenem, a řadí se mezi seskviterpeny. π -elektrony azulenů jsou polarizovány směrem k pětičlennému prstenci, což má za následek relativně velký vlastní dipólový moment, a proto mají azuleny typicky tmavě modrou barvu (Dunás, 2020). Azuleny se vyskytují zejména u éterických olejů heřmánku pravého nebo čekanky obecné. Azulensulfonát sodný je ve vodě rozpustný derivát azulenu, který se nachází u heřmánku pravého z čeledi *Asteraceae* (hvězdicovité). Azulensulfonát sodný se klinicky využívá jako terapeutické činidlo při léčbě faryngitidy, ale také u jiných zánětlivých onemocnění, jako je například tonzilitida, žaludeční vředy, stomatitida nebo konjunktivitida. Guiaiazulen je lipofilní derivát azulenu a ten vykazuje nejenom protizánětlivý účinek, ale také antioxidační účinek (Sakai, 2005). Deriváty azulenu našly využití v lékařství, a to zejména ve formě protivředových, antidiabetických a protinádorových léčivých látek (Dunás, 2020).

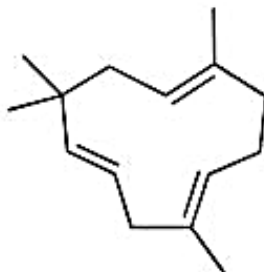


Obrázek 7 - Chemická struktura azulenu (Wang, 2003)

2.2.2.2 Humulen

Humulen (α -humulen) je cyklický seskviterpen, který se vyskytuje u široké škály rostlin (Sales, 2020). Nachází se v konopí, chmelu, ženšenu nebo šalvěji (Heblinski, 2020, Połec, 2021). Humulen a jiné přírodní produkty odvozené od humulemu se vyznačují biologickou aktivitou. Mezi takové aktivity patří, protizánětlivé, antimikrobiální, cytotoxické, antioxidační a protinádorové účinky. Nejlepší protinádorový účinek vykazují proti buňkám lidského adenokarcinomu plic (A549) a buňkám lidského adenokarcinomu tračnicku (Trost, 2012, Coté, 2017).

Ve studii Yeo a kol. (2021) bylo zjištěno, že α -humulen, hlavní složka mnoha rostlin používaná pro přípravu parfémů, má ochrannou roli proti poškození žaludku *in vivo* a *in vitro*. K testování ochranného účinku α -humulenu byl použit potkaní model gastritidy vyvolané HCl a ethanolem a lidské žírné buňky HMC-1. Bylo zjištěno, že α -humulen výrazně inhiboval žaludeční léze u gastritidy vyvolané HCl a ethanolem a také snižoval sekreci žaludeční šťávy u žaludečních vředů vyvolaných ligací pyloru *in vivo*. Kromě tohoto α -humulen snížil množství reaktivních forem kyslíku. α -humulen v buňkách HMC-1 snížil množství intracelulárního vápníku a zvýšil hladiny cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), což mělo za následek snížení hladiny histaminu (Yeo a kol., 2021).

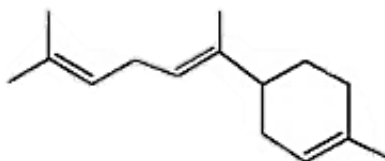


Obrázek 8 - Chemická struktura α -humulenu (Trost, 2012)

2.2.2.3 Bisabolem

Bisabolem je jednoduchý monocyklický seskviterpen, který se běžně vyskytuje v přírodních rostlinných éterických olejích, například v zázvoru lékařském (Jou, 2016). Zázvor je schopen vykazovat antioxidační vlastnosti, má kardioprotektivní, hypolipidemické, protinádorové, protizánětlivé účinky, posiluje přirozenou obranyschopnost organismu, nebo je také schopen tlámit bolest kloubů (Ibáñez, 2019). Má tři strukturní izomery, a to konkrétně α -bisabolen, β -bisabolen a γ -bisabolen, ale každý izomer má výrazně odlišné vlastnosti a využití. Bisaboleny se z rostlin izolují především přímou extrakcí. Tato metoda má však mnoho nevýhod, jako je třeba omezený zdroj

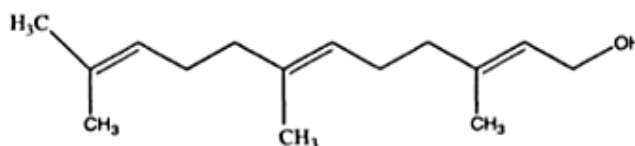
suroviny, nízký výtěžek nebo komplikované kroky separace. Rostlinné bisaboleny jsou hojně využívány v kosmetickém, farmaceutickém, chemickém a nutraceutickém průmyslu. Tradičně se využívá jako vysoce hodnotná vůně v kosmetickém průmyslu, protože má velice příjemné ovocné a balzamické aroma. Například β -bisabolen voní podobně jako sezamový olej, a tak je používán k dochucování potravin. Kromě toho je bisabolen velkým přínosem pro lékařskou komunitu, protože vykazuje protizánětlivé a protinádorové účinky (Zhao, 2021).



Obrázek 9 - Chemická struktura bisabolenu (Phulara, 2016)

2.2.2.4 Farnesol

Farnesol je acyklický seskviterpenový alkohol, který se převážně vyskytuje v éterických olejích různých přírodních rostlin. Přirozeně se farnesol vyskytuje například v éterických olejích citronové trávy, jasmínu, růže, bramboříku, pomerančových květů nebo lípy. Bylo prokázáno, že vykazuje četné biologické účinky. Mezi tyto účinky patří zejména protizánětlivá a protinádorová aktivita. Indukuje apoptózu a snižuje buněčnou proliferaci a přežití buněk. Používá se například k léčbě alergického astmatu, cukrovky, aterosklerózy nebo hyperlipidémie a příznivě působí při otocích, glióze a tumorigenezi kůže (Jung, 2018).



Obrázek 10 - Chemická struktura farnesolu (Jin, 2010)

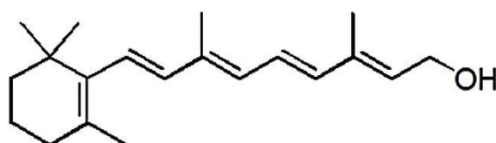
2.2.3 Diterpeny

Diterpeny jsou terpeny, které jsou odvozené od čtyř izoprenových jednotek, jejich molekula je složená z 20 uhlíků a jsou rozšířené po celé přírodě (Lozama, 2009). Lze je nalézt jak v rostlinách, tak i v houbách, u bakterií a zvířat ze suchozemského i mořského prostředí. Stejně jako monoterpeny a seskviterpeny, i diterpeny vykazují pozoruhodné biologické účinky. Mezi tyto biologické účinky patří protizánětlivé, antioxidační, kardioprotektivní a analgetické aktivity. U diterpenů byla také prokázána

cytotoxicita proti různým nádorovým buněčným liniím, dále inhibiční aktivita oxidu dusného a fytotoxická aktivita. Některé izolované diterpeny jsou v komerčním měřítku vyráběny například pro použití při syntéze vonných látek, nebo pro použití jako léčiva a potravinářská aditiva nebo v zemědělství (de Sousa, 2018).

2.2.3.1 Retinol (Vitamín A)

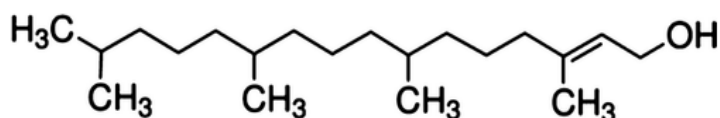
Retinol se díky své struktuře řadí mezi diterpeny. Patří do skupiny retinoidů a je jednou z přirozených forem vitamínu A, která je fyziologicky účinná (Khalil, 2017). Vitamín A (retinol) je vitamín, který je rozpustný v tucích a získává se jak z rostlinných, tak i živočišných zdrojů. (Olsen, 2020). Produkty živočišného původu jsou bohatým zdrojem vitamínu ve formě retinylesteru, zatímco zelenina a ovoce obsahují karotenoidy, z nichž většinu tvoří provitamín A. Jelikož je esenciální, lidské tělo není schopno si vitamín A vytvořit, a proto je nutné jej získávat ze stravy buď jako vitamín A, nebo ve formě provitamínu A (karotenoidů). Vitamín A hraje klíčovou roli ve správném fungování mnoha fyziologických funkcí. Lidský organismus dokáže metabolizovat přirozené formy vitamínu A a provitamínu A na biologicky aktivní formy (retinol, retinal, kyselina retinová), které interagují s jadernými receptory, nebo opsinem v sítnici (Carazo, 2021). Po absorpci je vitamín A transportován z buněk střevní sliznice společně s chylomikrony jako retinylester, buď do cílových tkání, nebo jater, kde může být uložen v jaterních hvězdicových buňkách. Mobilizace jaterních zásob vitamínu A nastává pouze v době nedostatečného příjmu potravy a retinylesterázy jsou hydrolyzovány za uvolnění retinolu, který je následně vázán na RBP4 a následně secernován do oběhu hepatocytů, kde se váže na další transportní protein, transthyretin. Jakmile je retinol absorbován cílovými buňkami, může být přeměněn buď na retinaldehyd, který je zásadní pro normální zrakovou funkci, nebo je dále oxidován na kyselinu retinovou. Ligandy pro jaderné receptory kyseliny retinové jsou důležité v procesu vývoje, růstu a samotného metabolismu (Olsen, 2020). Vitamín A má v těle pleiotropní funkce díky několika biologicky aktivním formám. Mezi tyto funkce je zahrnuto vidění ve tmě, vývoj rohovky a spojivky, buněčný růst a diferenciaci, fungování imunitního systému, vývoj kostí, plodu a centrálního nervového systému. Karotenoidy působí také jako antioxidanty (Carazo, 2021).



Obrázek 11 - Chemická struktura retinolu (O'Byrne, 2013)

2.2.3.2 Fytol

Fytol je acyklický diterpenový alkohol, který se nachází v éterických olejích některých aromatických rostlin (Silva, 2014). Fytol je také důležitou složkou chlorofylu. Bylo prokázáno, že vykazuje několik farmakologických vlastností, včetně protinádorových, antimikrobiálních, protikřečových, nebo protizánětlivých účinků (Carvalho, 2020, Silva, 2014). Ve studii Carvalho a kol. (2020) bylo zjištěno, že fytol je prospěšný zejména ve vztahu k léčbě bolestivých zánětlivých onemocnění. Mezi jedno z nejčastějších zánětlivých onemocnění se řadí artritida, která postihuje především synoviální membránu, chrupavku a kosti v kloubu. Klíčovou roli u artritidy hrají protizánětlivé cytokiny, jako je TNF- α a IL-6. Při této studii bylo zjištěno, že fytol byl schopen snižovat aktivitu MPO, uvolňovat prozánětlivé cytokiny v synoviální tekutině a zároveň snižoval produkci IL-6. Tudíž došlo ke zmírnění otoků kloubů po celou dobu léčby (Carvalho a kol., 2020).



Obrázek 12 - Chemická struktura fytolu (Silva, 2014)

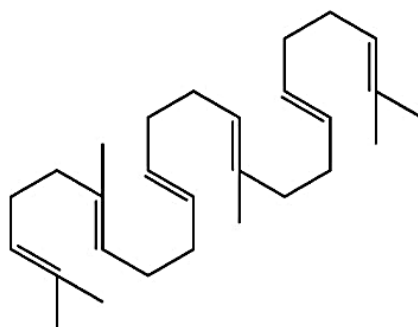
2.2.4 Triterpeny

Triterpeny se řadí mezi terpeny, které obsahují celkem 6 izoprenových jednotek a 30 atomů uhlíku. Mohou být tricyklické, tetracyklické, pentacyklické nebo alifatické. Většina triterpenů se vyskytuje jako sekundární metabolity u vyšších rostlin. Triterpeny jsou taktéž známy pro mnoho vynikajících fyziologických a farmakologických aktivit, včetně protizánětlivých, antivirových, protinádorových a antimikrobiálních účinků. V rámci protinádorových účinků jsou triterpeny schopny aktivovat apoptózu, inhibovat buněčnou proliferaci, invazi tumoru a sekreci matrixových metaloproteináz. Také hrají důležitou roli v procesu zmírnění a uklidňování nervového napětí, při regulaci krevního cukru a snižování krevního tlaku (Zhang, 2014).

2.2.4.1 Skvalen

Skvalen je z chemického hlediska nenasycený uhlovodík patřící mezi triterpeny a je tvořen šesti izoprenovými jednotkami. Lze ho ve vysokém množství nalézt v rybích olejích, zejména v oleji ze žraločích jater, a v relativně menších množstvích v některých rostlinných olejích, například v olivovém oleji. Skvalen se taktéž nachází v lidském sekretu mazových žláz, kde tvoří jednu z hlavních složek. Nenasycený derivát skvalenu se nazývá skvalan a nachází se také v těchto zdrojích. Skvalen i skvalan jsou považovány za důležité

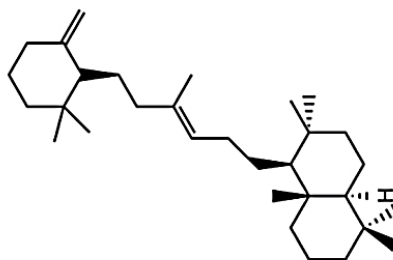
látky ve farmaceutickém, kosmetickém a nutraceutickém průmyslu a zároveň vykazují důležité biologické aktivity. Mezi tyto aktivity patří například protinádorové, antioxidační a detoxikační účinky. Skvalen je taktéž upřednostňován při péči o pleť, díky jeho hydratačním účinkům, protože se snadno vstřebává, aniž by vytvářel mastné zbytky (Kim, 2012). Ve studii Kim a kol. (2012) se předpokládá, že za přirozenou ochranou kůže stojí právě skvalen, který je jednou z hlavních složek lidské kůže. Lidská kůže je neustále vystavována vlivům prostředí, včetně ultrafialového záření prostřednictvím slunečního záření. V případě vystavení lidské kůže slunečnímu záření dochází k vyvolání procesu peroxidace lipidů ve vrstvě kůže, což vede k jejímu poškození. V této záležitosti se uvádí, že skvalen chrání lidskou pokožku před peroxidací lipidů způsobenou buď vystavením UV záření, nebo jiným oxidačním stresem (Kim a kol., 2012).



Obrázek 13 - Chemická struktura skvalenu (Borella, 2019)

2.2.4.2 Ambrein

Ambrein se řadí mezi triterpenové alkoholy a je hlavní složkou ambry, což je konkrétně vytvářený ve střevním traktu vorvaňů (Taha, 1998). Tento triterpenový alkohol je přírodním prekurzorem pro ambox, což je syntetická náhražka přírodní ambry. Ambra jako taková je známá již z dob antiky, kde byla používána jako parfém, nebo k léčbě migrénových bolestí hlavy, nachlazení a zácpy. Směsi nebo gely obsahující ambru jsou považovány za vynikající lék na nervové problémy a také jsou účinné při léčbě revmatismu, bolestí zad, výronů a namožení svalů. Protizánětlivá aktivita ambreinu je pravděpodobně způsobena inhibicí systémově uvolňovaného serotoninu. Ambrein má taktéž antikoagulační a antifibrinogenní potenciál (Taha, 1998).

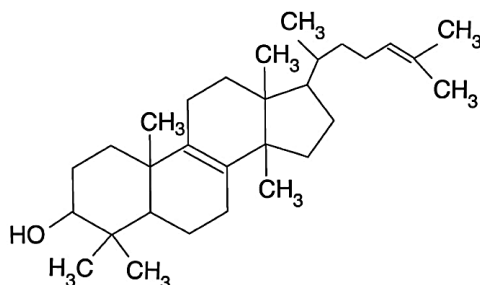


Obrázek 14 - Chemická struktura ambreinu (Ncube, 2020)

2.2.4.3 Lanosterol

Lanosterol je z chemického hlediska organická sloučenina, která patří mezi tetracyklické triterpeny. Lanosterol je prekurzorem pro syntézu sterolů, a tudíž se řadí mezi klíčové meziprodukty v biosyntéze cholesterolu. (Chen, 2015, Lee, 2016). Lanosterol je prvním sterolem v lipidové biosyntetické dráze, který je zpočátku přeměněn na acetyl-CoA. Komplexní proces syntézy lanosterolu zahrnuje několik enzymů, včetně 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, skvalenepoxidázy a lanosterolsyntázy (Shen, 2018).

Bylo prokázáno, že inhibice lanosterolsyntázy přispívá k zákalu čočky u potkanů, myší, psů a rozvoji vrozené katarakty (šedého zákalu) u lidí, a právě proto by lanosterol mohl být potenciálním lékem pro léčbu šedého zákalu (katarakty), protože by mohl zvrátit agregaci intrakrystalických proteinů (Pei, 2019, Shen, 2018). Za hlavní příčinu katarakty je považována právě agregace bílkovin mezi pravidelně uspořádanými krystaliny vláken čočky (Shanmugam, 2015). Ve studii Zhao a kol. (2015) bylo prokázáno zvrácení přirozeně se vyskytující neprůhlednosti čočky po ponoření a šestidenní inkubaci králičích čoček v roztoku lanosterolun (Zhao a kol., 2015). Naopak ve studii Shen a kol. (2018), kde byla použita lidská kontraktní jádra, nebylo po šestidenní inkubaci prokázáno žádné zvrácení neprůhlednosti (Shen a kol., 2018).



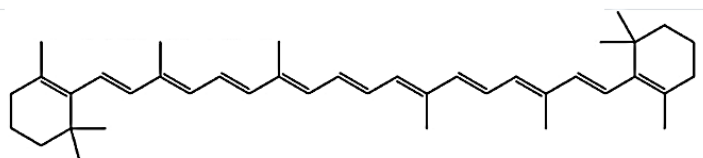
Obrázek 15 - Chemická struktura lanosterolu (Huster, 2005)

2.2.5 Tetraterpeny

Tetraterpeny se řadí mezi terpeny, které obsahují osm izoprenových jednotek a 40 atomů uhlíku. Tetraterpeny jsou také známy pod názvem karotenoidy. Nacházejí se v různých typech rostlin, hub, v bakteriích. Jsou zodpovědné především za červené, žluté, nebo oranžové zbarvení (Cox-Georgian, 2019). Mezi jejich biologické účinky patří antioxidační účinky a ochrana před reaktivními formami kyslíku, protinádorové, kardioprotektivní účinky a chrání oči před poškozením (Ninkuu, 2021).

2.2.5.1 Karotenoidy a karoteny

Karoteny a karotenoidy jsou cyklické tetraterpenové pigmenty. Většina z nich se skládá z osmi izoprenových jednotek a 40 atomů uhlíku a vykazují žluté, oranžové, červené, nebo fialové zbarvení. Karotenoidy jsou v přírodě nejrozšířenější pigmenty a jsou přítomny u fotosyntetických bakterií, hub, rostlin, ale i zvířat. Karotenoidy se dělí do dvou skupin, na karoteny a xantofyly. Mezi karoteny patří α -karoten, β -karoten, γ -karoten a lykopen. Mezi xantofyly patří β -kryptoxantin, lutein, zeaxanthin a astaxanthin (Maoka, 2014). Nejznámějším karotenem je β -karoten, který je prekurzorem vitamínu A (Tang, 2012). Karotenoidy mají antioxidační vlastnosti, dokáží předcházet kardiovaskulárním onemocněním a onemocněním očí, indukovat apoptózu a inhibují růst maligních nádorů, zároveň mohou modulovat genovou expresi a imunitní reakce (Milani, 2017).

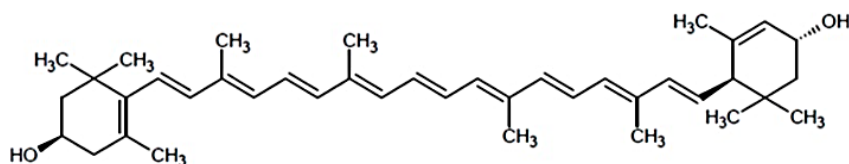


Obrázek 16 - Chemická struktura β -karotenu (Fleshman, 2012)

2.2.5.2 Lutein

Mezi tetraterpeny se řadí i lutein, který má charakteristicky žlutou barvu. Lutein, ale také jeho metabolit (optický izomer) zeaxanthin, jsou syntetizovány pouze ve fotosynteticky aktivních rostlinách. Jelikož lidé nejsou schopni syntetizovat lutein, tak jediným způsobem, jak zvýšit koncentrace luteinu v těle, je jeho příjem v potravě. Denní potřeba luteinu u lidí je zajištěna prostřednictvím karotenoidů. Dobrymi zdroji luteinu jsou zejména zelená listová zelenina (kapusta, petržel, salát, brokolice a špenát), žluté ovoce nebo zelenina (mango, dýně, broskve, kukuřice – téměř 70 % celkového obsahu karotenoidů v kukuřici připadá na lutein a zeaxantin), další zelenina a ořechy (hrách, pistácie, chřest). Dále se lutein nachází také ve vejcích, u ryb a koryšů. Lutein obvykle pochází z rostlinných zdrojů, a proto jsou tyto živočišné potraviny klasifikovány jako nepřímé zdroje (Bhat, 2020).

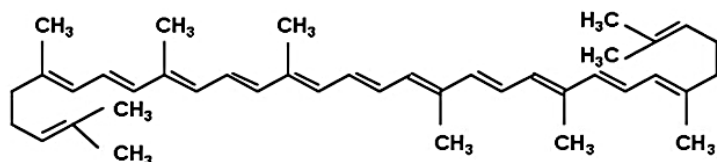
Strava bohatá na lutein může snížit rizikové faktory pro věkem podmíněnou makulární degeneraci (*macula lutea* – žlutá skvrna na sítnici), za kterou jsou zodpovědné reaktivní formy kyslíku (Bhat, 2020). Degradace makuly je hlavní příčinou slepoty a poškození zraku (Buscemi, 2018). Lutein hraje primární roli v ochraně sítnice oka před oxidativním poškozením způsobeným modrým světlem. Zároveň zlepšuje kognitivní funkce, snižuje riziko rakoviny a zlepšuje fungování kardiovaskulárního systému (Buscemi, 2018). Lutein také hraje roli i v prenatálním vývoji člověka a je zodpovědný za neurální vývoj (Bhat, 2020). Nolan a kol. (2014) uvádějí, že u pacientů s Alzheimerovou chorobou byl zaznamenán vyšší výskyt věkem podmíněné makulární degenerace, jelikož měli snížené hladiny makulárních pigmentů, což tedy poukazuje na pozitivní vliv luteinu na kognitivní funkce (Nolan a kol., 2014).



Obrázek 17 - Chemická struktura luteinu (Buscemi, 2018)

2.2.5.3 Lykopen

Lykopen je symetrický tetraterpen, který obsahuje osm izoprenových jednotek a jedenáct konjugovaných dvojných vazeb, je řazen mezi karotenoidy. Lykopen je rostlinný pigment rozpustný v tucích, který dodává ovoci nebo zelenině jejich červenou barvu, zejména je zodpovědný za červenou zralých rajčat a výrobků z rajčat (rajčatový protlak, kečup). Zároveň je rajčatová šťáva největším zdrojem lykopenu (Shimizu, 2018, Marzocco, 2021). Lykopen je termostabilní karotenoid a vařením nedochází k jeho poškození. Tepelné zpracování naopak zvyšuje jeho biologickou aktivitu, jelikož dochází k narušení buněčné membrány, což vede k úniku lykopenu z tkáňové matrice (Marzocco, 2021). Mnoho studií *in vitro* a *in vivo* ukázalo, že má protizánětlivé, protinádorové, kardioprotektivní a neuroprotektivní účinky. Je to silný antioxidant a dokáže ochránit organismus před reaktivními formami kyslíku. Jeho antioxidační aktivita je nejučinnější ze všech doposud identifikovaných přirozeně se vyskytujících karotenoidů. Protizánětlivé vlastnosti lykopenu mohou zabránit vzniku akutního zánětu plic a emfyzému. V důsledku toho je lykopen velmi žádaný jako potravinářská přísada. (Shimizu, 2018). Podle Cheng a kol. (2020) by podávání nižší dávky lykopenu mohlo inhibovat oxidační stres způsobený kouřením, a tak podporovat stabilitu genomu (Cheng a kol., 2020).



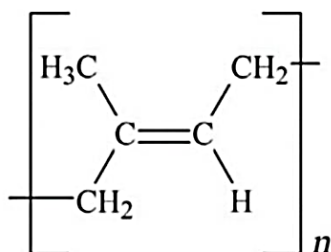
Obrázek 18 - Chemická struktura lykopenu (Zuorro, 2020)

2.2.6 Polyterpeny

Polyterpeny jsou polymerní sloučeniny, které jsou tvořeny více než osmi izoprenovými jednotkami a mohou mít dvě formy geometrického uspořádání. První skupinou jsou přírodní kaučuky, které obsahují izoprenové jednotky v cis-konfiguraci. Do druhé skupiny patří gutaperča, která obsahuje izoprenové jednotky v trans-konfiguraci (Mosquera, 2021).

2.2.6.1 Kaučuk

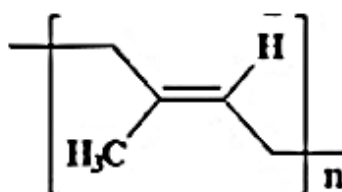
Kaučuk (cis-1,4-polyisopren) je jedním z nejdůležitějších polymerů, který je přirozeně produkován rostlinami. Je velmi důležitou surovinou používanou ve více než 40 000 výrobcích. Používá se také při výrobě zdravotnických prostředků. Jediným zdrojem je v současnosti přírodní surový kaučuk sklizený (latex) z brazilského kaučukovníku (*Hevea brasiliensis*). Především díky své molekulární struktuře a vysoké molekulové hmotnosti má tento kaučuk vysoce výkonné vlastnosti, které nelze snadno napodobit uměle vyrobenými polymery, jako jsou ty odvozené např. od bakteriálních polyhydroxyalkanoátů (PHA). Mezi tyto vysoce výkonné vlastnosti patří odolnost, elasticita, odolnost proti oděru, efektivní rozptyl tepla (minimalizace hromadění tepla při tření a odolnost proti nárazu). Jedním z latexových výrobků používaných ve zdravotnických zařízeních jsou lékařské gumové rukavice. Takto vyrobené rukavice musí dobře padnout, jsou odolné vůči poškození, umožňují zachovat jemný hmatový vjem a poskytují účinnou bariéru vůči nežádoucím patogenům (Mooibroek, 2000).



Obrázek 19 - Chemická struktura přírodního kaučuku (Fazlí, 2020)

2.2.6.2 Gutaperča

Gutaperča (trans-1,4-polyisopren) je trans-izomer polyizoprenu a její struktura se podobá struktuře přírodního kaučuku. Gutaperča (GP) je průhledná koagulovitá míza, která se nachází u stromů rodu *Palaquium*, zejména u druhů *Palaquium gutta* (perčovník pravý), *Palaquium obovatum* a *Palaquium polyanthum*. Tyto stromy se vyskytují hlavně v jihovýchodní Asii na Malajském souostroví, Singapuru, Indonésii, Sumatře, Filipínách, ale také v Jižní Americe. Dorůstají do výšky přibližně 30 metrů a kmeny mají v průměru 1 metr. V minulosti se GP používala například v průmyslu jako vynikající izolant elektrických kabelů. Do dnešní doby je však gutaperča stále využívána v zubním lékařství. Používá se totiž jako zlatý standard pro výplně kořenových zubních kanálků. Důležitým aspektem materiálu pro výplň kořenového kanálku je jeho nepropustnost pro tekutinu. Toto kritérium z dlouhodobého hlediska splňuje právě GP. Jelikož neustále probíhá výzkum novějších endodontických materiálů, aby byly získány lepší materiály než ty stávající, které splňují biologické požadavky spolu s předvídatelným dlouhodobým výsledkem. Pro vyplnění kořenového kanálku bylo vyzkoušeno a otestováno mnoho materiálů, ale ze všech testovaných materiálů obstála nejlépe GP. V současné době nelze uvažovat o žádném jiném materiálu jako o možné náhradě GP. Proto lze GP považovat za zlatý standardní materiál pro obturaci (Vishwanath, 2019).



Obrázek 20 - Chemická struktura gutaperči (Qingtao, 2014)

2.3 Biologická aktivita terpenů

Terpeny vynikají širokou škálou biologických aktivit a mají také mnoho léčebných účinků. Mezi tyto aktivity se řadí například antimikrobiální, protinádorové, antifungální, antivirové, protizánětlivé a psychoaktivní vlastnosti. K nejběžnějším zdrojům přírodních léčivých terpenů se řadí například konopí nebo tea tree olej, který se používá zejména při léčbě kožních infekcí. Terpeny pocházející z konopí mají psychoaktivní vlastnosti, tiší bolest, úzkost, deprese a vedlejší účinky chemoterapie, jako je například nevolnost. Zároveň jsou známé také jako léky proti demenci, protože zvyšují cholinergní aktivitu prostřednictvím inhibice cholinesterázy (Cox-Georgian, 2019).

2.3.1 Antimikrobiální účinky

Éterické oleje rostlin jsou již po staletí používány k nejrůznějším účelům, od léčby infekčních onemocnění, přes konzervaci potravin až po výrobu parfémů. Jelikož v současné době vzrůstá rezistence mikroorganismů na aktuálně používaná léčiva, je vyžadován vývoj nových, účinnějších léků, tak právě rostliny představují unikátní obnovitelný zdroj pro objev nových antimikrobiálních sloučenin (Sakkas, 2017). Je známo, že éterické oleje mají vynikající antimikrobiální vlastnosti. Jelikož jsou terpeny složky odvozené od éterických olejů, tak existuje mnoho terpenů, které jsou aktivní proti široké škále mikroorganismů, včetně grampozitivních i gramnegativních bakterií a hub (Solórzano-Santos, 2012). Éterické oleje inhibují růst mikrobiálních kmenů, které jsou odolné vůči antibiotikům (Tariq, 2019).

Antimikrobiální aktivitu lze přičíst zejména monoterpenům a seskviterpenům. Principem jejich antimikrobiální aktivity je fakt, že se tyto terpeny budou v důsledku jejich lipofilního charakteru přednostně rozdělovat z vodné fáze do membránových struktur mikroorganismů. To má za následek celkové zvětšení membrány, zvýšenou fluiditu a permeabilitu. Tím pádem dochází k narušení membránově uložených proteinů, inhibici dýchání a změně procesu transportu iontů. Monoterpeny vykazující antimikrobiální aktivitu proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli* nebo grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* jsou například mentol, thymol a linalylacetát. U těchto zmíněných monoterpenů byla schopnost poškozovat biomembrány hodnocena pomocí sledování uvolňování rozpustného fluorescenčního markeru CF z unilamelárních vezikul. Bylo prokázáno, že každý z těchto monoterpenů inhibuje růst obou mikrobiálních kmenů. Mentol byl nejtoxičtější vůči *E. coli* (Trombetta, 2005).

Sakkas a kol. (2017) zkoumali antimikrobiální účinek éterických olejů z bazalky, oregana a tymiánu. Nejvýraznější antimikrobiální účinky éterických olejů z oregana a bazalky byly namířeny proti bakterii *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7 a *Bacillus cereus*. Éterický olej z tymiánu vykazoval antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* (Sakkas a kol., 2017). Rivas da Silva a kol. (2012) zjistili, že α - a β -pineny také vykazují antimikrobiální aktivitu. Oba optické izomery byly vysoce toxické pro *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus oryzae* a MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) Tyto izomery byly vysoce toxické zejména pro *Candida albicans*, protože během 60 minut usmrtily 100 % inokula. Naopak u MRSA se antimikrobiální účinek objevil až po 60 hodinách (Rivas da Silva a kol., 2012).

Karvakrol má specifické účinky na inhibici růstu *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Perilový olej potlačuje expresi α -toxinu, stafylokokového enterotoxinu A a B a toxinu syndromu toxického šoku. Geraniol vykazuje dobrou aktivitu při modulaci lékové rezistence u několika gramnegativních druhů. Éterické oleje by mohly také působit jako biokonzervační látky, snižovat nebo eliminovat patogenní bakterie a zvyšovat tak celkovou kvalitu živočišných a rostlinných potravinových produktů (Solórzano-Santos, 2012).

2.3.2 Protizánětlivé účinky

Zánět je komplexní biologická reakce organismu na škodlivé podněty, jako jsou rány, infekce, patogeny a další cizí látky. Zánět se vyznačuje nadprodukcí zánětlivých cytokinů, které zahrnují interleukin-1 β (IL-1 β) a tumor nekrotizující faktor-alfa (TNF- α) (Del Prado-Audelo, 2021). Ústřední roli v mnoha různých imunopatologických reakcích hrají makrofágy. Důležitou roli hraje také několik buněčných procesů včetně oxidačního a autofagie (Kim, 2020). Reaktivní formy kyslíku regulují uvolňování IL-1 β (Warnatsch, 2017). Pro potlačení zánětu jsou používány synteticky vyrobené protizánětlivé sloučeniny, s jejich aplikací však běžně souvisí vedlejší účinky. Z tohoto důvodu byly testovány přírodní látky jako bezpečná alternativa. Obecný účinek terpenů v léčbě zánětlivých onemocnění spočívá ve snížení exprese cytokinů. Například některé terpeny (D-limonen, terpinolen, borneol a linalool) mohou snížit expresi TNF- α , IL-1 a IL-6 (Del Prado-Audelo, 2021).

Výborné protizánětlivé účinky má také například mentol, který chladí, tiší bolest a pomáhá při hojení ran. Mentol vyvolává vlivem lokálního dráždění receptorů pocit chladu, díky čemuž je možné překrýt příznaky zánětu, jako je například svědění nebo zarudnutí (Pierer, 2002). Rozza a kol. (2021) zkoumali potenciál mentolu při hojení kožních ran na modelech krys a také mechanismy podílející se na jeho účinku po 3, 7 a 14 dnech léčby. Mentolový krém urychlil úlevu od zánětlivé reakce již po 3 dnech snížením exprese zánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6. Po 7 dnech se kromě snížení hladin zánětlivých cytokinů zvýšila aktivita antioxidantních enzymů (SOD, GSH). Po 14 dnech byla zvýšená hladina IL-10, který inhibuje tvorbu cytokinů a reguluje zánětlivou odpověď (Rozza a kol., 2021). Rogerio a kol. (2009) uvádí, že α -humulen vykazuje terapeutické účinky u modelu alergického zánětu dýchacích cest. Bylo zjištěno, že α -humulen podávaný perorálně nebo inhalačně vykazoval výrazné protizánětlivé vlastnosti u tohoto modelu. Účinek α -humulen spočíval v tom, že došlo k výraznému snížení zánětlivých mediátorů, exprese adhezních molekul a aktivaci transkripčních faktorů (Rogerio a kol., 2009).

2.3.3 Protinádorové účinky

Terpeny jsou také široce uznávány pro svou protinádorovou aktivitu (Cox-Georgian, 2019). Nádorová onemocnění jsou celosvětově jedním z hlavních problémů veřejného zdraví. Mnoho protinádorových léků, které se klinicky používají, bylo izolováno z rostlinných druhů. Protinádorová aktivita byla odhalena například u monoterpenů rostlinného původu (Sobral, 2014). Protinádorová aktivita byla prokázána také u seskviterpenů a diterpenů. Mezi terpeny, které vykazují cytotoxické účinky na rakovinné buňky, patří zejména limonen, thymochinon, skvalen, farnaesol, bisabolen, kafr, β -myrcen, pinen, geranidol, thymol nebo perilový olej (Sobral, 2014, Cox-Georgian, 2019).

Terpeny mohou ovlivňovat vznik nebo průběh nádorového onemocnění pomocí různých mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří například inhibice syntézy ubichinonu a konverze lathosterolu na cholesterol, jelikož jak ubichinon, tak i cholesterol jsou látky nezbytné při procesu dělení buněk. Proto jejich snížené koncentrace mohou vést k inhibici nádorového bujení. Mezi terpeny inhibující syntézu ubichinonu patří limonen nebo perilový olej. Urychlení degradace či zpomalení biosyntézy enzymu mevalonátového metabolismu HMGR může taktéž inhibovat nádorové bujení. Mezi terpeny ovlivňující daný enzym patří geraniol, limonen. Dalšími mechanismy, které ovlivňují vznik nebo průběh nádorového onemocnění, jsou stimulace apoptózy, která se spouští, pokud je poškozena buněčná DNA, zvýšení aktivity jaterních enzymů, které slouží k detoxikaci organismu (za zvýšení aktivity jaterních enzymů je zodpovědná například glutathion-S-transferáza) a ovlivnění exprese genů přímo v tumoru. Limonen a perilový olej mohou zvyšovat hladinu růstového faktoru TGF- β 1, který inhibuje růst buněk rakoviny prsu a receptor M6P/IGF II (Dvořáková, 2011).

2.3.3.1 Protinádorové účinky monoterpenů

Monoterpenové éterické oleje obsahují velké množství bioaktivních sloučenin, které jsou cytotoxické vůči specifickým nádorovým buněčným liniím, a tím pádem mají velký potenciál působit jako hlavní látka pro vývoj nových protinádorových léčiv. Éterický olej izolovaný z listů *Tabernaemontana corymbosa* je cytotoxický vůči buněčné linii HepG2 (Prakash, 2018). Éterický olej získaný z listů rostliny *Xylopija langsdorffiana*, jejíž hlavní složkou je α -pinen a limonen, vykazuje cytotoxické účinky vůči nádorové linii K562 (Moura, 2016). Cytotoxický účinek vykazoval taktéž éterický olej z plodů a kůry *Rothmannia wittii*, který obsahuje 10-O-acetylmakrofylid, vůči nádorové linii NCI-H187. Éterický olej extrahovaný z *Plectranthus hadiensis* (Rýmovník), jehož hlavní složky jsou

geraniol, geranylacetát a nerol, vykazuje cytotoxický účinek proti buněčné linii HCT-5 (Prakash, 2018).

2.3.3.2 Protinádorové účinky seskviterpenů

Seskviterpeny se hojně vyskytují u vyšších rostlin a jejich prekurzorová molekula je farnesylpyrofosfát (Prakash, 2018). Joo a kol. (2010) uvádějí, že jedním z nejvýznamnějších seskviterpenů vykazujících protinádorový účinek je farnesol. Zjistili, že farnesol je účinným aktivátorem zástavy buněčného cyklu a apoptózy u různých typů rakovinných buněk. Na těchto procesech se podílí řada různých biochemických a buněčných procesů. Mezi tyto procesy patří například regulace HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductáza) a CCT α (fosfocholin cytidyltransferáza α). U jiných typů buněk je účinek farnesolu zprostředkován prostřednictvím nukleárních receptorů – aktivace FXR (farnesoidního X receptoru) a PPAR (receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem). Farnesol navíc indukuje aktivaci signální dráhy NF- κ B a řady cílových genů NF- κ B. U většiny typů buněk, včetně plicního adenokarcinomu, hepatomu, melanomu, lymfoblastické leukémie, kolorektálního karcinomu a adenokarcinomu slinivky břišní, farnesol vyvolával zástavu buněčného cyklu na úrovni GO/G1 (Joo a kol., 2010). Podle Jou a kol. bylo zjištěno, že významným seskviterpenem s protinádorovými účinky je také γ -bisabolen γ -bisabolen vykazuje protinádorové účinky proti buňkám lidského neuroblastomu (TE671). Neuroblastom je nádor nervových progenitorových buněk, který široce metastazuje do kůže, kostní dřevě, jater nebo nesousedících lymfatických uzlin. Bylo prokázáno, že γ -bisabolen indukoval aktivaci kapsáz 3, 8 a 9, snížil potenciál mitochondriální membrány při apoptóze lidských neuroblastových buněk a zvýšil fosforylaci proteinu p53 (Jou a kol., 2016). Seskviterpen α -santalol, který je přítomný v éterickém oleji ze santalového dřeva, vykazuje cytotoxický účinek vůči buněčné linii MCF7 indukci apoptózy. Seskviterpen hoensieremon, který je extrahován z kořenů *Drypetes Congestiflora*, je cytotoxicky aktivní vůči buněčným liniím A549 a B16F10. α -cadinol, který je izolován z *Abies nefrolepis*, vykazuje cytotoxický účinek na buňky A549 a Colo-205. Caesalpinon A, který je izolovaný z lusků *Caesalpinia spinosa*, vykazuje inhibiční účinek proti buňkám HL-60, SW-480, SMMC-7721, A549 a MCF7 (Prakash, 2018).

2.3.3.3 Protinádorové účinky diterpenů

Diterpeny se vyskytují u mnoha rostlinných, ale i živočišných druhů. Asperolid A, který se vyskytuje u mořských živočichů, inhibuje buněčný cyklus na úrovni G2/M fáze

u buněk NCI-H460. Diterpen s názvem clerodane, který byl izolován ze semen *Polyalthia cerasoides*, vykazuje antiproliferační účinek vůči buněčné linii CACO-2. Salyunnanin, diterpen extrahovaný z kořenů šalvěže, vykazuje cytotoxický účinek vůči buněčným liniím HeLa, MCF7, NCI-H460 a K562. Perovskiaol vykazuje cytotoxický účinek vůči buněčným liniím NB4, hepG2 a A549 (Prakash, 2018).

2.3.3.4 Protinádorové účinky triterpenů

Protinádorové účinky lze nalézt i u triterpenů. Kim a kol. (2012) uvádějí, že jedním z nejvýznamnějších triterpenoidů vykazujících protinádorový účinek je skvalen. Zde byl studován potenciální vliv skvalenu proti vzniku nádorového onemocnění. Jelikož olej ze žraločích jater obsahuje více než 40 % skvalenu, zatímco žraločí játra tvoří 20–25 % jeho celkové tělesné hmotnosti, jsou žraloci považováni za nejbohatší zdroj skvalenu. Konkrétně byla studována možná spojitost mezi vysokým množstvím skvalenu a nepřítomností nádorových onemocnění u žraloků. A zároveň byl naznačen možný vztah mezi nízkým výskytem rakoviny a konzumací produktu s vysokým obsahem olivového oleje, který také obsahuje vysoké množství skvalenu. Bylo zjištěno, že při léčbě protinádorovými léky ve spojení se skvalenem na různých experimentálních modelech bylo pozorováno zastavení růstu nádoru (Kim a kol, 2012). Protinádorové účinky mají i další triterpeny, například lupeol, který byl izolován z listů a stonků *Dillenia indica*. Lupeol je cytotoxický vůči buněčným liniím HCT-116 a HepG2. Triterpeny alisol-B a alisol-B-23-acetát mají cytotoxickou aktivitu proti buňkám HepG2 a MCF7 (Prakash, 2018).

2.3.4 Antifungální účinky

Éterické oleje a jejich složky se používají proti široké škále patogenů. Extrakty esenciálních olejů z rostlin, jako jsou například citrusy, bazalka, fenykl, citronová tráva, oregano, rozmarýn nebo tymián, prokázaly významnou antifungální aktivitu proti široké škále patogenů. Antifungální aktivita éterických olejů extrahovaných z koření spočívá v inhibici expanze *Candida acutus*, *Candida albicans*, *Candida apicola*, *Candida catenulata*, *Candida inconspicua*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Trigonopsis variabilis* (Tariq, 2019). Antifungální aktivita éterických olejů může být způsobena vlastnostmi samotných terpenů / terpenoidů, které jsou schopné díky své lipofilní povaze a nízké molekulové schopnosti narušit buněčnou stěnu, způsobit buněčnou smrt nebo inhiovat sporulaci a klíčení (Nazzaro, 2017). Éterické oleje z oregana a tymiánu jsou jedny z nejlepších inhibitorů houbových patogenů, a to kvůli fenolickým

sloučeninám (karvakrolandthymol), což jsou hlavní složky, které narušují buněčné membrány hub (Tariq, 2019).

Mechanismem poškození buněčné stěny vlivem éterických olejů je inhibice chitinsyntázy v permeabilních hyfách. Buněčná stěna hub, která hraje důležitou roli v růstu a životaschopnosti buňky, má ve své struktuře chitin, glukán a manan. Chitin je nepostradatelný pro přežití buňky, a právě chitin je syntetizován pomocí reakce, která je katalyzována enzymem chitinsyntázou. Inhibice syntézy chitinu může negativně ovlivnit buněčnou stěnu, buněčné dělení i buněčný růst. Trans-anethol, což je hlavní složka anýzového oleje, prokázal antifungální aktivitu. Trans-anethol v závislosti na dávce inhiboval aktivitu chitinsyntázy v hyfách (Nazzaro, 2017). Některé éterické oleje mohou ovlivnit i mitochondriální činnost, a to inhibicí aktivity mitochondriálních dehydrogenáz (laktátdehydrogenáza, sukcinátdehydrogenáza), které se účastní biosyntézy ATP. Například éterický olej kopru vonného je schopen narušit v buňce cyklus kyseliny citrónové a inhibovat syntézu ATP (Chen, 2013).

Bona a kol. (2016) posuzovali citlivost 30-ti různých izolovaných kmenů *Candida albicans* na 12 vybraných éterických olejů, a to ve srovnání se třemi hlavními používanými léky proti kandidózám (klotrimazol, flukonazol a itrakonazol). *Candida albicans* je oportunní patogen, který je zodpovědný za většinu kvasinkových infekcí u lidí. 30 izolovaných kmenů bylo kultivováno na speciálních agarech pro kandidy. Použité éterické oleje pro tuto studii byly extrahovány například z čajovníku (tea tree olej), vavřínu, anýzu, bazalky, levandule, máty, oregana, grepfruitu, citroníku bergamotového, rozmarýnu, saturejky zimní a zázvoru. Ke stanovení citlivosti *Candida albicans* na éterické oleje byla použita disková difúzní metoda. Suspenze jednotlivých kmenů byly následně naneseny na misky s bramborovým dextrózovým agarem. Disk s příslušným éterickým olejem (10 μ l) byl umístěn na povrch agaru. Jako pozitivní kontrola byly použity disky s klotrimazolem, flukonazolem a itrakonazolem. Jako negativní kontrola byly použity disky s dimethylsulfoxidem. Misky byly poté inkubovány při 37°C po dobu 48 hodin. Test citlivosti na konkrétní éterický olej byl považován za pozitivní, pokud měl za následek vyšší inhibiční hodnotu, než jakou vyvolává klotrimazol. Poté byly provedeny analýzy pomocí elektronové mikroskopie, aby bylo vidět poškození buněk. V této studii bylo zjištěno, že éterické oleje máty, bazalky, levandule, čajovníku, saturejky a oregana inhibovaly růst i aktivitu *Candida albicans* účinněji než klotrimazol. Poškození vyvolaná esenciálními oleji na buněčné úrovni byla dokonce silnější než poškození způsobená klotrimazolem (Bona a kol., 2016).

Dichtl a kol. (2010) zkoumali potenciální roli seskviterpenů farnesolu jako antimykotika. Byl studován dopad *Aspergillus fumigatus* (kropidlák zakouřený) a bylo zjištěno, že růst *Aspergillus fumigatus* byl po ovlivnění farnesolem inhibován (Dichtl a kol., 2010). *Aspergillus fumigatus* je plíseň produkující spory, která dokáže způsobit široké spektrum lidských onemocnění, od alergické přecitlivělosti až po těžké infekce u lidí s oslabeným imunitním systémem (Bacher, 2014).

2.3.5 Antivirové účinky

Éterické oleje vykazují vedle antibakteriální aktivity také antivirovou aktivitu. Oleje, u kterých bylo prokázáno, že jsou virucidní, se skládaly hlavně z monoterpenů, jmenovitě karvonu, karveollimonenu, α - a β -pinenu, karyofylenu, α -terpineolu, kafru, β -ocimenu a seskviterpenů – germacreneu. Monoterpeny s nejvyšší virucidní aktivitou byly identifikovány jako α -pinen, β -pinen a α -terpineol (Solórzano-Santos, 2012). Éterické oleje s obsahem monoterpenů mají široké uplatnění při léčbě různých infekčních i neinfekčních onemocnění (Astani a kol. 2014). Éterické oleje mají antivirovou aktivitu proti mnoha RNA a DNA virům, jako je například virus herpes simplex typu 1 a typu 2 (HSV-1 a HSV-2), virus dengue typu 2, chřipkový virus typu 3, poliovirus a coxsackie virus B1 (Tariq, 2019).

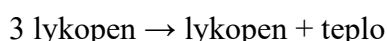
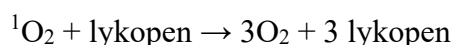
Astani a kol. (2014) zkoumali antivirovou aktivitu monoterpenů β -pinenu a limonenu proti viru herpes simplex typu 1 (HSV-1) *in vitro*. Virus HSV-1 se replikuje v buňkách v místě vstupu. Latentní virus se spontánně reaktivuje a u některých pacientů způsobuje časté, opakující se infekce a dochází k recidivám. Infekce virem HSV-1 jsou velmi časté a většinou postihují dospělé lidi. Ke zkrácení průběhu a snížení závažnosti klinických příznaků infekce lze používat antivirotika – acyklovir nebo famciklovir, které mohou samotný virus potlačit. Problémem je, že tato antivirotika mohou mít toxické vedlejší účinky, proto jsou hledány přírodní varianty antivirotik. Možným mechanismem protitherpetické aktivity monoterpenů β -pinenu a limonenu je narušení virového obalu, nebo snížená schopnost viru vstoupit do hostitelské buňky. Výsledkem této studie bylo, že β -pinen a limonen snížily virovou infekčnost skoro o 100 % (Astani a kol., 2014).

2.3.6 Antioxidační aktivita

Nepříznivé podmínky pro rostliny, jako jsou například extrémní teploty, sucho, nedostatek živin a vysoká salinita, generují vysoké koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou způsobit oxidační stres. Aby se tomu zabránilo, mají buňky rostlin komplexní antioxidační systém (Chaves, 2020). Vlivem vzniku volných radikálů a ROS

může docházet k poškození buněčných makromolekul. Toto oxidativní poškození je spjato s několika zdravotními problémy, jako je například stárnutí, nádorová onemocnění, diabetes mellitus, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba nebo ateroskleróza (Kaatoor, 2017, Chen, 2014, Poprac, 2017). Antioxidační aktivita terpenů je u lidí spojována s prevencí kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny (Chaves, 2020). Jedním z nejsilnějších antioxidantů vůbec je lykopen, řadící se mezi tetraterpeny, který dokáže ochránit organismus před reaktivními formami kyslíku (Shimizu, 2018).

Oxidační stres je způsoben zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku nebo dusíku, které nejsou dostatečně korigovány antioxidačními buněčnými systémy. Mezi tyto reaktivní formy patří například hydroxylový radikál, superoxid, peroxyinitrid, peroxy, peroxid vodíku, singletový kyslík a ozon. Tyto chemické sloučeniny vytváří nesčetné množství buněčných procesů, jako je zánět nebo ischemie. Nekontrolovatelná produkce těchto chemických látek může způsobit významné poškození buněk díky oxidaci buněčných biomolekul, jako je DNA, proteiny nebo lipidy a v důsledku tohoto by mohlo dojít k posílení procesů spojených s karcinogenezí, buněčnou transformací, rezistencí vůči apoptóze, metastázemi a poškozením DNA (mutace, genetická nestabilita). Lykopen, ale i další karotenoidy působí jako antioxidanty prostřednictvím různých mechanismů. Reaktivní formy kyslíku (například singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), který je vysoce reaktivní a který může oxidovat nukleové kyseliny, nenasycené mastné kyseliny nebo aminokyseliny) lze neutralizovat právě pomocí lykopenu podle následující reakce:



Větší množství energie, které lykopen při této reakci získal po dosažení tripletového stavu, je dodáno prostřednictvím vibračních a rotačních interakcí. Následně dochází k uvolnění tepla. Jakmile molekula lykopenu dosáhne svého základního stavu, může být neutralizován další $^1\text{O}_2$, čímž je zajištěna schopnost každé molekuly karotenoidů uhasit přibližně tisíc molekul $^1\text{O}_2$ (Marzocco, 2021).

Shimizu a kol. (2018) uvádějí, že lykopen je až 100krát účinnější antioxidant než vitamín E a 125krát účinnější než glutathion (GSH). V této studii je také uvedeno, že lykopen může být také užitečný pro zvyšování životaschopnosti buněk a buněčný růst a jako hepatoprotektivní činidlo pro snížení zvýšených hladin prozánětlivých cytokinů. Kromě toho lykopen také vykazuje silné neuroprotektivní, protizánětlivé a antiproliferativní účinky, pomáhá udržovat normální buněčný metabolismus a snižuje riziko chronických onemocnění,

jako jsou například kardiovaskulární onemocnění a nádorová onemocnění (Shimizu a kol., 2018).

Beynon a kol. (2019) uvádějí, že lykopen také pomáhá zlepšovat funkci prostaty a zároveň snižuje riziko vzniku rakoviny prostaty. Studie byla provedena u 128 mužů se zvýšenými hladinami PSA, u kterých ale ještě rakovina prostaty nebyla prokázána. U těchto mužů byl testován účinek spojený se šestiměsíčním užíváním lykopenu společně se zeleným čajem. Konzumace lykopenu společně se zeleným čajem byla pozorováním spojena se sníženým rizikem rakoviny prostaty, ale základní mechanismy nebyly ještě plně objasněny (Beynon a kol., 2019).

2.3.7 Terpeny jako antidepresivum

Deprese jsou vážným globálním zdravotním problémem, který přispívá k duševním a emočním poruchám lidí po celém světě. S rozvojem společnosti, nárůstu tlaku a dalších faktorů se v posledních letech neustále zvyšuje procento lidí trpících depresí (Ramsey, 2019, Zhang, 2021). Jelikož syntetické léky proti depresím mívají závažné vedlejší účinky, které mohou ovlivňovat výsledek léčby, jsou terpeny, jakožto přírodní látky, jedny z nejdůležitějších bioaktivních sloučenin pro léčbu depresí (Jawaid, 2011). Terpeny tvoří hlavní část extraktů léčivých rostlin, které vykazují antidepresivní, ale i antistresové účinky. Mezi tyto terpeny patří zejména β -pinen a linalool nacházející se například u květů levandule (Guzmán-Gutiérrez, 2012). K úlevě od depresí a ke zklidnění emocí celkově se může využívat právě levandulový éterický olej nebo éterický olej puškvorce trávolistého (Zhang, 2021).

Zhang a kol. (2021) udávají, že levandulové éterické oleje snadno pronikají do mozku přes hematoencefalickou bariéru a mají dobré antidepresivní účinky, jsou málo toxické a nemají tolik vedlejších účinků jako synteticky připravené léky (Zhang a kol., 2021). Guzmán-Gutiérrez a kol. (2012) zjistili, že terpeny (zejména β -pinen a linalool) v éterických olejích působí na 5HT_{1A} receptory serotonergní dráhy. Serotonin jsou důležité v tom, že hladiny jejich uvolňování a zpětného vychytávání mohou být změněny za účelem překonání stresu, β -pinen zároveň interaguje s dopaminergními receptory, což je mechanismus, kterým se řídí většina syntetických antidepresiv dostupných na trhu (Guzmán-Gutiérrez a kol., 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a pomůcky

- Laminární biohazard box třídy II ESCO BSC – ESCO, Singapur
- Světelný mikroskop Primo Vert – Carl Zeiss, Německo
- CO₂ inkubátor Memmert INC 108 – Memmert, Německo
- Přístroj Beckman Coulter Counter – Beckman Coulter, USA
- Vodní lázeň Precision GP 05 – Thermo Scientific, USA
- Centrifuga Universal 320 R– Hettich, Německo
- Přístroj xCELLigence RTCA SP – Roche, Švýcarsko
- Spektrofotometr Tecan Infinite 200 – Tecan, Švýcarsko
- Software GraphPad QuickCalcs – GraphPad Software, USA
- Software Microsoft Excel 2016 – Microsoft, USA
- Software Tecan i-control, 1.12.4.0
- RTCA software 1.2.1.1002

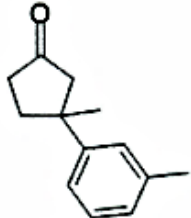
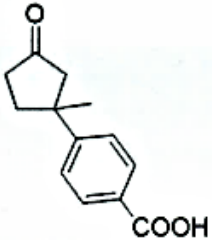
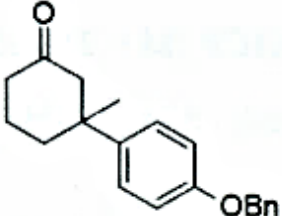
Další pomůcky: Pasteurovy pipety, automatický pipetor, centrifugační zkumavky, sérologické pipety o objemech 10 a 25 ml, 96-jamkové destičky, kultivační misky, sterilní špičky na pipety, multikanálové pipety, mikrozukavky Eppendorf, zkumavky pro počítání buněk na přístroji Beckman Coulter.

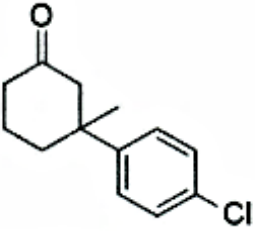
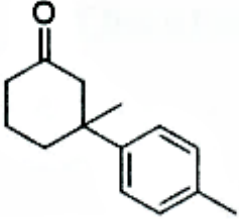
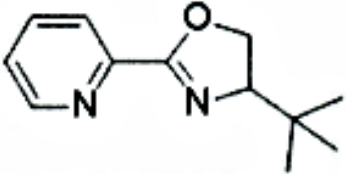
3.2 Použité chemikálie a roztoky

- Fetální bovinní sérum (FBS) – Thermo Fisher Scientific, USA
- Trypsin – Thermo Fisher Scientific, USA
- L-glutamin – Thermo Fisher Scientific, USA
- Pyruvát sodný – Thermo Fisher Scientific, USA
- HEPES – Thermo Fisher Scientific, USA
- Insulin – Thermo Fisher Scientific, USA
- Antibiotika = penicilin/streptomycin – Thermo Fisher Scientific, USA
- Minimum essential medium Alpha (MEM Alpha) – Life Technologies, USA
- Minimum essential medium Eagle (MEM Eagle) – Sigma Aldrich, USA
- EMEM – Lonza, USA
- Ultračistá destilovaná voda – Lonza, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO) – Carl Roth GmbH, Německo

- Fosfátový pufr (DPBS) – Life Technologies, USA
- Cisplatina – Thermo Fisher Scientific, USA
- XTT labeling reagent – Roche Diagnostic GmbH, Německo
- Electron-coupling reagent (ECR) – Roche Diagnostic GmbH, Německo
- 70% ethanol
- Izoton II
- Testované terpenoidy (viz Tabulka 1) – Ústav organické chemie a technologie, Univerzita Pardubice

Tabulka 1 - Přehled testovaných terpenoidů

Označení terpenoidu	Vzorec
3-Me	 $C_{13}H_{16}O$ M.H. = 188,27
4-COOHCP	 $C_{13}H_{14}O_3$ M.H. = 218,25
4-OBn	 $C_{20}H_{22}O_2$ M.H. = 294,39

4-Cl	 $C_{13}H_{15}ClO$ M.H. = 222,71
4-Me	 $C_{14}H_{18}O$ M.H. = 202,29
PyOx	 $C_{12}H_{16}N_2O$ M.H. = 204,27

3.2.1 Příprava médií

Kultivační médium pro buněčnou linii MCF7 bylo připraveno z MEM Alpha média. Do tohoto média bylo postupně přidáno 10% FBS a 500 μ l penicilinu/streptomycinu na 100 ml roztoku.

Kultivační médium pro buněčnou linii A549 bylo připraveno z MEM Eagle média. Do tohoto média bylo postupně přidáno 10% FBS, L-glutamin, pyruvát sodný a HEPES v množství 1 ml na 100 ml roztoku a dále penicilin/streptomycin v množství 500 μ l na 100 ml roztoku.

Roztok PBS byl připraven pomocí zředění koncentrovaného DPBS ultračistou destilovanou vodou, a to v poměru 1:10.

Pro přípravu inaktivačního média bylo použito EMEM médium v kombinaci s FBS. Na přípravu 100 ml inaktivačního média bylo použito 80 ml EMEM média a 20 ml FBS.

3.2.2 Příprava koncentrační řady terpenoidů

Požadované koncentrace terpenoidů pro stanovení jejich cytotoxicity pomocí XTT testu byly připraveny ze zásobních roztoků testovaných terpenoidů o koncentraci 50 mM. Zásobní roztoky, které byly použity pro XTT test, byly ředěny ultračistou destilovanou vodou podle této tabulky 2.

Tabulka 2 - Ředění zásobních roztoků terpenoidů pro XTT test

Výsledná koncentrace (μM)	Objem terpenoidu	Objem vody (μl)	Celkový objem (μl)
50	8 μl ($c = 50 \text{ mM}$)	392	400
20	80 μl (z roztoku o $c = 50 \mu\text{M}$)	120	200
10	100 μl (z roztoku o $c = 20 \mu\text{M}$)	100	200
5	100 μl (z roztoku o $c = 10 \mu\text{M}$)	100	200
1	20 μl (z roztoku o $c = 5 \mu\text{M}$)	80	100

3.3 Použité buněčné linie

Pro zhodnocení cytotoxicity nově syntetizovaných terpenoidů byly použity dva druhy buněčných linií. Prvním použitým typem byla buněčná linie MCF7. Konkrétně se jedná o adherentní linii buněk lidského adenokarcinomu prsu. Buněčná linie MCF7 byla použita do 10. pasáže. Druhým použitým typem byla buněčná linie A549. V tomto případě se jedná o adherentní linii buněk lidského adenokarcinomu plic. Tato buněčná linie byla použita do 13. pasáže. Tyto buněčné linie pocházejí z Evropské sbírky buněčných kultur (ECACC).

3.3.1 Rozmrazení buněk

Nejprve byly do 15 ml centrifugační zkumavky napipetovány 3 ml inaktivačního média, které bylo ve vodní lázni vyhřáté na 37°C . Kryovialka se zamrazenými buňkami byla rozmrazena jemným třepáním ve vodní lázni vyhřáté na 37°C . Obsah kryovialky, který činil 1 ml, byl přepipetován do předem připravené centrifugační zkumavky se 3 ml inaktivačního média. Kryovialka byla poté ještě vypláchnuta 1 ml inaktivačního média. Tento 1 ml byl následně přenesen k buňkám v inaktivačním médiu. Takto připravená buněčná suspenze byla zcentrifugována při 1500 otáčkách po dobu 5 minut. Po dokončení centrifugace byl odsát supernatant pomocí Pasteurovy pipety. Peletka buněk byla následně resuspendována v 1 ml kultivačního média. Poté bylo napipetováno odpovídající množství (9 ml) nového

kultivačního média do kultivační misky. Nakonec byly buňky přepipetovány do kultivační misky, vyčtvercovány a vloženy do inkubátoru vyhřátého na 37°C. V případě rozmrazování buněk MCF7 byl do kultivační misky ke kultivačnímu médiu přidán ještě insulin, a to v objemu 25 µl insulinu na 10 ml média.

3.3.2 Pasážování a počítání buněk

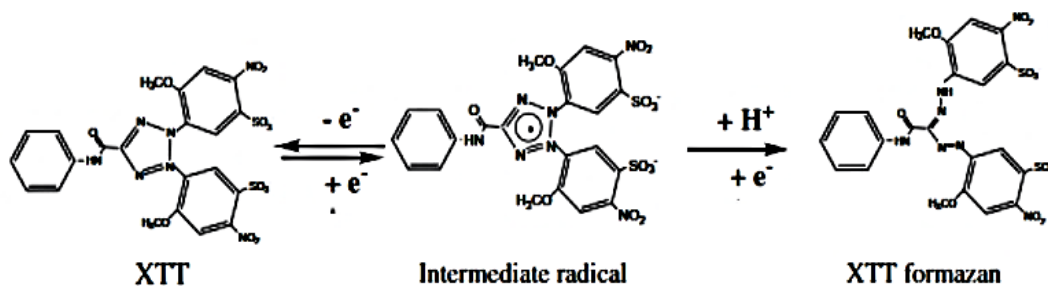
Samotné pasážování bylo provedeno při konfluenci buněk v rozmezí 70 – 90 %. Daná konfluencí buněk byla vždy zkontrolována ve světelném mikroskopu. Ještě před začátkem samotné práce byly všechny roztoky potřebné pro pasážování (trypsin, PBS, inaktivační médium, kultivační médium) vytemperovány ve vodní lázni vyhřáté na 37°C.

Nejprve bylo pomocí automatického pipetoru odsáto původní (staré) kultivační médium, které bylo následně vyhozeno do odpadu. Poté byla původní kultivační miska omyta 3 ml PBS, aby došlo k oplachu mrtvých buněk. Po následném odpipetování PBS do odpadu, byly do kultivační misky napipetovány 3 ml trypsinu. Následně byla kultivační miska umístěna do inkubátoru na 9 minut. Během této inkubace byla připravena zkumavka určená k centrifugaci, do níž byly napipetovány 3 ml inaktivačního média. Po uplynutí doby inkubace byl trypsin s buňkami důkladně resuspendován a celý objem byl přenesen do předem připraveného inaktivačního média. Kultivační miska byla poté ještě opláchnuta 3 ml PBS, které byly následně také přidány do centrifugační zkumavky k inaktivačnímu médiu se ztrypsinizovanými buňkami. Takto připravená zkumavka byla zcentrifugována při 1500 ot./min. po dobu 5 minut. Po stočení byl odsát supernatant pomocí Pasteurovy pipety a zbylá peletka buněk byla resuspendována ve 3 ml nového kultivačního média. Množství a viabilita buněk byla stanovena pomocí přístroje Beckman Coulter Counter. Do zkumavky, která obsahovala 10 ml Izotonu II, bylo napipetováno 100 µl důkladně resuspendované buněčné suspenze a proměřeno. Následně byly buňky nasazeny do nových kultivačních misek, vyčtvercovány a ponechány v CO₂ inkubátoru, který byl vyhřátý na 37°C. V případě buněk MCF7 byl do kultivační misky k novému kultivačnímu médiu přidán ještě insulin (25 µl insulinu na 10 ml média). Poté byla nádobka vyčtvercována a vložena do inkubátoru vyhřátého na 37°C.

3.4 Stanovení cytotoxicity pomocí XTT testu

Stanovení viability buněk hraje zásadní roli při určitých experimentech, například při testech cytotoxicity. Existuje široká škála metod pro stanovení buněčné viability od nejrutinnějšího testu vylučování trypanové modře, přes použití tetrazoliových solí až po vysoce komplexní analýzy jednotlivých buněk (Stoddart, 2011).

Tetrazoliové soli, zejména MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid a XTT, 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid, jsou široce používané testovací metody pro měření viability a proliferace buněk. Měření viability buněk je založeno na schopnosti mitochondriálních dehydrogenáz přítomných u živých buněk redukovat XTT na oranžový formazan, který je rozpustný ve vodě (viz obrázek 21). Meziproduktem reakce je přechodný radikál (Wang, 2011). Do reakce je nutné přidávat ECR (Electron Coupling Reagen), protože většina buněk není schopná účinně metabolizovat XTT (Roehm, 1991). Množství formazanového produktu se měří pomocí spektrofotometru (Wang, 2011).



Obrázek 21 - Schéma redukce XTT tetrazoliové soli na oranžový formazan (Wang,2011)

3.4.1 Postup

Nejprve bylo provedeno pasážování buněk A549 i MCF7 a poté byly buňky spočítány pomocí přístroje Beckman Coulter Counter. XTT test byl prováděn v 96-jamkových destičkách. Testované koncentrace terpenoidů byly v rozmezí 1 – 50 μ M a každá koncentrace byla zhotovena v triplicátu. Jako pozitivní kontrola byl použit roztok 100 μ M CisPt a jako negativní kontrola byl použit 0,1% roztok DMSO.

Do jamek v destičce bylo pipetováno 190 μ l buněčné suspenze. Buňky MCF7 byly nasazeny v počtu 30 000 a buňky A549 v počtu 5 000 na jednu jamku. Destička s takto nasazenými buňkami byla následně vložena do inkubátoru. Druhý den byly přisedlé buňky ovlivněny přidáním jednotlivých koncentrací terpenoidů podle tabulky 2. Terpenoidy byly pipetovány v objemu 10 μ l na jednu jamku. Takto ovlivněné buňky byly opět inkubovány 24 hodin. Po 24 hodinách od ovlivnění byl proveden samotný XTT test. Nejdříve bylo však připraveno odpovídající množství směsi XTT. Tato směs byla připravena smícháním XTT labeling reagent a ECR. Z takto připravené směsi bylo do každé jamky pipetováno 100 μ l barviva pomocí multikanálové pipety. Poté byla destička ponechána v inkubátoru, kde byly buňky společně s činidlem inkubovány ve tmě. Následně byl samotný test vyhodnocen. U buněk MCF7 byla hodnocena absorbance naměřená v čase 2 hodiny a u buněk A549 byla hodnocena absorbance naměřená v čase 1 hodina.

Počty nasazených buněk a čas měření absorbance byly vybrány na základě titračního experimentu. Měření bylo prováděno na spektrofotometru Tecan Infine 200 při 480 nm. Hodnoty pro stanovení viability byly získány po odečtu absorbance blanku (médium bez buněk). Hodnoty jednotlivých absorbancí naměřených v triplikátech byly zprůměrovány a tyto průměry byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% roztok DMSO), která představuje 100% viabilitu. Výpočet vyjadřuje tato rovnice:

$$viabilita [\%] = \frac{A_{vz} \times 100}{A_{0,1\% \text{ DMSO}}}$$

3.4.1.1 Titrační experiment

Titrační experiment byl proveden pro buňky MCF7 i A549. Oba typy buněk byly nasazeny do 96-jamkové kultivační destičky. Nejprve bylo provedeno pasážování a poté byla stanovena jejich viabilita. Buňky byly do destičky nasazeny po 5 000, 10 000, 20 000, 30 000 buňkách na jednu jamku dle tabulky 3. Každá varianta byla zhotovena v triplikátu a na každou jamku připadalo celkem 200 μ l (buněčná suspenze + médium). Po 24 h inkubaci bylo do každé jamky k přisednutým buňkám přidáno 100 μ l XTT směsi. Směs XTT byla připravena smícháním XTT labeling reagent a ECR v poměru 5 ml XTT / 100 μ l ECR. Takto připravená destička byla proměřena ihned v čase 0 a poté po 30 minutách, dále po 1, 2 a 3 hodinách. Měření bylo prováděno na na spektrofotometru Tecan Infine 200 při 480 nm. Na základě výsledků titračního experimentu byly následně vybrány počty nasazovaných buněk do destičky a čas měření po přidání XTT.

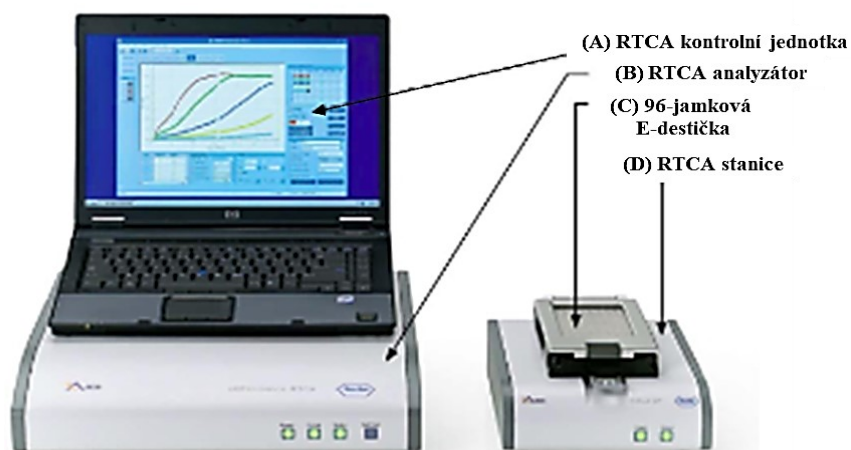
Tabulka 3 - Pipetovací schéma destičky pro titrační experiment. V jamkách jsou vyznačeny jednotlivé počty buněk připadající na konkrétní jamku. V zelených a modrých jamkách označených jako „médium“ jsou pipetována pouze média pro dané buňky, buňky se v nich ale nenacházejí.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		A549	A549	A549	A549	MCF7	MCF7	MCF7	MCF7	A549	MCF7	
A												
B		5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	médium	médium	
C		10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	médium	médium	
D		20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	médium	médium	
E		30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	médium	médium	
F												
G												
H												

3.5 Analýza proliferace buněk v reálném čase pomocí systému xCELLigence RTCA SP

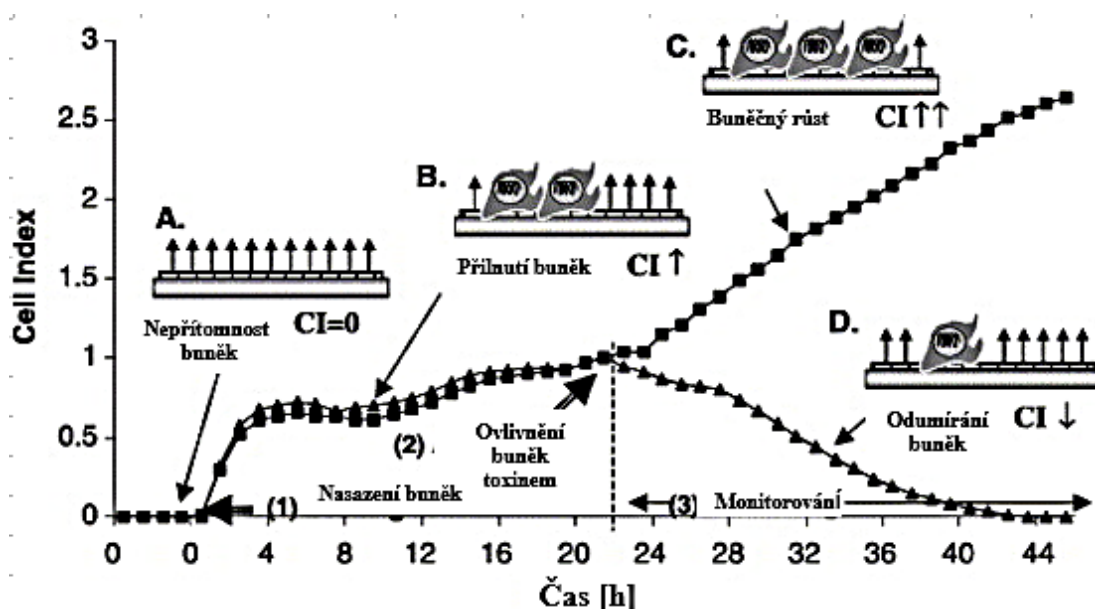
Systém xCELLigence je specifická technologie, která umožňuje nepřetržité monitorování adherentních buněčných linií v reálném čase neinvazivním způsobem. Toto zařízení je navrženo pro nepřetržité monitorování buněčné adheze, životaschopnosti buněk, proliferace, diferenciaci, anebo změn zahrnujících buněčný cytoskelet. V podstatě se jedná o reakce, které vyvolávají změny v samotné buňce, jako je například morfologie (velikost, objem, tvar buňky) nebo počet buněk (proliferace nebo smrt). Tímto je umožněno sledovat komplexní buněčné chování, jako je například reakce na léky, chemické sloučeniny či nanočástice (Kho, 2015).

Systém xCELLigence se skládá celkem ze čtyř hlavních komponent, a to konkrétně z RTCA analyzátoru, RTCA SP stanice, kontrolní jednotky RTCA (přenosný počítač) s integrovaným softwarem potřebným pro vyhodnocování výsledků a jednorázové 96-jamkové E-destičky, jejíž víko je navrženo tak, aby docházelo k co nejmenšímu odpařování. Při analýzách musí být RTCA stanice uložena ve standardních CO₂ inkubátorech pro buněčné kultury. Zároveň byly destičky navrženy pro použití v prostředí od +15 do +40 °C s relativní vlhkostí maximálně 98 %, a to z důvodu minimalizace kondenzace (Urcan, 2010). Komponenty systému xCELLigence RTCA SP jsou zobrazeny na obrázku 22.



Obrázek 22 - Komponenty systému xCELLigence RTCA SP: (A) RTCA kontrolní jednotka, (B) RTCA analyzátor, (C) 96-jamková E-destička, (D) RTCA stanice (upraveno podle Teng, 2013)

Při analýzách proliferace buněk v reálném čase za pomoci systému xCELLigence se k neinvazivnímu monitorování životaschopnosti kultivovaných buněk využívají speciálně navržené mikrotitrační destičky (E-destičky), které obsahují vzájemně propojené zlaté mikroelektrody (Ke, 2011). Zlaté mikroelektrody pokrývají dno E-destičky přibližně z 80 % (Urcan, 2010). Po přilnutí buněk na dno jamek je pomocí těchto zlatých mikroelektrod generovaná elektrická impedance, která je měřena a zaznamenávána pomocí softwaru xCELLigence. Hodnoty elektrické impedance jsou poté pomocí tohoto softwaru převedeny na bezjednotkovou veličinu zvanou cell index (CI). Čím vyšší jsou hodnoty CI, tím vyšší je úroveň adheze buněk a naopak. Pokud je CI rovno nule, poukazuje to na nepřítomnost buněk (= smrt buněk) (Kho, 2015). Průběh analýzy pomocí systému xCELLigence RTCA je zobrazen na obrázku 23.



Obrázek 23 - Průběh analýzy pomocí systému xCELLigence RTCA: Před nasazením buněk je nulový CI (A) a po nasazení buněk (1) začíná vlivem přilnutí buněk CI růst (B). Po ovlivnění buněk toxinem (2) mohou nastat dvě možnosti, a to buď buněčný růst, kdy CI roste (C), nebo odumírání buněk, kdy CI klesá (D) (upraveno dle Xing, 2015)

3.5.1 Postup

Ze všeho nejdříve byly buňky MCF7 i A549 zpasážovány a poté spočítány pomocí přístroje Beckman Coulter Counter. Následně bylo do všech jamek E-destičky pipetováno 100 μ l kultivačního média, které bylo vyhřáté na 37°C. Tato destička byla vložena do RTCA stanice, která byla uložena v inkubátoru. V tomto kroku bylo v jednotlivých jamkách této destičky proměřeno pozadí a zkontrolována funkčnost všech elektrod. Poté byla tato E-destička vyjmuta z inkubátoru a do jednotlivých jamek bylo pipetováno 90 μ l buněčné suspenze tak, aby množství nasazených buněk MCF7 bylo na jednu jamku 11 000. Buňky

A549 byly nasazovány v počtu 4 500 buněk na jednu jamku. Takto připravená destička byla opět umístěna do RTCA stanice v inkubátoru. Den poté byly buňky ovlivněny přidavkem testovaných terpenoidů o objemu 10 μ l s příslušnými koncentracemi 1 – 50 μ M. Jednotlivé koncentrace byly zhotovované v tetraplikátech. Jako pozitivní kontrola byl využit 5% DMSO, který byl pipetován do zvolených jamek. Pipetovaný objem činil 10 μ l. Jako negativní kontrola byl využit 0,1% DMSO, který byl také pipetován do zvolených jamek a také o objemu 10 μ l. Vliv testovaných terpenoidů na buňky MCF7 a A549 byl monitorován 72 hodin a poté byl experiment ukončen. Vyhodnocení tohoto experimentu bylo provedeno s pomocí RTCA softwaru 1.2.1.1002.

3.6 Statistická analýza

Vyhodnocování výsledků bylo prováděno pomocí programu Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, USA) a také s pomocí softwaru GraphPad QuickCales (GraphPad Software, USA). Všechny experimenty, které byly hodnocené statisticky, byly provedeny v $n = 3$. Výsledky jsou vyjadřovány jako průměr \pm směrodatná odchylka. Pro porovnávání jednotlivých výsledků byl využit nepárový t-test na hladině významnosti 5 %.

4 VÝSLEDKY

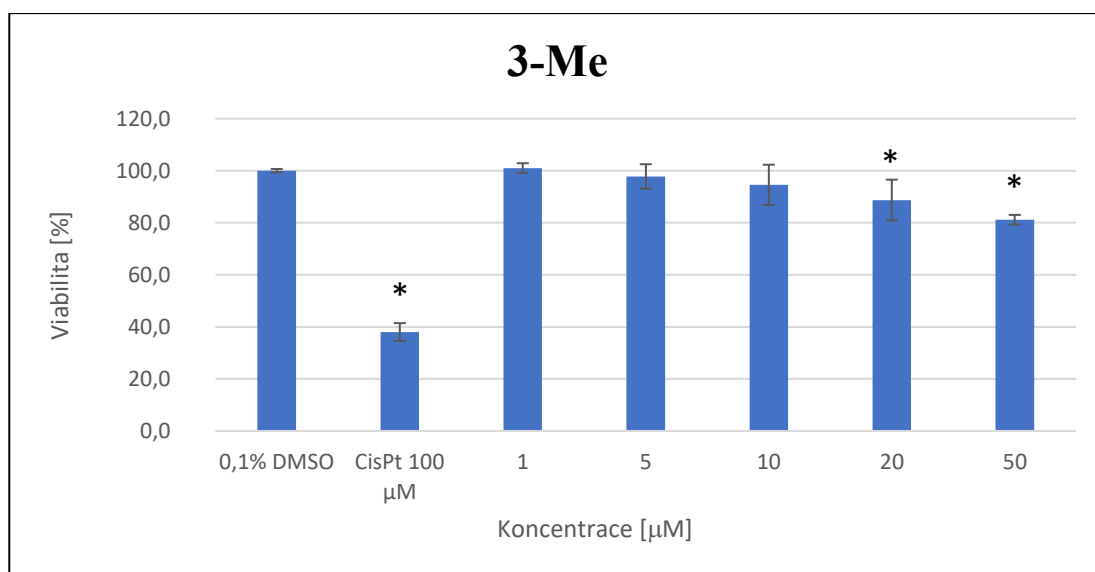
4.1 Stanovení cytotoxicity pomocí XTT testu

Pro stanovení cytotoxicity pomocí XTT testu byly použity adherentní buněčné linie MCF7 a A549. XTT test byl na těchto liniích proveden přesně po 24 hodinách od ovlivnění buněk testovanými terpenoidy s příslušnými koncentracemi 1 – 50 μM . Každá koncentrace byla zhotovena v triplikátu. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO, který představuje 100% viabilitu. K této kontrole jsou výsledky vztaženy. Jako pozitivní kontrola byla použita 100 μM CisPt, která má cytotoxické účinky. Měření bylo prováděno na spektrofotometru Tecan Infinite 200 při 480 nm. Výsledky pro buněčnou linii MCF7 byly odečítány v čase 2 hodiny. Výsledky pro buněčnou linii A549 byly odečítány v čase 1 hodina. Tyto časy byly vybrány na základě výsledků titračního experimentu. Do jednotlivých grafů jsou zaneseny zprůměrované hodnoty s chybovými úsečkami znázorňujícími směrodatnou odchylku. Pro každou koncentraci terpenoidů byl proveden nepárový t-test na hladině významnosti 5 %, a to za pomoci softwaru GraphPad QuickCals. Statisticky významné hodnoty jsou v jednotlivých grafech označeny symbolem hvězdičky.

4.1.1 Buněčná linie MCF7

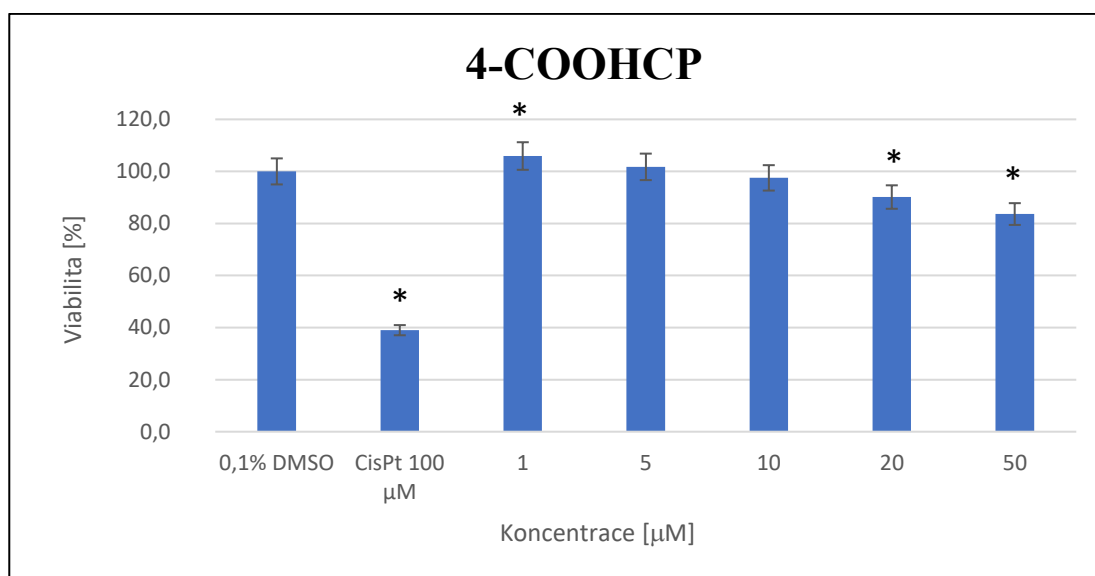
Vliv terpenoidu 3-Me na viabilitu buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 1. U koncentrací 1, 5 a 10 μM je viabilita buněk téměř srovnatelná s negativní kontrolou (0,1% DMSO). Statisticky významný pokles viability buněk je pozorovatelný až u koncentrací 20 a 50 μM .

Graf 1 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 3-Me. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



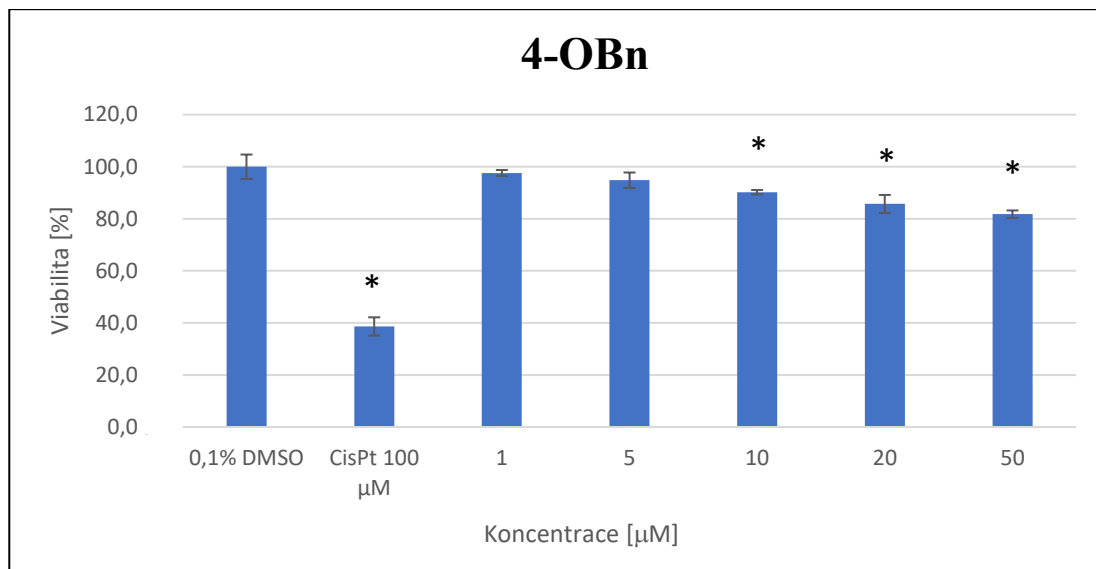
Vliv terpenoidu 4-COOHCP na viabilitu buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 2. U koncentrace 1 μM je patrný statisticky významný nárůst viability. Viabilita buněk při koncentracích 5 a 10 μM je téměř totožná s negativní kontrolou. Naopak u koncentrací 20 a 50 μM můžeme pozorovat statisticky významný pokles viability buněk.

Graf 2 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 4-COOHCP. Tyto výsledky byly vztaheny k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



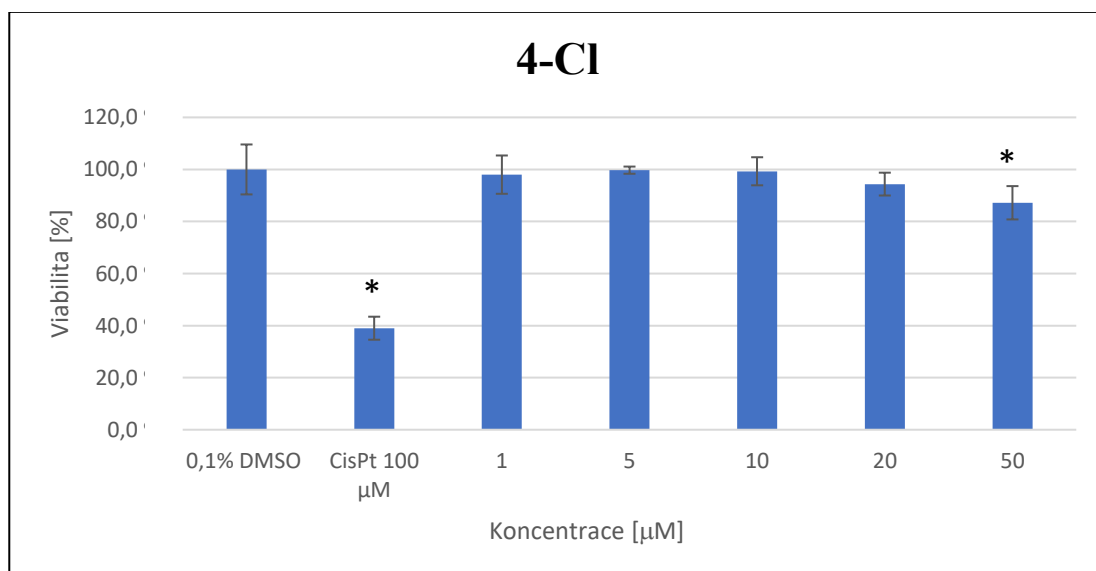
Vliv terpenoidu 4-OBn na viabilitu buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 3. Viabilita těchto buněk je po ovlivnění koncentracemi 1 a 5 μM téměř totožná jako negativní kontrola. Naopak statisticky významný pokles viability můžeme pozorovat po ovlivnění koncentracemi 10, 20 a 50 μM .

Graf 3 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 4-OBn. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že data tato jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



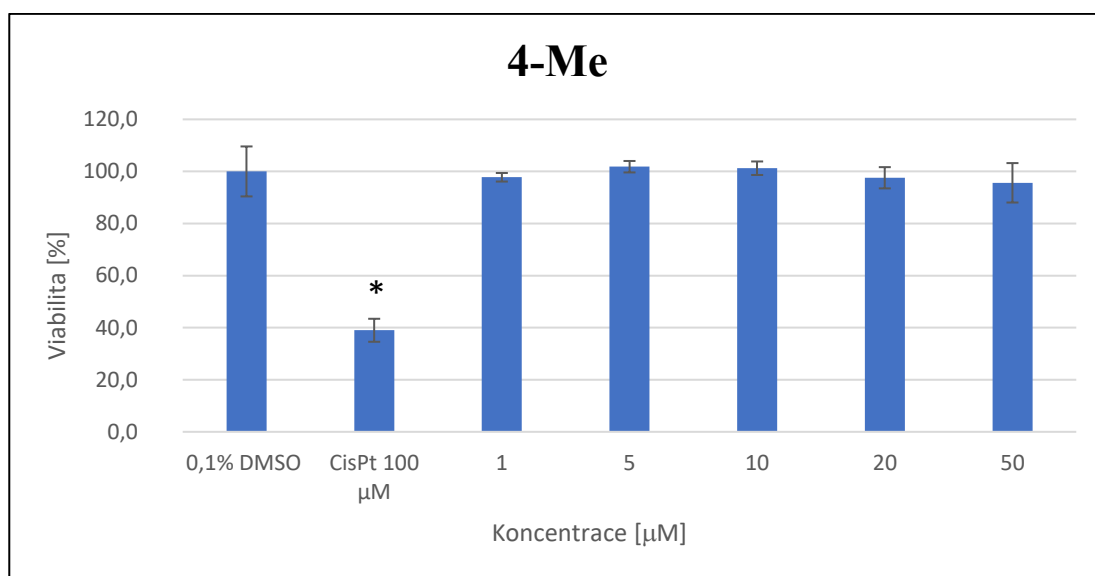
Vliv terpenoidu 4-Cl na viabilitu buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 4. Viabilita buněk po ovlivnění koncentracemi 1, 5, 10 a 20 µM je skoro totožná jako negativní kontrola. Statistický pokles viability buněk je patrný pouze po ovlivnění koncentrací 50 µM.

Graf 4 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 4-Cl. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



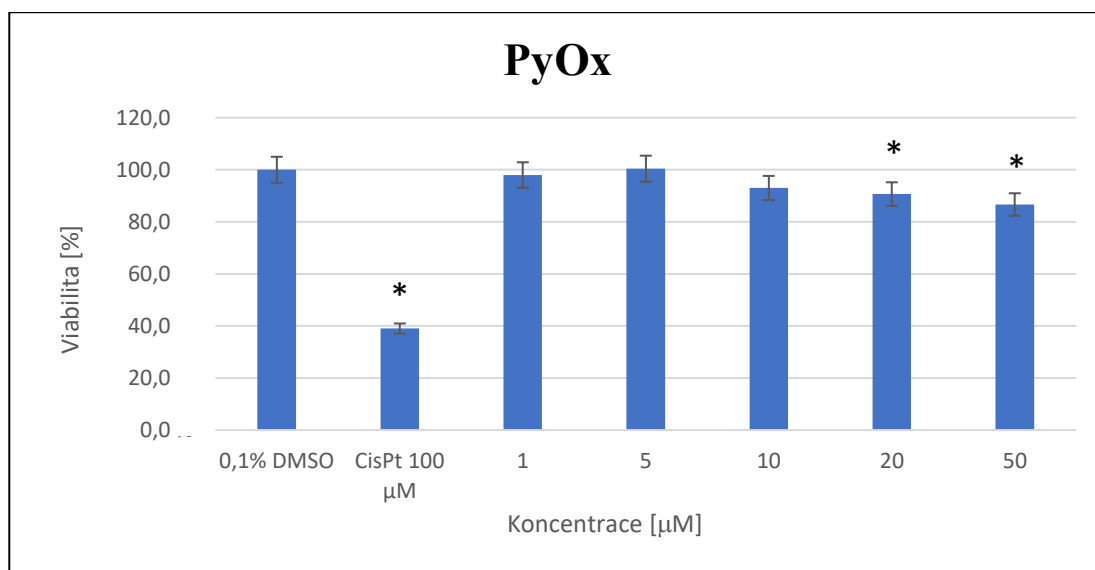
Vliv terpenoidu 4-Me na viabilitu buněčné linie MCF7 je znázorněna v grafu 5. U všech použitých koncentrací (1, 5, 10, 20 a 50 μM) je viabilita buněk téměř shodná s negativní kontrolou. Ke statisticky významnému poklesu viability nedošlo ani u jedné koncentrace, z čehož lze usuzovat, že daná látka nemá na buňky žádný vliv.

Graf 5 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu 4-Me. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Vliv terpenoidu PyOx na viabilitu buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 6. U koncentrací 1, 5 a 10 μM je viabilita buněk téměř totožná s negativní kontrolou. Ke statisticky významnému poklesu viability došlo u koncentrací 20 a 50 μM .

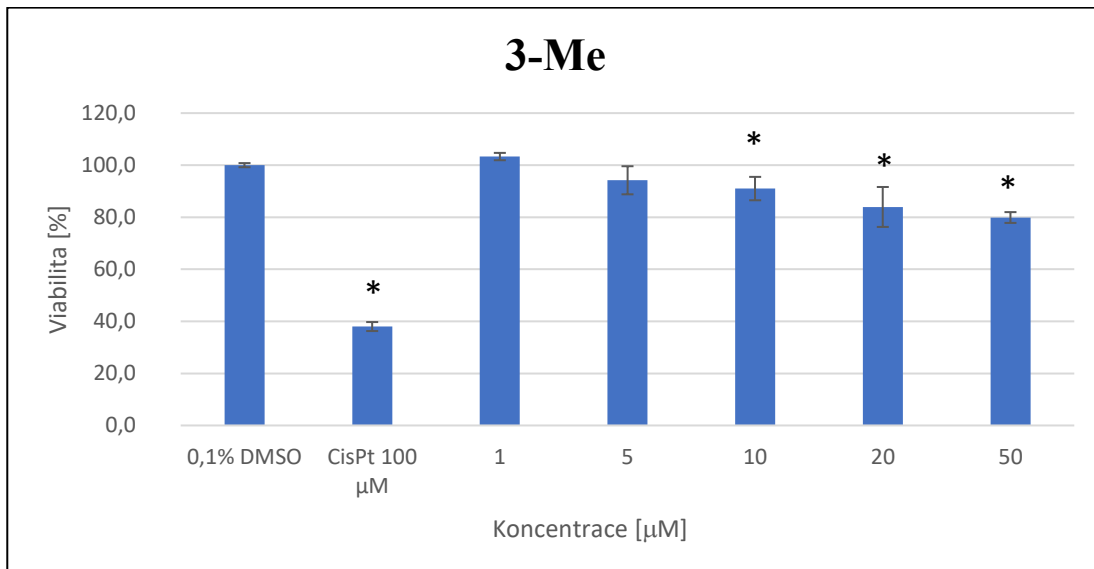
Graf 6 - Viabilita buněčné linie MCF7 po působení terpenoidu PyOx. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



4.1.2 Buněčná linie A549

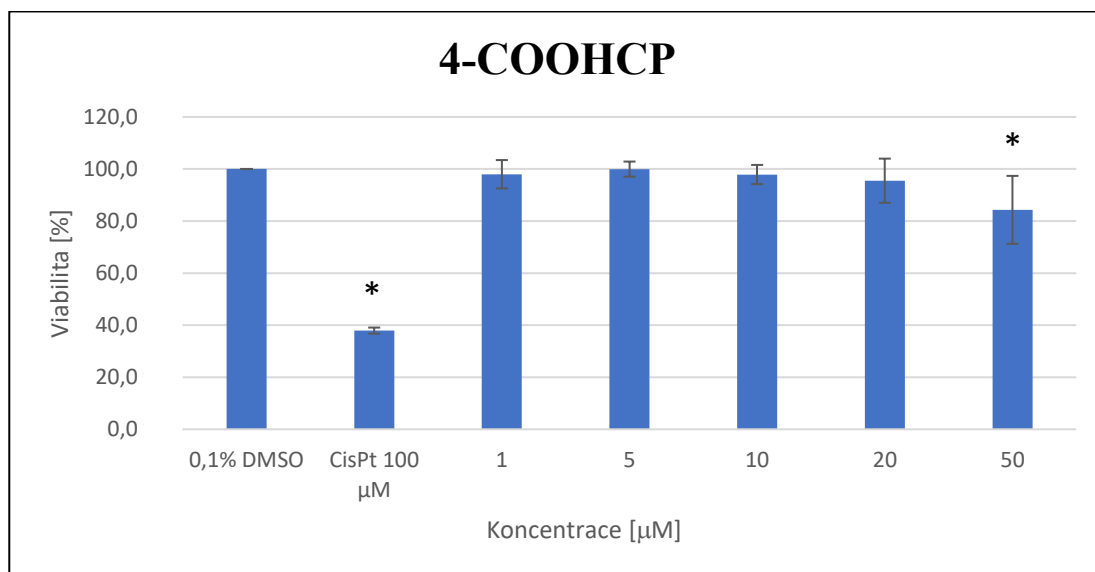
Vliv terpenoidu 3-Me na viabilitu buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 7. U koncentrací 1 a 5 μM je viabilita buněk téměř totožná s negativní kontrolou. Statisticky významný pokles viability je pozorovatelný po ovlivnění koncentracemi 10, 20 a 50 μM .

Graf 7 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 3-Me. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



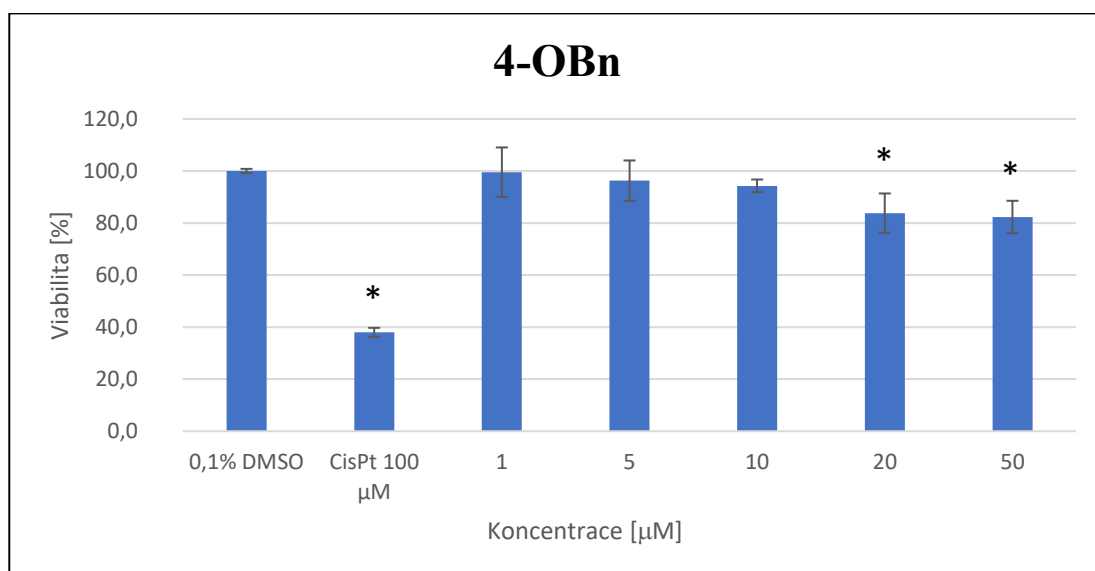
Vliv terpenoidu 4-COOHCP na viabilitu buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 8. Téměř shodná viabilita s negativní kontrolou je pozorovatelná po ovlivnění koncentracemi 1, 5, 10 i 20 μM . Statisticky významné snížení viability buněk můžeme vidět pouze po ovlivnění koncentrací 50 μM .

Graf 8 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 4-COOHCP. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



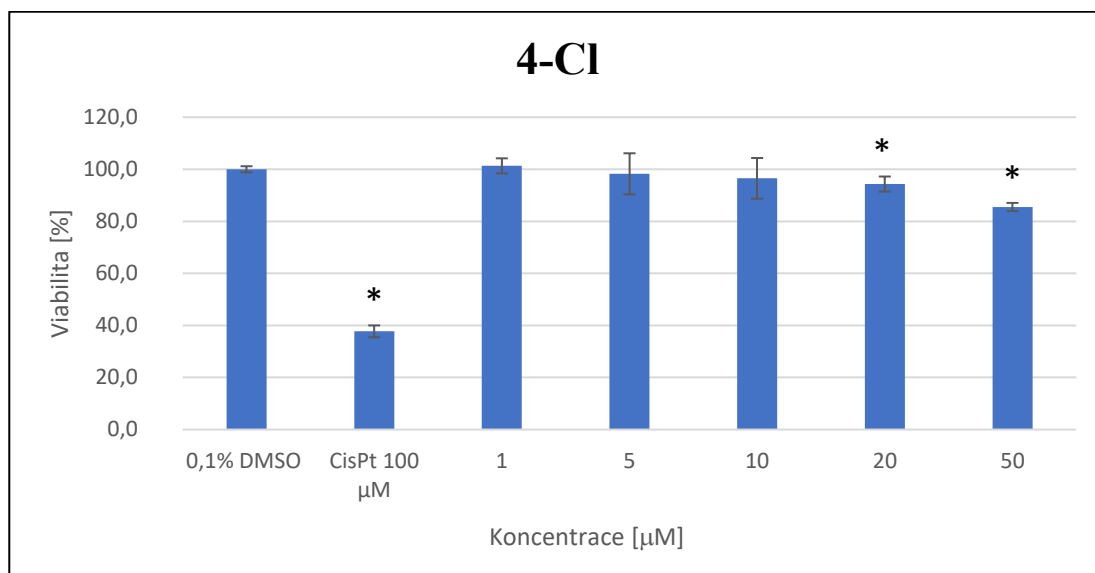
Vliv terpenoidu 4-OBn na viabilitu buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 9. Viabilita buněk je po ovlivnění koncentracemi 1, 5 a 10 µM daného terpenoidu téměř totožná s negativní kontrolou. Naopak u koncentrací 20 a 50 µM je již viditelný statisticky významný pokles viability buněk.

Graf 9 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 4-OBn. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



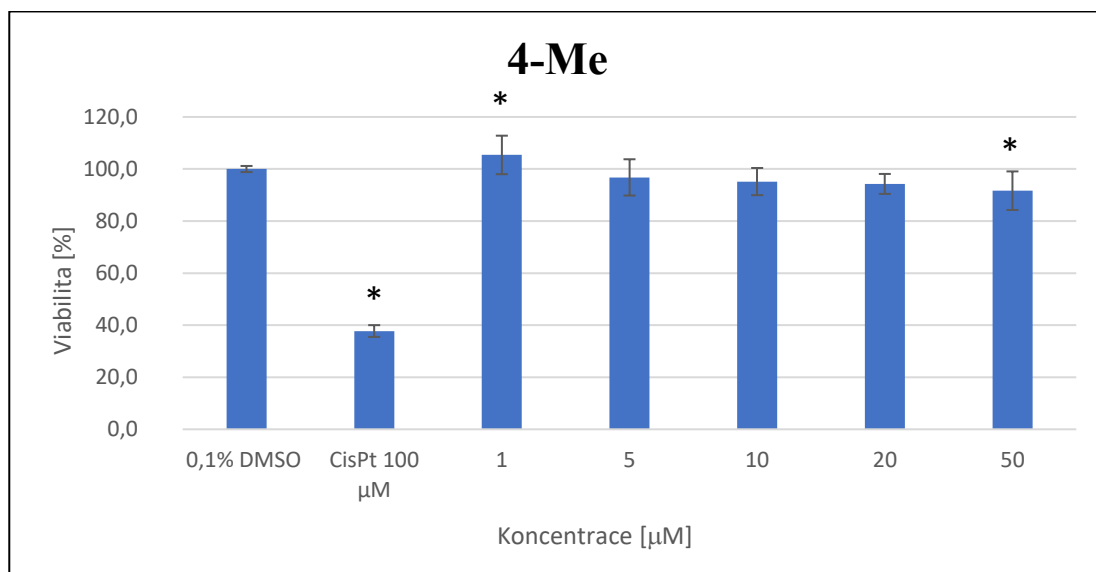
Vliv terpenoidu 4-Cl na viabilitu buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 10. Vliv koncentrací 1, 5 a 10 μM na buňky je zanedbatelný a téměř totožný s negativní kontrolou. Statisticky významné snížení viability buněk je patrné po ovlivnění koncentracemi 20 a 50 μM .

Graf 10 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 4-Cl. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



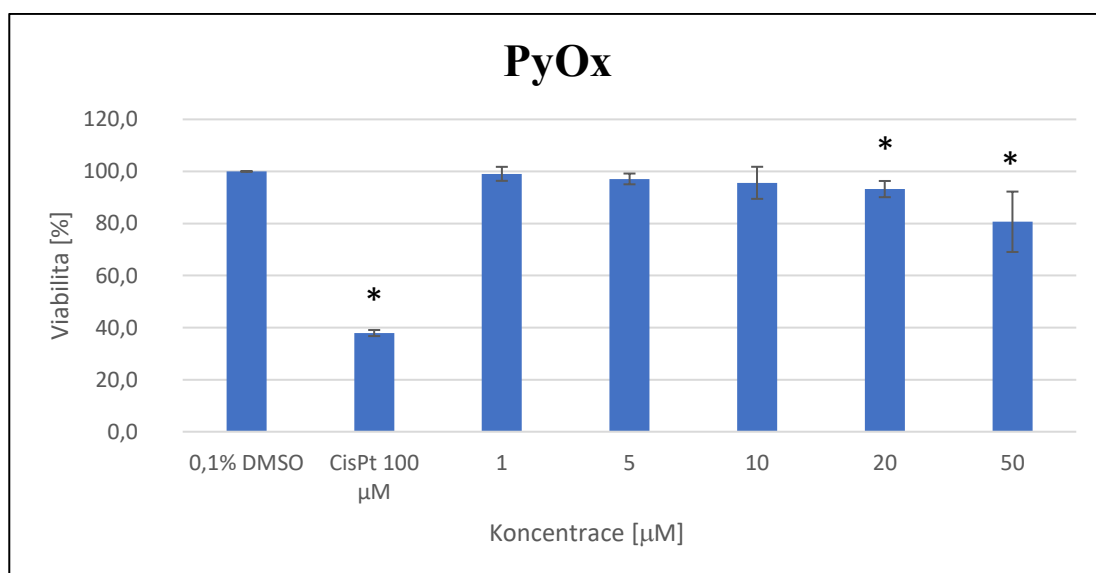
Vliv terpenoidu 4-Me na viabilitu buněčné linie A549 je znázorněna v grafu 11. U koncentrace 1 μM došlo ke statisticky významnému nárůstu viability. Po ovlivnění buněk koncentracemi 5, 10 a 20 μM je viabilita srovnatelná s negativní kontrolou. Naopak u koncentrace 50 μM je pozorovatelný statisticky významný pokles viability buněk.

Graf 11 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu 4-Me. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Vliv terpenoidu PyOx na viabilitu buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 12. Viabilita buněk po ovlivnění koncentracemi 1, 5 a 10 µM je téměř srovnatelná s negativní kontrolou. Statisticky významné snížení viability buněk je patrné u buněk, které byly ovlivněny koncentracemi 20 a 50 µM.

Graf 12 - Viabilita buněčné linie A549 po působení terpenoidu PyOx. Tyto výsledky byly vztaženy k negativní kontrole (0,1% DMSO). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku a symbol * u sloupců značí, že tato data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



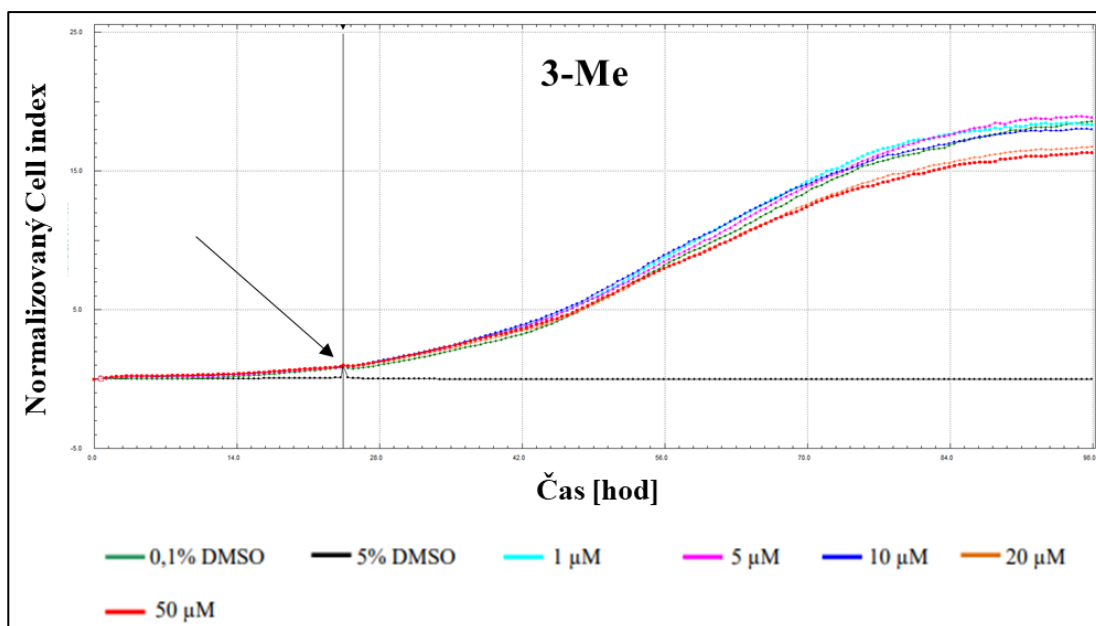
4.2 Stanovení cytotoxicity terpenoidů pomocí systému xCELLigence RTCA SP

Pro stanovení cytotoxicity nově syntetizovaných terpenoidů byly použity adherentní buněčné linie MCF7 a A549. Roztoky testovaných terpenoidů byly připraveny v koncentračním rozmezí 1 – 50 μM . V těchto testech bylo využito 0,1% DMSO jako negativní kontrola, které při této koncentraci neovlivňuje růst buněk. Tato negativní kontrola je u všech grafů znázorněna tmavě zelenou barvou. Jako pozitivní kontrola bylo využito 5% DMSO. Při 5% koncentraci DMSO dochází ihned po jeho přidání (v grafech označeno šipkou) k zástavě buněčné proliferace a buňky odumírají. Toto se projevuje poklesem hodnot CI na nulu. Pozitivní kontrola je u všech grafů znázorněna černou barvou.

4.2.1 Buněčná linie MCF7

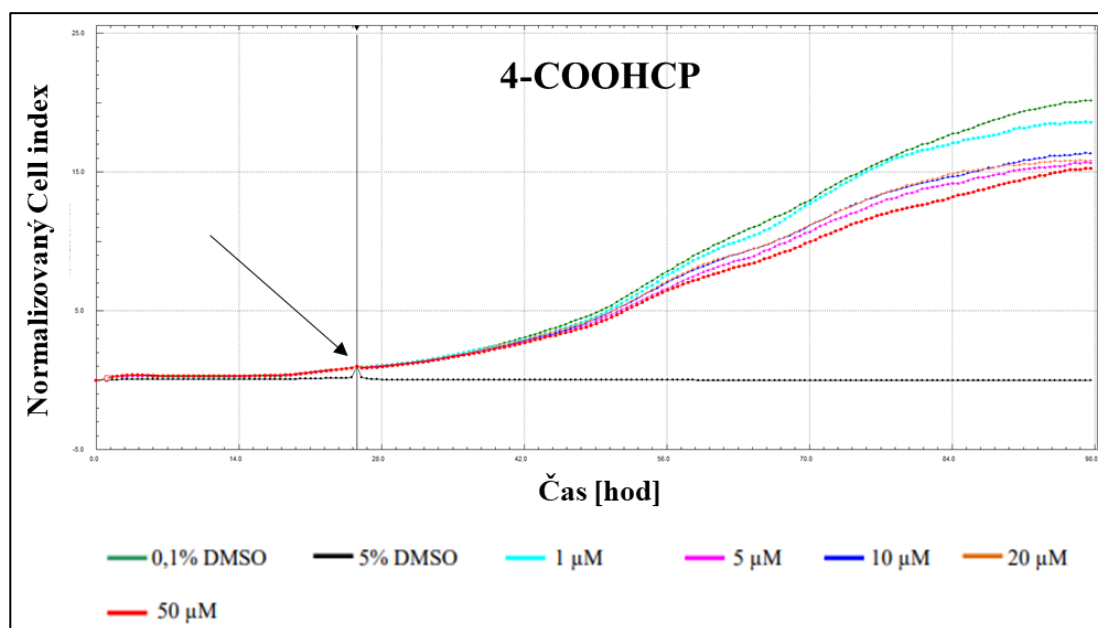
Vliv terpenoidu 3-Me na proliferaci buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 13. Při ovlivnění buněk koncentracemi 1, 5 a 10 μM nedošlo k poklesu CI a tyto křivky prakticky kopírují tmavě zelenou křivku negativní kontroly. Zhruba kolem 70. hodiny došlo u koncentrací 20 a 50 μM pouze k lehkému snížení CI. I v tomto případě lze ale říct, že křivky koncentrací 20 a 50 μM také téměř kopírují křivku negativní kontroly. Z tohoto výsledku lze tedy usuzovat, že terpenoid 3-Me má na proliferaci buněčné linie MCF7 pouze minimální vliv.

Graf 13 - Vliv terpenoidu 3-Me na proliferaci buněčné linie MCF7. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



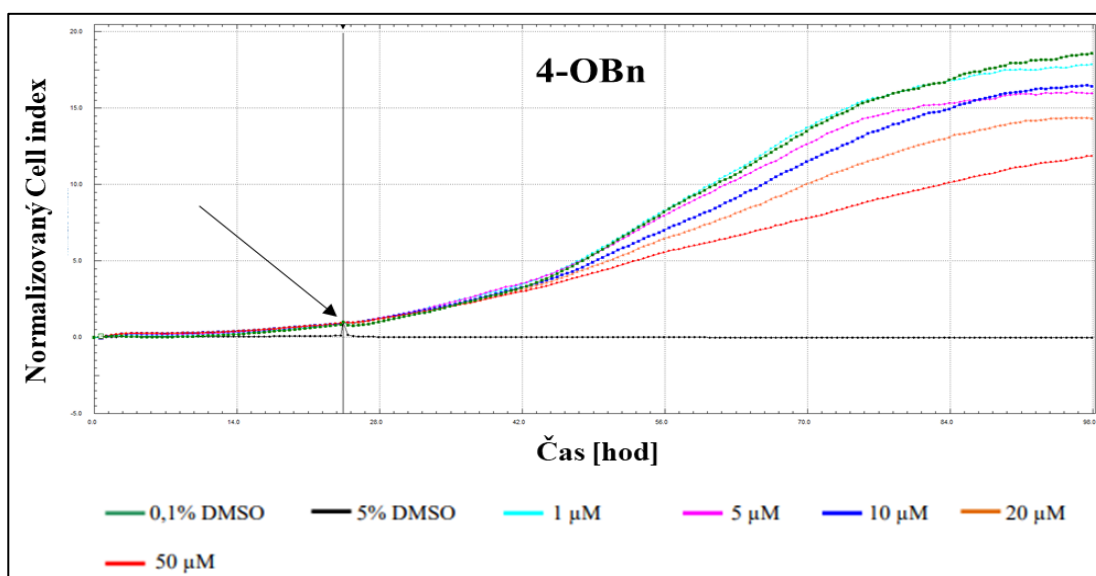
Vliv terpenoidu 4-COOHCP na proliferaci buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 14. Koncentrace 1 μM téměř kopíruje tmavě zelenou křivku negativní kontroly po celou dobu analýzy. Naopak sníženou proliferaci buněk lze pozorovat u koncentrací 5, 10, 20 a 50 μM . Pokles proliferace buněk je v tomto případě patrný zhruba od 60. hodiny. CI se od této doby až do ukončení analýzy nepřiblížil ke křivce negativní kontroly. Dle tohoto výsledku je patrné, že terpenoid 4-COOHCP ve vyšších koncentracích má výraznější vliv na proliferaci buněk.

Graf 14 - Vliv terpenoidu 4-COOHCP na proliferaci buněčné linie MCF7. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



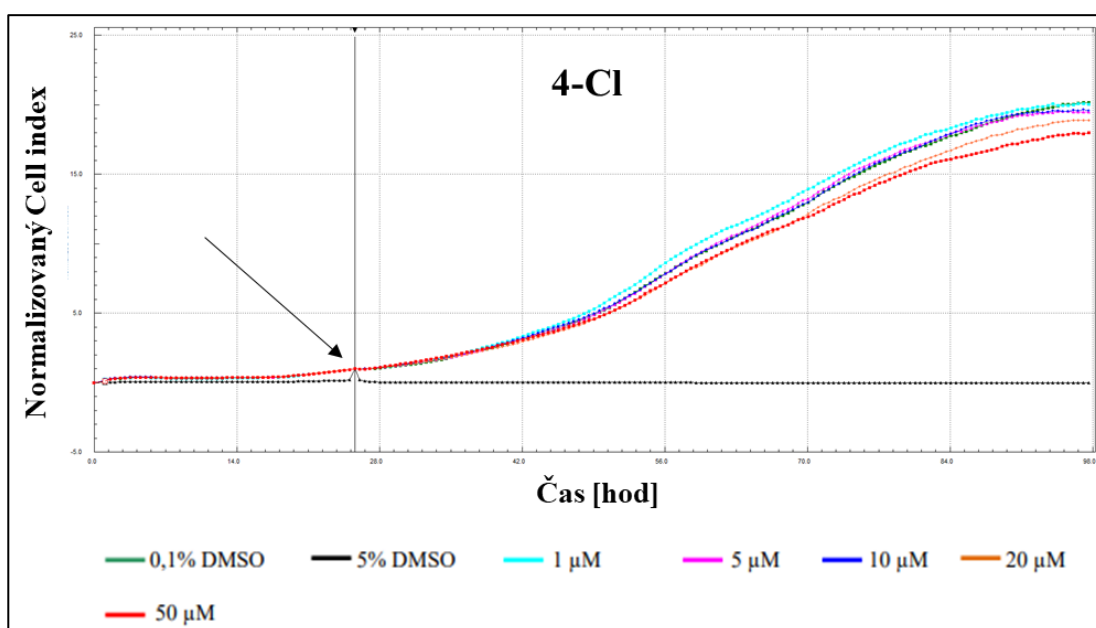
Vliv terpenoidu 4-OBn na proliferaci buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 15. Koncentrace 1 μM téměř zcela kopíruje tmavě zelenou křivku negativní kontroly. Po ovlivnění buněk koncentracemi 5, 10 a 20 μM lze pozorovat lehce sníženou proliferaci, což je také charakterizováno sníženým CI. K poklesu proliferace v tomto případě došlo zhruba kolem 56. hodiny. Snížené hodnoty CI zůstaly od této doby až do ukončení experimentu. Naopak u nejvyšší koncentrace terpenoidu - 50 μM lze již pozorovat výrazněji snížený CI, a to také zhruba od 56. hodiny od počátku experimentu. Dle tohoto výsledku způsobuje terpenoid 4-OBn při nejvyšší testované koncentraci významný pokles buněčné proliferace.

Graf 15 - Vliv terpenoidu 4-OBn na proliferaci buněčné linie MCF7. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



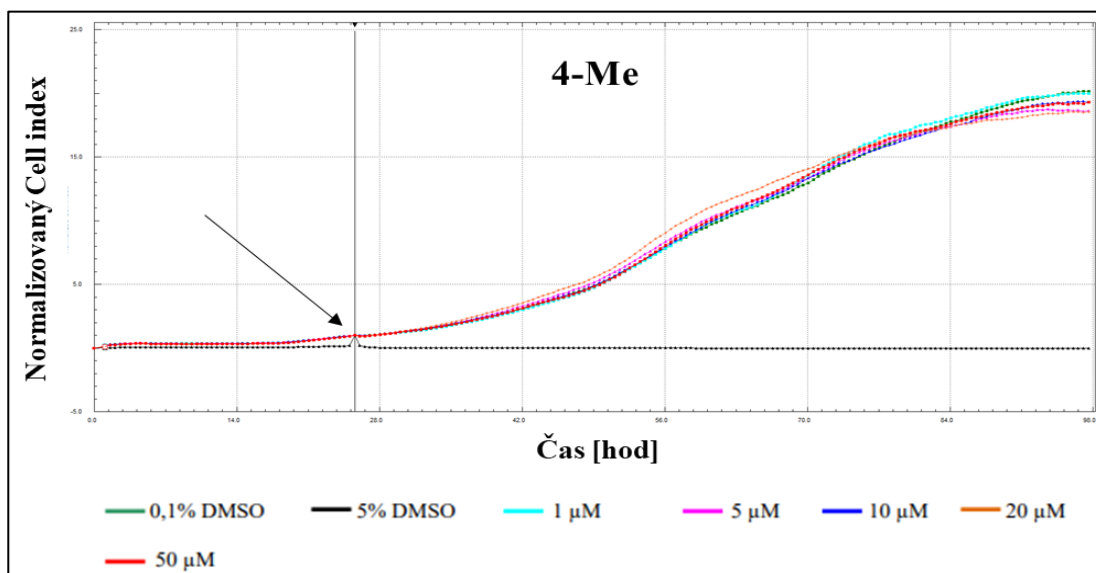
Vliv terpenoidu 4-Cl na proliferaci buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 16. U koncentrace 1 μM lze pozorovat lehce zvýšený CI oproti negativní kontrole. Koncentrace 5 a 10 μM téměř zcela kopírují tmavě zelenou křivku negativní kontroly. Lehce snížený CI lze pozorovat u koncentrací 20 a 50 μM. Nicméně i v tomto případě lze říct, že křivky stále kopírují křivku negativní kontroly. Z tohoto výsledku lze konstatovat, že terpenoid 4-Cl má pouze minimální vliv na proliferaci buněčné linie MCF7.

Graf 16 - Vliv terpenoidu 4-Cl na proliferaci buněčné linie MCF7. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



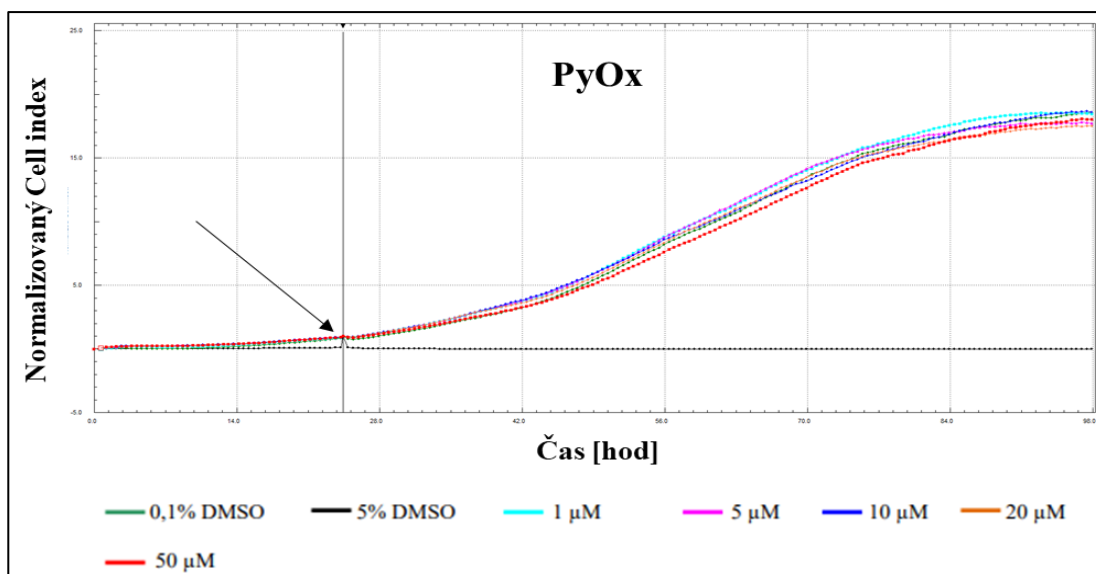
Vliv terpenoidu 4-Me na proliferaci buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 17. Z tohoto grafu je patrné, že křivky všech testovaných koncentrací (1, 5, 10, 20 i 50 μM) kopírují tmavě zelenou křivku negativní kontroly po celou dobu analýzy. Terpenoid s označením 4-Me nemá na proliferaci buněčné linie MCF7 prakticky žádný vliv.

Graf 17 - Vliv terpenoidu 4-Me na proliferaci buněčné linie MCF7. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



Vliv terpenoidu PyOx na proliferaci buněčné linie MCF7 je znázorněn v grafu 18. Všechny křivky testovaných koncentrací (1, 5, 10, 20 i 50 μM) téměř zcela kopírují tmavě zelenou křivku negativní kontroly po celou dobu analýzy. Z tohoto lze také usuzovat, že terpenoid PyOx nemá zcela žádný vliv na proliferaci buněčné linie MCF7.

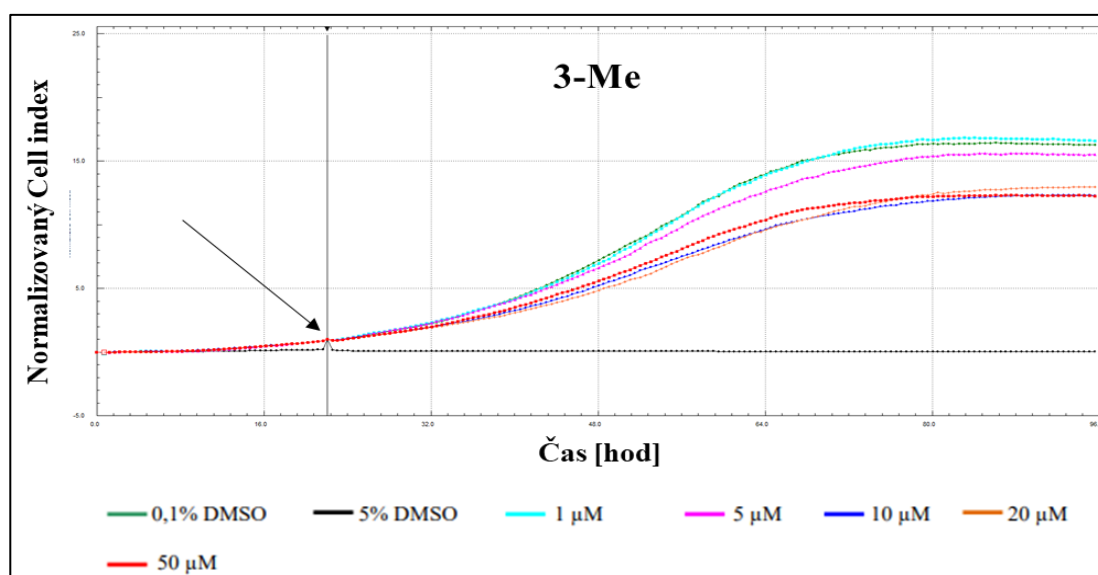
Graf 18 - Vliv terpenoidu PyOx na proliferaci buněčné linie MCF7. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



4.2.2 Buněčná linie A549

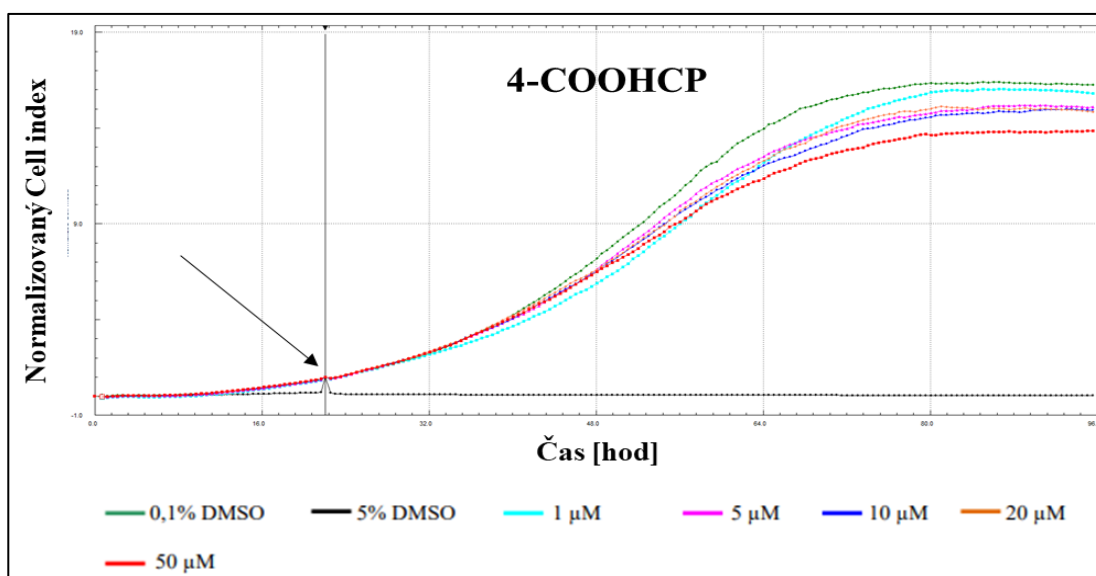
Vliv terpenoidu 3-Me na proliferaci buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 19. U koncentrace 1 μM došlo zhruba od 70. hodiny k nepatrnému zvýšení CI oproti tmavě zelené křivce značící negativní kontrolu. V případě koncentrace 5 μM došlo k nepatrnému poklesu CI oproti negativní kontrole. V tomto případě lze i přesto říct, že tato křivka téměř kopíruje křivku negativní kontroly. Dle grafu došlo poklesu proliferace buněk u koncentrací 10, 20 a 50 μM , a to zhruba od 48. hodiny, což je charakterizované sníženým CI. Na základě tohoto výsledku lze říct, že vyšší koncentrace tohoto terpenoidu mají zřetelný vliv na proliferaci buněk.

Graf 19 - Vliv terpenoidu 3-Me na proliferaci buněčné linie A549. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



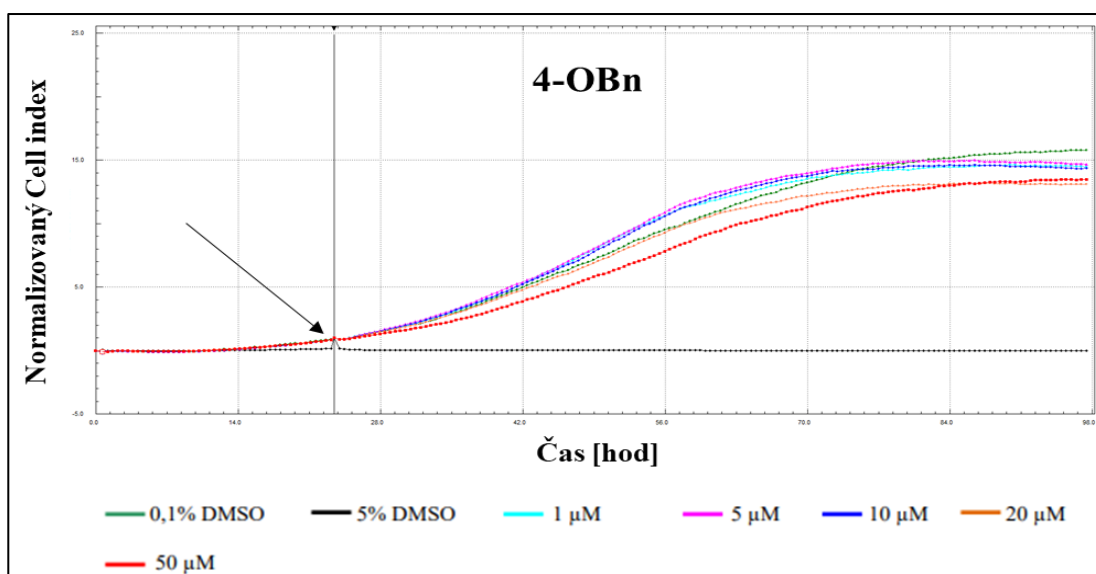
Vliv terpenoidu 4-COOHCP na proliferaci buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 20. U koncentrace 1 μM došlo zpočátku analýzy k lehkému poklesu CI, ale zhruba od 80. hodiny měření tato křivka začala téměř zcela kopírovat tmavě zelenou křivku negativní kontroly. Lehce snížený CI je patrný také u koncentrací 5, 10 a 20 μM . Tyto křivky ale na rozdíl od koncentrace 1 μM nezačaly ke konci analýzy zcela kopírovat křivku negativní kontroly. Nejvíce znatelný pokles CI je možné pozorovat u koncentrace 50 μM . I přes lehce snížený CI u vyšších koncentrací lze konstatovat, že terpenoid 4-COOHCP nemá výrazný vliv na proliferaci buněčné linie A549.

Graf 20 - Vliv terpenoidu 4-COOHCP na proliferaci buněčné linie A549. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



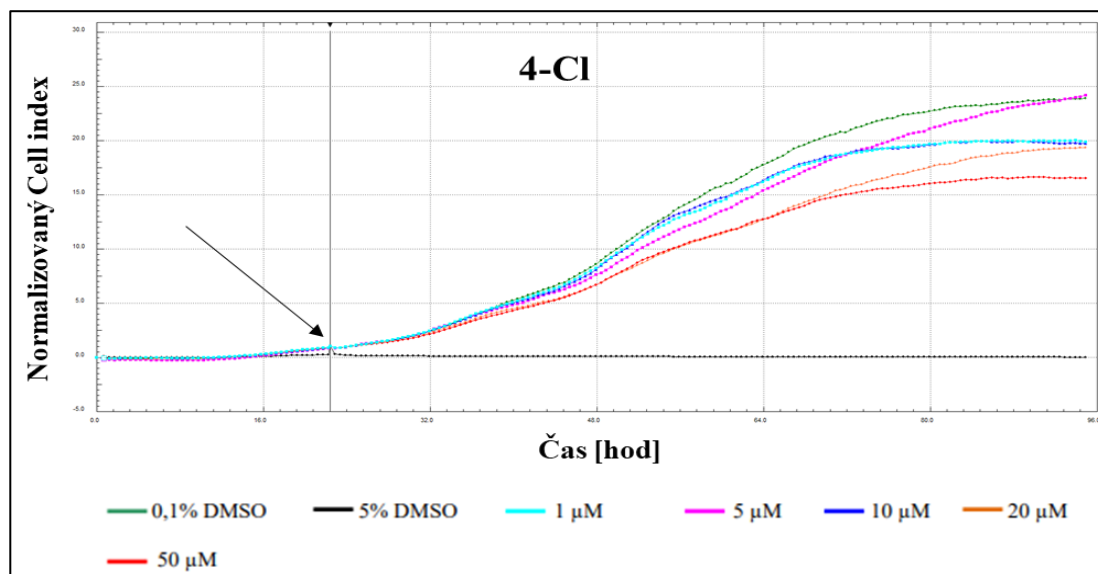
Vliv terpenoidu 4-OBn na proliferaci buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 21. Zpočátku měření až zhruba do 80. hodiny můžeme u koncentrací 1, 5 a 10 μM pozorovat lehce zvýšenou proliferaci, která je charakterizována zvýšeným CI. Po 80. hodině již křivky těchto koncentrací téměř kopírují křivku negativní kontroly. Naopak koncentrace 20 μM zpočátku zcela kopíruje křivku negativní kontroly, ale zhruba od 60. hodiny můžeme pozorovat lehce snížený CI oproti negativní kontrole. Nejvýrazněji snížený CI lze vidět u koncentrace 50 μM . Z tohoto výsledku je patrné, že terpenoid 4-OBn má pouze minimální vliv na proliferaci buněčné linie A549.

Graf 21 - Vliv terpenoidu 4-OBn na proliferaci buněčné linie A549. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



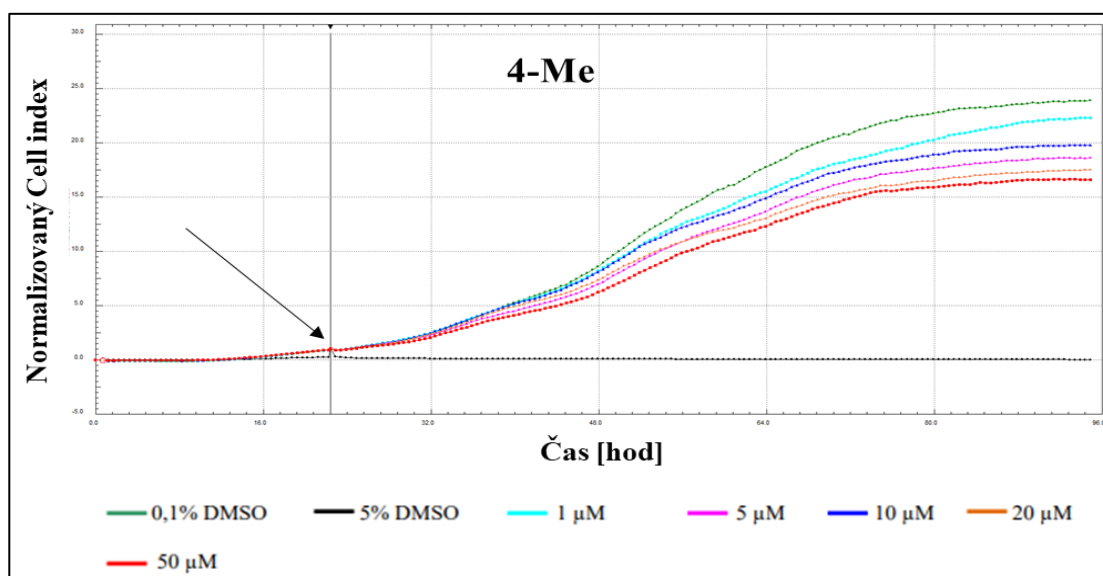
Vliv terpenoidu 4-Cl na proliferaci buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 22. Drobné snížení proliferace buněk lze vidět u koncentrací 1, 5 a 10 μM . U koncentrace 5 μM se hodnoty CI ke konci měření vrátili k hodnotě negativní kontroly. Zřetelnější pokles CI lze pozorovat u koncentrací 20 a 50 μM . Z tohoto grafu je patrné, že terpenoid 4-Cl má se zvyšující se koncentrací výraznější vliv na proliferaci buněk.

Graf 22 - Vliv terpenoidu 4-Cl na proliferaci buněčné linie A549. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



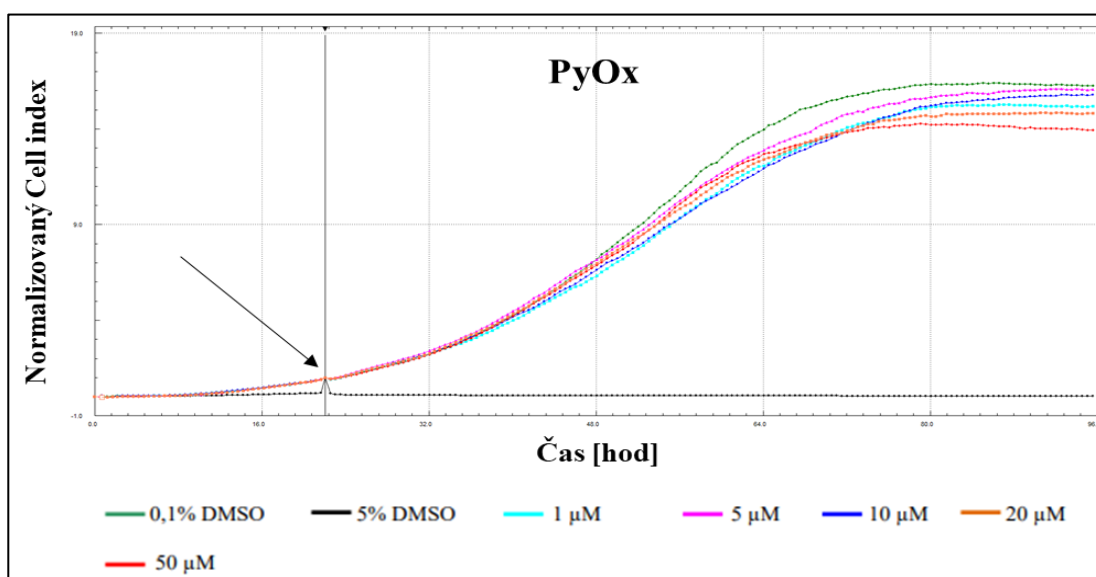
Vliv terpenoidu 4-Me na proliferaci buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 23. U všech testovaných koncentrací (1, 5, 10, 20 a 50 μM) došlo k určitému poklesu CI. Čím vyšší koncentrace testovaného terpenoidu je, tím se CI a proliferace buněk snižuje. U koncentrace 1 μM došlo na konci měření ke zvýšení CI, který se blíží ke křivce negativní kontroly. U ostatních testovaných koncentrací se CI ke konci měření neblížil ke křivce negativní kontroly, tak jako tomu je v případě koncentrace 1 μM . Z tohoto grafu vyplývá, že testovaný terpenoid 4-Me má výraznější vliv na proliferaci buněčné linie A549. Jak je z grafu patrné, nejvyšší vliv na proliferaci má terpenoid 4-Me při koncentraci 50 μM .

Graf 23 - Vliv terpenoidu 4-Me na proliferaci buněčné linie A549. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



Vliv terpenoidu PyOx na proliferaci buněčné linie A549 je znázorněn v grafu 24. Koncentrace 1, 5 a 10 μM ke konci měření téměř kopírují tmavě zelenou křivku negativní kontroly. Lehce snížený CI je pozorovatelný u koncentrací 20 a 50 μM zhruba od 64. hodiny. Nejvyšší pokles buněčné proliferace je u tohoto grafu patrný ke konci měření u koncentrace 50 μM . Z tohoto výsledku lze však usuzovat, že terpenoid PyOx nemá zásadní vliv na proliferaci u buněčné linie A549.

Graf 24 - Vliv terpenoidu PyOx na proliferaci buněčné linie A549. Šipka označuje čas, kdy byly buňky daným terpenoidem ovlivněny.



5 DISKUZE

Terpeny a jejich deriváty (terpenoidy) patří mezi důležité organické sloučeniny, které jsou zejména rostlinného původu. Terpeny a terpenoidy tvoří největší a strukturně nejrozmanitější skupinu přírodních produktů. Nejhojněji jsou zastoupeny v éterických olejích, které se získávají ze stálezelených rostlin a jehličnanů a jsou často zodpovědné za charakteristickou vůni těchto rostlin. V posledních letech tvoří velmi významný zdroj pro kosmetický, potravinářský, ale zejména zdravotnický průmysl (Thurman, 2020, Sommano, 2020, Alemдар, 2017, de Matos, 2019). Obrovský potenciál mají zejména ve zdravotnictví, jelikož se vyznačují velkým množstvím biologických aktivit (antimikrobiální, protinádorová, antivirová, antifungální atd.) a vykazují tak velké množství léčebných účinků. Terpeny a jejich deriváty jsou jedny z nejdůležitějších bioaktivních sloučenin pro přípravu a testování nových léků, protože jsou jednak přírodního původu a současně nevykazují závažné vedlejší účinky. V současné době dochází k velkému růstu rezistence mikroorganismů (např. MRSA) na aktuálně podávané syntetické léky, což může v nedaleké budoucnosti představovat závažný problém. Synteticky připravené léky často vykazují závažné vedlejší účinky a tím mohou negativně ovlivňovat celkový výsledek léčby. Z tohoto důvodu jsou terpeny a terpenoidy, jakožto přírodní produkty, předmětem mnoha výzkumů zaměřených na vývoj nových léčiv (Cox-Georgian, 2019, Sakkas, 2017, Jawaid, 2017).

Výzkum a vývoj nových léků je časově a finančně velmi náročný proces. Vývoj jednoho léčiva trvá od zahájení po uvedení na trh v průměru 12 – 15 let. Stále se zvyšující časová i finanční náročnost souvisí se snahou uvádět na trh bezpečnější a účinnější léčiva. Vývoj nového léku probíhá obvykle ve čtyřech na sebe navazujících stádiích - *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, *in homo*. Na *in vitro* modelech (buněčné kultury, tkáně) se léčivo testuje z hlediska toxicity a farmakologických vlastností. Na *in vivo* modelech (např. hlodavci, králík domácí) se pak studují a ověřují farmakologické vlastnosti, chronická a subchronická toxicita. Zároveň se vyvíjí analytické metody na stanovení dané látky v plazmě a moči. Po těchto preklinických testech následuje klinická fáze testování. Vlastní klinický vývoj nového léčiva (*in homo*) probíhá zpravidla ve čtyřech fázích a vzhledem k tomu, že tato část výzkumu zahrnuje zapojení lidských subjektů, je velmi přísně regulována (Součková, 2015).

V této diplomové práci byl testován cytotoxický účinek šesti nově syntetizovaných terpenoidů (3-Me, 4-COOHCP, 4-OBn, 4-Cl, 4-Me a PyOx) s potenciálně terapeutickými účinky. Testování těchto terpenoidů bylo provedeno v koncentračním rozmezí 1 – 50 μM .

Pro stanovení cytotoxicity terpenoidů byly použity dvě různé buněčné linie. První linií byla MCF7. Konkrétně se jedná o adherentní linii buněk lidského adenokarcinomu prsu. Druhou linií pak byla A549, což je adherentní linie buněk lidského adenokarcinomu plic. Pro studium cytotoxicity terpenoidů byly použity dvě nezávislé metody, XTT test a metoda xCELLigence RTCA SP. Výsledky u obou těchto nezávislých metod vykazují velmi podobný trend.

První použitou metodou pro testování cytotoxicity nově syntetizovaných terpenoidů byl XTT test. Principem XTT testu je redukce tetrazoliové soli XTT na oranžový formazan pomocí mitochondriálních dehydrogenáz, které jsou přítomny u živých buněk (Wang, 2011). Jako negativní kontrola, při tomto testu, byl využit 0,1% DMSO, a jako pozitivní kontrola pak 100 μM CisPt. XTT test byl vyhodnocován 24 hodin po ovlivnění příslušným terpenoidem. Po ovlivnění buněk koncentracemi 1, 5 a 10 μM nelze v naprosté většině případů pozorovat žádný, nebo pouze velmi mírný pokles viability. K citelnějšímu poklesu viability dochází až u koncentrací 20 a 50 μM . U nejvyšší použité koncentrace (50 μM) se pak viabilita buněk pohybovala okolo 80 %. Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že nově syntetizované terpenoidy nemají na viabilitu buněk zásadní vliv. Nejvíce cytotoxickým terpenoidem je tak na základě XTT testu terpenoid označený jako 4-OBn, a to vůči buněčné linii MCF7. V případě linie A549 pak nejvyšší cytotoxicitu vykazoval terpenoid s označením 3-Me. V obou případech byly statisticky významné koncentrace 10, 20 a 50 μM a viabilita buněk se po ovlivnění nejvyšší koncentrací pohybovala okolo 80 %.

Druhou použitou metodou pro testování cytotoxicity nově syntetizovaných terpenoidů byla metoda xCELLigence, která umožňuje monitorovat celý průběh analýzy v reálném čase. Principem této metody je měření impedance po přisednutí buněk na dno jamky speciální E-destičky, které je pokryté zlatými elektrodami. Hodnoty impedance jsou následně pomocí softwaru převedeny na bezrozměrný cell index (CI) (Ke, 2011, Kho, 2015). Také zde bylo jako negativní kontrola použito 0,1% DMSO. Jako pozitivní kontrola pak bylo použito 5% DMSO. Při této metodě byla buněčná proliferace monitorována po dobu 72 hodin od ovlivnění. I přesto, že princip metody xCELLigence je zcela odlišný od principu XTT testu, můžeme ve výsledcích metody xCELLigence vidět velmi podobný trend jako u XTT testů. I při použití metody xCELLigence byl nejvíce cytotoxickým terpenoidem vůči buněčné linii MCF7 terpenoid s označením 4-OBn. Zde došlo k nejvíce znatelnému poklesu CI v porovnání s ostatními terpenoidy. Nejméně cytotoxický terpenoid vůči buněčné linii MCF7 je stejně jako u XTT testu terpenoid s označením 4-Me, protože nedošlo k poklesu

CI a proliferační křivky všech použitých koncentrací téměř zcela kopírují křivku negativní kontroly. Terpenoid s označením 3-Me vykazuje u buněčné linie A549 znatelné snížení CI u koncentrací 10, 20 a 50 μM , což taktéž koresponduje s výsledky XTT testu. Z výsledků obou nezávislých metod (XTT test, systém xCELLigence) použitých v této práci vyplývá, že cytotoxicita většiny testovaných terpenoidů je dávkově závislá.

Tento fakt se uvádí například u studie Pakdemirli a kol. (2020), ve které byl pomocí metody xCELLigence testován cytotoxický účinek monoterpenového fenolu karvakrolu vůči buněčným liniím kolorektálního adenokarcinomu HTC-116 a HT-29. Cytotoxicita byla testována v koncentračním rozmezí 25 - 200 μM . Výsledky studie potvrdily, že se proliferace obou buněčných linií snižovala, zatímco se koncentrace použitého karvakrolu zvyšovala. Také bylo zjištěno, že koncentrace 25 μM nevykazovala znatelný cytotoxický účinek vůči těmto buněčným liniím. Naopak nevýraznější cytotoxický účinek byl pozorován u koncentrace karvakrolu 100 μM . Viabilita buněk po ovlivnění koncentrací karvakrolu 200 μM byla sice nižší než u koncentrace 100 μM , ale tyto hodnoty se výrazně nelišily. Po 48 hodinách od ovlivnění klesla viabilita u buněčné linie HCT-116 o 50 % při koncentraci 92 μM , zatímco u buněčné linie HT-29 to byla hodnota koncentrace 42 μM . Další studií potvrzující dávkově závislý cytotoxický účinek terpenoidů je studie Mektrirat a kol. (2020). Zde byl studován cytotoxický účinek terpenoidů extrahovaných ze zázvoru vůči mononukleárním buňkám periferní krve. Tyto buňky byly ovlivněny koncentracemi terpenoidů v rozmezí 5 – 500 μM . Po ovlivnění koncentracemi 5 a 10 μM se viabilita buněk pohybovala okolo 90 %. V případě ovlivnění koncentrací 50 μM byla zaznamenána viabilita buněk zhruba 80 %. Znatelnější pokles viability byl pozorován až u koncentrací 100 a 500 μM . Zde se viabilita buněk pohybovala zhruba na 60 %. Stejně tak se s narůstající koncentrací terpenoidu postupně snižovala viabilita buněk ve studii Niksic a kol. (2021). Zde byla testována cytotoxická aktivita terpenoidů extrahovaných z tymiánu obecného, který obsahuje p-cymen, γ -terpinen a karvakrol. Testovanými buněčnými liniemi byly MCF7, H460 a MOLT-4. Použité koncentrace pak byly v rozmezí 3,9 – 1000 μM .

I přes poměrně velký počet studií zabývajících se testováním cytotoxicity terpenů a terpenoidů je velmi obtížné porovnávat výsledky s touto prací. A to především z toho důvodu, že v ostatních studiích jsou použity strukturálně odlišné terpenoidy, odlišné metody detekce cytotoxicity, rozdílné buněčné linie a vyhodnocení výsledků bylo prováděno v odlišných časových intervalech. Z těchto důvodů se výsledky jednotlivých testů mohou diametrálně lišit. Ve studii Ren a kol. (2021) byla testována protinádorová aktivita celkem

pěti nových terpenoidů andrastinového typu vůči buněčným liniím SW-480, HCT116 a A549. Cytotoxickou aktivitou vůči těmto liniím vykazoval pouze jeden z pěti použitých terpenoidů. Pokles viability o 50 % u buněčné linie A549 byl zaznamenán po ovlivnění koncentrací látky 82,61 μM . Zbylé čtyři terpenoidy nevykazovaly významné cytotoxické účinky vůči buňkám A549 ani po ovlivnění koncentrací 100 μM . Ačkoliv bylo v této diplomové práci použito jiné rozmezí testovaných koncentrací, můžeme zde najít určitou podobnost. Námi použité terpenoidy vykazovaly pouze mírnou cytotoxicitu vůči buněčné linii A549, kdy se viabilita pohybovala kolem 80 % i u nejvyšší použité koncentrace.

Ve studii Zhao a kol. (2021) byla testována protinádorová aktivita pěti nově objevených terpenů, nazvaných Pestalotis A – E, proti buněčným liniím SW-480, LoVo, HuH-7 a MCF7. Výsledky ukázaly, že tyto sloučeniny vykazují vcelku silnou protinádorovou aktivitu vůči buněčným liniím SW-480, LoVo a HuH-7, přičemž u sloučeniny Pestalosis D došlo k poklesu viability až o 50 % u koncentrace 9,35 μM vůči buněčné linii HuH-7. Naopak u buněčné linie MCF7 došlo k významnému poklesu viability až u koncentrací, které přesahovaly 100 μM , což koresponduje i s našimi výsledky, kdy k významnějšímu poklesu viability došlo u většiny studovaných terpenoidů až u vyšších koncentrací. Tento fakt koresponduje s také výsledky studie Zhao a kol. (2021), kde byla použita buněčná linie MCF7. Ortega a kol. (1993) extrahovali pět nových terpenoidů z měkkého korálů *Eunicella verrucosa*. Tyto terpenoidy byly následně pojmenovány Palmonin A-E. V následující studii se Matulja a kol. (2019) zabývali, zda jsou tyto nově objevené terpenoidy cytotoxicky aktivní vůči nádorovým liniím. Byl pozorován silný cytotoxický účinek terpenoidu s označením Palmonin F vůči buněčné linii MCF7. Bylo zjištěno, že se viabilita buněk linie MCF7 snížila o 92 % po ovlivnění koncentrací 200 μM . Z tohoto výsledku vyplývá, že pro snížení viability buněk MCF7 téměř k nule, byla potřebná velmi vysoká koncentrace studovaného terpenoidu, několikanásobně vyšší než v této práci. Nelze však s jistotou říct, zda by se viabilita buněk takto snížila i po ovlivnění vyššími koncentracemi studovaných terpenoidů v této práci, protože se jedná o strukturně zcela zcela odlišné terpenoidy.

Naopak prakticky žádný vliv na viabilitu buněk linie MCF7, ale i A549, byl v této diplomové práci zjištěn u terpenoidu s označením 4-Me. Prakticky zanedbatelný vliv nově objevených terpenoidů, a to zejména vůči buněčné linii MCF7, byl pozorován také ve studii Pech-Puch a kol (2019). V této studii byl studován cytotoxický účinek sedmi terpenoidů extrahovaných z mořských hub. Tyto terpenoidy byly testovány vůči buněčným liniím

MCF7, A549, A2058, HepG2 a MIA PaCa-2. Bylo zjištěno, že testované terpenoidy vykazují velmi slabou cytotoxickou aktivitu vůči všem těmto nádorovým liniím, a to i v případě použití vyšších koncentrací. U dvou sloučenin ze sedmi použitých nebyl zaznamenán prakticky žádný detekovatelný vliv na buněčnou linii MCF7. Výsledek této studie tak koresponduje i s našimi výsledky, kdy některé z testovaných terpenoidů nevykazovaly žádný, nebo jen minimální cytotoxický vliv vůči použitým buněčným liniím. Je však nutno zároveň dodat, že v obou pracích byly použity jiné terpenoidy.

Testované nově syntetizované terpenoidy mají na použité buněčné linie pouze minimální cytotoxický vliv. I při použití nejvyšší testované koncentrace se viabilita buněk pohybovala okolo 80 %. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že všechny testované terpenoidy se jeví jako perspektivní sloučeniny pro další studium potencionálních terapeutických účinků.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla testována cytotoxicita šesti nově syntetizovaných terpenoidů (3-Me, 4-COOHCP, 4-OBn, 4-Cl, 4-Me a PyOx) pomocí dvou nezávislých metod. Konkrétně se jednalo XTT test a analýzu proliferace buněk v reálném čase pomocí systému xCELLigence. Cytotoxický účinek těchto nově syntetizovaných terpenoidů byl testován na adherentních buněčných liniích lidského adenokarcinomu prsu MCF7 a lidského adenokarcinomu plic A549.

Všechny testované terpenoidy mají pouze minimální vliv na proliferaci a viabilitu použitých buněčných linií. Nejvíce cytotoxickým terpenoidem vůči buněčné linii MCF7 byl terpenoid 4-OBn a vůči buněčné linii A549 pak terpenoid s označením 3-Me. Viabilita buněk po ovlivnění těmito terpenoidy se pohybovala okolo 80 %. Naopak nejméně cytotoxickým terpenoidem vůči oběma liniím byl terpenoid 4-Me. Tento terpenoid neměl na použité linie prakticky žádný cytotoxický vliv. Všechny terpenoidy vykazující pouze mírný cytotoxický účinek se jeví jako perspektivní sloučeniny pro další studium.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ADORJAN, B., BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*. 2010. **25** (6): 407-426.
2. AHARONI, A., GIRI, A. P., DEUERLEIN, S., GRIEPINK, F., DE KOGEL, W. J., VERSTAPPEN, F. W., VERHOEVEN, H. A., JONGSMA, M. A., SCHWAB, W., BOUWMEESTER, H. J. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *The Plant cell*. 2003. **15** (12): 2866–2884.
3. ALEMDAR, S, KÖNIG, J. C, HARTWIG, S., FRISTER, T., SCHEPER, T., BEUTEL, S. Bioproduction of α -humulene in metabolically engineered *Escherichia coli* and application in zerumbone synthesis. *Engineering in Life Sciences*. 2017. **17** (8): 900-907.
4. ASTANI, A., SCHNITZLER, P. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. *Iranian Journal of Microbiology*. 2014. **6** (3): 149-155.
5. BACHER, P., KNIEMEYER, O., TEUTSCHBEIN, J. Identification of immunogenic antigens from *Aspergillus fumigatus* by direct multiparameter characterization of specific conventional and regulatory CD4+ T cells. *The Journal of Immunology*. 2014. **193** (7): 3332-3343.
6. BÁRTÍKOVÁ, H., HANUŠOVÁ, V., SKÁLOVÁ, L., AMBROŽ, M., BOUŠOVA, I. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014. **14** (22): 2478-2494.
7. BEYNON, R. A, RICHMOND, R. C., SANTOS FERREIRA, D. L. Investigating the effects of lycopene and green tea on the metabolome of men at risk of prostate cancer: The ProDiet randomised controlled trial. *The International Journal of Cancer*. 2019. **144** (8): 1918-1928.
8. BHAT, I., YATHISHA, U. G., KARUNASAGAR, I., MAMATHA, B. S. Nutraceutical approach to enhance lutein bioavailability via nanodelivery systems. *Nutroin Reviews*. 2020. **78** (9): 709-724.
9. BONA, E., CANTAMESSA, S., PAVAN, M., NOVELLO, G., MASSA, N., ROCCHETTI, A., BERTA, G., GAMALERO, E. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *Journal of Applied Microbiology*. 2016. **121** (6): 1530-1545.

10. BONCAN, D. A. T., TSANG, S. S. K, LI, C., LEE, I. H. T., LAM, H. M., CHAN, T. F., HUI, J. H. L. Terpenes and Terpenoids in Plants: Interactions with Environment and Insects. *International Journal of Molecular Science*. 2020. **21** (19): 7382.
11. BORELLA, R., FORTI, L., GIBELLINI, L. Synthesis and Anticancer Activity of CDDO and CDDO-Me, Two Derivatives of Natural Triterpenoids. *Molecules*. 2019. **24** (22): 4097.
12. BUSCEMI, S., CORLEO, D., DI PACE, F., PETRONI, M. L., SATRIANO, A., MARCHESINI, G. The Effect of Lutein on Eye and Extra-Eye Health. *Nutrients*. 2018. **10** (9): 1321.
13. CARAZO, A., MACÁKOVÁ, K., MATOUŠOVÁ, K., KRČMOVÁ, L. K., PROTTI, M., MLADĚNKA, P. Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity. *Nutrients*. 2021. **13** (5): 1703.
14. CARVALHO, A. M. S., HEIMFARTH, L., PEREIRA, E. W. M. Phytol, a Chlorophyll Component, Produces Antihyperalgesic, Anti-inflammatory, and Antiarthritic Effects: Possible NFκB Pathway Involvement and Reduced Levels of the Proinflammatory Cytokines TNF-α and IL-6. *Journal of Natural Products*. 2020. **83** (4): 1107-1117.
15. COTÉ, H., BOUCHER, M. A, PICHETTE, A., LEGAULT, J. Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents. *Medicines (Basel)*. 2017. **4** (2): 34.
16. COX-GEORGIAN D, RAMADOSS N, DONA C, BASU C. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. *Medicinal Plants*. 2019. ISBN: 978-3-030-31269-5. 333-359.
17. DE MATOS, S. P., TEIXEIRA, H. F., DE LIMA, Á. A. N., VEIGA-JUNIOR, V. F., KOESTER, L. S. Essential Oils and Isolated Terpenes in Nanosystems Designed for Topical Administration: A Review. *Biomolecules*. 2019. **9** (4): 138.
18. DE SOUSA, I. P., SOUSA TEIXEIRA, M. V, JACOMETTI CARDOSO FURTADO, N. A. An Overview of Biotransformation and Toxicity of Diterpenes. *Molecules*. 2018. **23** (6): 1387.
19. DEL PRADO-AUDELO, M. L., CORTÉS, H., CABALLERO-FLORÁN, I. H. Therapeutic Applications of Terpenes on Inflammatory Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2021. **12**: 704197.
20. DICHTL, K., EBEL, F., DIRR, F., ROUTIER, F. H., HEESEMANN, J., WAGENER, J. Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*. 2010. **76** (5): 1191-1204.

21. DUNĂS, P., MURFIN, L. C., NILSSON, O. J., JAME, N., LEWIS, S. E., KANN, N. Azulene Functionalization by Iron-Mediated Addition to a Cyclohexadiene Scaffold. *The Journal of organic chemistry*, 2020. **85** (21): 13453–13465.
22. DVOŘÁKOVÁ, M., VALENTOVÁ, I., VANĚK, T. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy*. 2011. **105** (11): 839–845.
23. ELAINE, M. A. Terpenes. *Pharmacology - A Handbook for Complementary Healthcare Professionals*. 2009. **22** (1): ISBN: 0-443-06898-4. 167-174
24. FAZLI, A., RODRIGUE, D. Waste Rubber Recycling: A Review on the Evolution and Properties of Thermoplastic Elastomers. *Materials (Basel)*. 2020. **13** (3): 782.
25. FLESHMAN, M. K., RIEDL, K. M., NOVOTNY, J. A., SCHWARTZ, S. J., HARRISON, E. H. An LC/MS method for d8- β -carotene and d4-retinyl esters: β -carotene absorption and its conversion to vitamin A in humans. *Journal of Lipid Research*. 2012. **53** (4): 820-827.
26. GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L., GÓMEZ-CANSINO, R., GARCÍA-ZEBADÚA, J. C., JIMÉNEZ-PÉREZ, N. C., REYES-CHILPA, R. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012. **143** (2): 673-679.
27. HEBLINSKI, M., SANTIAGO, M., FLETCHER, C. Terpenoids Commonly Found in *Cannabis sativa* Do Not Modulate the Actions of Phytocannabinoids or Endocannabinoids on TRPA1 and TRPV1 Channels. *Cannabis Cannabinoid Research*. 2020. **5** (4): 305-317.
28. HILLIER, S. G., LATHE R. Terpenes, hormones and life: isoprene rule revisited. *Journal of Endocrinology*. 2019. **242** (2): 9-22.
29. HUSTER, D., SCHEIDT, H. A., ARNOLD, K., HERRMANN, A., MÜLLER, P. Desmosterol may replace cholesterol in lipid membranes. *Biophysical Journal*. 2005. **88** (3): 1838-1844.
30. HYATT, D. C., YOUN, B., ZHAO, Y. Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2007. **104** (13): 5360-5365.
31. CHACÓN, M. G., MARRIOTT, A., KENDRICK, E. G., STYLES, M. Q, LEAK, D. J. Esterification of geraniol as a strategy for increasing product titre and specificity in engineered *Escherichia coli*. *Microbiology Cell Fact*. 2019. **18** (1): 105.
32. CHADWICK, M., TREWIN, H., GAWTHROP, F., WAGSTAFF, C. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *Int J Mol Sci*. 2013. **14** (6): 12780-12805.

33. CHAVES, N., SANTIAGO, A., ALÍAS, J. C. Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. *Antioxidants*. 2020. **9** (1): 76.
34. CHEN, F., THOLL, D., BOHLMANN, J., PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*. 2011. **66** (1): 212-229.
35. CHEN, N., WANG, S., SMENTEK, L., HESS, B. A. JR., WU, R. Biosynthetic Mechanism of Lanosterol: Cyclization. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 2015. **54** (30): 8693-8696.
36. CHEN, Y., ZENG, H., TIAN, J., BAN, X., MA, B., WANG, Y. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*. 2013. **62** (8):1175-1183.
37. CHEN, Z., ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*. 2014. **30** (2): 271-281.
38. CHENG, J., MILLER, B., BALBUENA, E., EROGLU, A. Lycopene Protects against Smoking-Induced Lung Cancer by Inducing Base Excision Repair. *Antioxidants (Basel)*. 2020. **9** (7): 643.
39. IBÁÑEZ, M. D, BLÁZQUEZ, M. A. Ginger and Turmeric Essential Oils for Weed Control and Food Crop Protection. *Plants (Basel)*. 2019. **8** (3): 59.
40. IBÁÑEZ, M. D., SANCHEZ-BALLESTER, N. M, BLÁZQUEZ, M. A. Encapsulated Limonene: A Pleasant Lemon-Like Aroma with Promising Application in the Agri-Food Industry. A Review. *Molecules*. 2020. **25** (11): 2598.
41. JAWAID, T., GUPTA, R., SIDDIQUI, Z. A. A review on herbal plants showing antidepressant activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011. **90** (24): 3051–3060
42. JIN, J., ZHANG, J. Y., GUO, N. Farnesol, a potential efflux pump inhibitor in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecules*. 2010. **15** (11): 7750-7762.
43. JOO, J. H., JETTEN, A. M. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Letters*. 2010. **287** (2): 123-135.
44. JOU, Y. J., HUA, C. H., LIN, C. S., WANG, C. Y., WAN, L., LIN, Y. J., HUANG, S. H., LIN, C. W. Anticancer Activity of γ -Bisabolene in Human Neuroblastoma Cells via Induction of p53-Mediated Mitochondrial Apoptosis. *Molecules*. 2016. **21** (5): 601.

45. JUNG, Y. Y., HWANG, S. T., SETHI, G., FAN, L., ARFUSO, F., AHN, K. S. Potential Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Properties of Farnesol. *Molecules*. 2018. **23** (11): 2827.
46. KAMATOU, G. P., VERMAAK, I., VILJOEN, A. M., LAWRENCE, B. M. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*. 2013. **96**: 15-25.
47. KATTOOR, A.J., POTHINENI, N. V. K, PALAGIRI, D., MEHTA, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerotic Reports*. 2017. **19** (11): 42.
48. KE, N., WANG, X., XU, X., ABASSI, Y. A. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods in Molecular Biology*. 2011. **740**: 33-43.
49. KHALIL, S., BARDAWIL, T., STEPHAN, C. Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *Journal of Dermatology Treatment*. 2017. **28** (8): 684-696.
50. KHO, D., MACDONALD, C., JOHNSON, R., UNSWORTH, C. P., O'CARROLL, S. J., DU MEZ, E., ANGEL, C. E., GRAHAM, E. S. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors (Basel)*. 2015. **5** (2): 199-222.
51. KIM, S. K., KARADENIZ, F. Biological importance and applications of squalene and squalane. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2012. **65**: 223-233.
52. KIM, T., SONG, B., CHO, K. S., LEE, I. S. Therapeutic Potential of Volatile Terpenes and Terpenoids from Forests for Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Science*. 2020. **21** (6): 2187.
53. LEE, S., JIN, J. X., KHOIRINAYA, C., KIM, G. A., LEE, B. C. Lanosterol influences cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro and improves preimplantation development of cloned embryos. *Theriogenology*. 2016. **85** (4): 575-584.
54. LEI, Y., FU, P., JUN, X., CHENG, P. Pharmacological Properties of Geraniol - A Review. *Planta Medica*. 2019. **85** (1): 48-55.
55. LI, Y., WANG, G. Strategies of isoprenoids production in engineered bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2016. **121** (4): 932-940.
56. LOZAMA, A., PRISINZANO, T. E. Chemical methods for the synthesis and modification of neoclerodane diterpenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009. **19** (18): 5490-5495.

57. LÜDDEKE, F., WÜLFING, A., TIMKE, M. Geraniol and geranial dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. **78** (7): 2128-2136.
58. MAOKA T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*. 2020. **74** (1): 1-16.
59. MARZOCCO, S., SINGLA, R. K., CAPASSO, A. Multifaceted Effects of Lycopene: A Boulevard to the Multitarget-Based Treatment for Cancer. *Molecules*. 2021. **26** (17): 5333.
60. MATULJA, D., KOLYMPADI MARKOVIC, M., AMBROŽIĆ, G., LACLEF, S., PAVELIĆ, S. K., MARKOVIĆ, D. Secondary Metabolites from Gorgonian Corals of the Genus *Eunicella*: Structural Characterizations, Biological Activities, and Synthetic Approaches. *Molecules (Basel)*. 2019. **25** (1):129.
61. MCGENITY, T. J., CROMBIE A. T., MURRELL J. C. Microbial cycling of isoprene, the most abundantly produced biological volatile organic compound on Earth. *The ISME Journal*. 2018. **12** (4): 931-941.
62. MEKTRIRAT, R., YANO, T., OKONOGI, S., KATIP, W., PIKULKAEW, S. Phytochemical and Safety Evaluations of Volatile Terpenoids from Zingiber Cassumunar Roxb. On Mature Carp Peripheral Blood Mononuclear Cells and Embryonic Zebrafish. *Molecules*. 2020. **25** (3): 613.
63. MILANI, A., BASIRNEJAD, M., SHAHBAZI, S., BOLHASSANI, A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*. 2017. **174** (11): 1290-1324.
64. MOOIBROEK H, CORNISH K. Alternative sources of natural rubber. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000. **53** (4): 355-365.
65. MOSQUERA, M. E. G., JIMÉNEZ, G., TABERNERO, V., VINUEZA-VACA, J., GARCÍA-ESTRADA, C., KOSALKOVÁ, K., SOLA-LANDA, A., MONJE, B., ACOSTA, C., ALONSO, R. Terpenes and Terpenoids: Building Blocks to Produce Biopolymers. *Sustainable. Chemistry*. 2021. **2**: 467–492.
66. MOURA, A. P., BELTRÃO, D. M., PITA, J. C., XAVIER, A. L., BRITO, M. T., SOUSA, T. K., BATISTA, L. M., CARVALHO, J. E., RUIZ, A. L., DELLA TORRE, A., DUARTE, M. C., TAVARES, J. F., DA SILVA, M. S., SOBRAL, M. V. Essential oil from fruit of *Xylopija langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. *Pharmaceutical Biology*. 2016. **54** (12): 3093-3102

67. MUHSEEN, Z. T., LI, G. Promising Terpenes as Natural Antagonists of Cancer: An In-Silico Approach. *Molecules*. 2019. **25** (1): 155.
68. NAZZARO, F., FRATIANNI, F., COPPOLA, R., FEO, V. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2017. **10** (4): 86.
69. NCUBE, E. N., STEENKAMP, L., DUBERY, I. A. Ambrafuran (Ambrox™) Synthesis from Natural Plant Product Precursors. *Molecules*. 2020. **25** (17): 3851.
70. NIKSIC, H., BECIC, F., KORIC, E., GUSIC, I., OMERAGIC, E., MURATOVIC, S., MILADINOVIC, B., DURIC, K. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Science Reports*. 2021. **11** (1): 13178.
71. NINKUU, V., ZHANG, L., YAN, J., FU, Z., YANG, T., ZENG, H. Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *International Journal of Molecular Science*. 2021. **22** (11): 5710.
72. NOLAN, J. M., LOSKUTOVA, E., HOWARD, A. N. Macular pigment, visual function, and macular disease among subjects with Alzheimer's disease: an exploratory study. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014. **42**: 1191-1202
73. O'BYRNE, S. M., BLANER, W. S. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *Journal of Lipid Research*. 2013. **54** (7): 1731-1743.
74. OLSEN, T., BLOMHOFF, R. Retinol, Retinoic Acid, and Retinol-Binding Protein 4 are Differentially Associated with Cardiovascular Disease, Type 2 Diabetes, and Obesity: An Overview of Human Studies. *Advanced Nutrients*. 2020. **11** (3): 644-666.
75. ORTEGA, M. J., ZUBÍA, E., SALVA, J. Structure and absolute configuration of palmonine F, a new eunicellin-based diterpene from the gorgonian *Eunicella verrucosa*. *Journal of Natural Products*. 1994. **57**: 1584–1586.
76. PAKDEMIRLI A, KARACA C, SEVER T, DAŞKIN E, LEBLEBICI A, YIĞITBAŞI T, BAŞBINAR Y. Carvacrol alters soluble factors in HCT-116 and HT-29 cell lines. *Turk. Journal of Medical Science*. 2020. **50** (1): 271-276.
77. PECH-PUCH, D., RODRÍGUEZ, J., CAUTAIN, B., SANDOVAL-CASTRO, C. A., JIMÉNEZ, C. Cytotoxic Furanoditerpenes from the Sponge *Spongia tubulifera* Collected in the Mexican Caribbean. *Marine Drugs*. 2019. **17** (7): 416.
78. PEI, H., MA, X., PAN, Y. Separation and purification of lanosterol, dihydrolanosterol, and cholesterol from lanolin by high-performance counter-current chromatography dual-mode elution method. *Journal of Separation Science*. 2019. **42** (12): 2171-2178.

79. PEIER, A. M., MOQRICH, A., HERGARDEN, A. C., REEVE, A. J., ANDERSSON, D. A., STORY, G. M., EARLEY, T. J., DRAGONI, I., MCINTYRE, P., BEVAN, S., PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 2002. **108** (5): 705-715
80. PELLATI, F., BRIGHENTI, V., SPERLEA, J., MARCHETTI, L., BERTELLI, D., BENVENUTI, S. New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules*. 2018. **23** (10): 2639.
81. PERGOLIZZI, J. V., TAYLOR, R., LEQUANG, J.A., RAFFA, R. B. The role and mechanism of action of menthol in topical analgesic products. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2018. **43** (3): 313-319.
82. PETERKOVÁ, L., RIMPELOVÁ, S., KMONÍČKOVÁ, E., RUMML, T. Seskviterpenové laktony: od plevelu k léčivu. *Chemické listy*. 2019. **113** (3): 149-155.
83. PHULARA, S. C., CHATURVEDI, P., GUPTA, P. Isoprenoid-Based Biofuels: Homologous Expression and Heterologous Expression in Prokaryotes. *Applied and environmental microbiology*. 2016. **82** (19): 5730-5740.
84. POŁEĆ, K., OLECHOWSKA, K., KLEJDYSZ, A. The influence of ergosterol on the action of the hop oil and its major terpenes on model fungi membranes. Towards understanding the mechanism of action of phytochemicals for food and plant protection. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2021. **238**: 105092.
85. POPRAC, P., JOMOVA, K., SIMUNKOVA, M., KOLLAR, V., RHODES, C. J., VALKO, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Science*. 2017. **38** (7): 592-607.
86. PRAKASH, V. Terpenoids as cytotoxic compounds: A perspective. *Pharmacognosy Review*. 2018. **12**: 166-176.
87. QINGTAO, N., XIUBO, J., AIHUA, H. Synthesis of spherical *trans*-1,4-polyisoprene/*trans*-1,4-poly(butadiene-*co*-isoprene) rubber alloys within reactor. *Polymer*. 2014. **55** (9): 2146-2152.
88. RAMSEY, L. B., BISHOP, J. R., STRAWN, J. R. Pharmacogenetics of treating pediatric anxiety and depression. *Pharmacogenomics*. 2019. **20** (12): 867-870.
89. REN, J., HUO, R., LIU, G., LIU, L. New Andrastin-Type Meroterpenoids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. *Marine Drugs*. 2021. **19** (4): 189.
90. REN, Y., YU, J., KINGHORN, A. D. Development of Anticancer Agents from Plant-Derived Sesquiterpene Lactones. *Current Medicinal Chemistry*. 2016. **23** (23): 2397-2420.

91. RIVAS DA SILVA, A. C., LOPES, P. M., BARROS DE AZEVEDO, M. M, COSTA, D. C., ALVIANO, C. S, ALVIANO, D. S. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*. 2012. **17** (6): 6305-6316.
92. ROEHM, N. W., RODGERS, G. H., HATFIELD, S. M., GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *The Journal of Immunological Methods*. 1991. **142** (2): 257-265.
93. ROGERIO, A. P., ANDRADE, E. L., LEITE, D. F., FIGUEIREDO, C. P., CALIXTO, J. B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 2009 **158** (4): 1074–1087.
94. ROZZA, A. L., BESERRA, F. P., VIEIRA, A. J., OLIVEIRA DE SOUZA, E., HUSSNI, C. A., MARTINEZ, E. R. M., NÓBREGA, R. H., PELLIZZON, C. H. The Use of Menthol in Skin Wound Healing-Anti-Inflammatory Potential, Antioxidant Defense System Stimulation and Increased Epithelialization. *Pharmaceutics*. 2021. **13** (11): 1902.
95. RUBIOLO, P., SGORBINI, B., LIBERTO, E. CORDERO, C., BICCHI, C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 2010. **25** (5): 282-290.
96. RUDOLF, J. D., CHANG, C. Y. Terpene synthases in disguise: enzymology, structure, and opportunities of non-canonical terpene synthases. *Natural Product Reports*. 2020. **37** (3): 425-463.
97. SAKAI H, MISAWA M. Effect of sodium azulene sulfonate on capsaicin-induced pharyngitis in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2005. **96** (1): 54-59.
98. SAKKAS, H., PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017. **27** (3): 429-438.
99. SALEHI, B., UPADHYAY, S., ERDOGAN ORHAN, I. Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*. 2019. **9** (11): 738.
100. SALES, K. A., PINHEIRO, A. A. V., DE ARAÚJO, D. I. A. F. Dolichocarpols A-F, Unprecedented Macrocyclic Humulene-Type Sesquiterpenoids from *Anaxagorea dolichocarpa*. *ACS Omega*. 2020. **5** (23): 13656-13663.
101. SHANMUGAM, P. M, BARIGALI, A., KADASKAR, J. Effect of lanosterol on human cataract nucleus. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2015. **63** (12): 888-890.

102. SHEN, X., ZHU, M., KANG, L. Lanosterol Synthase Pathway Alleviates Lens Opacity in Age-Related Cortical Cataract. *Journal of Ophthalmology*. 2018. **2018**: 4125893.
103. SHIMIZU, Y., MASHIMA-NEMOTO, T., HAZAWA, M. The hepatoprotective effect of lycopene on Con A-induced liver injury in mice. *Pharmazie*. 2018. **73** (7): 393-395.
104. SILVA, R. O., SOUSA, F. B., DAMASCENO, S. R. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2014. **28** (4): 455-464.
105. SOBRAL, M. V., XAVIER, A. L., LIMA, T. C., DE SOUSA, D. P. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*. 2014. **2014**: 953451.
106. SOLÓRZANO-SANTOS, F., MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012. **23** (2): 136-141.
107. SOMMANO, S. R., CHITTASUPHO, C., RUKSIRIWANICH W., JANTRAWUT P. The Cannabis Terpenes. *Molecules*. 2020. **25** (24): 5792.
108. SOUČKOVÁ, L., KOSTKOVÁ, H., DEMLOVÁ, R. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické lékařství*. 2015. **11** (4): 144–147
109. STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. *Methods in Molecular Biology*. 2011. **740**: 1-6.
110. SURENDRAN, S., QASSADI, F., SURENDRAN, G., LILLEY, D., HEINRICH, M. Myrcene-What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Frontiers in Nutrition*. 2021 **8**: 699666.
111. TAHA, S. A., RAZA, M., EL-KHAWAD, I. E. Effect of ambrein on smooth muscle responses to various agonists. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998. **60** (1): 19-26
112. TANG, G. Techniques for measuring vitamin A activity from β -carotene. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012. **96** (5): 1185-1188.
113. TARIQ, S., WANI, S., RASOOL, W. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2019. **134**: 103580.
114. TENG, Z., KUANG, X., WANG, J., ZHANG, X. Real-time cell analysis--a new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *Journal of Virological Methods*. 2013. **193** (2): 364-370.

115. THURMAN, M. E. Analysis of terpenes in hemp (*Cannabis sativa*) by gas chromatography/mass spectrometry: Isomer identification analysis. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2020. **90** (7): 197-233.
116. TROMBETTA, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. **49** (6): 2474-2478.
117. TROST, B. M., BURNS, A. C., BARTLETT, M. J., TAUTZ, T., WEISS, A. H. Thionium ion initiated medium-sized ring formation: the total synthesis of asteriscunolide D. *Journal of the American Chemical Society*. 2012. **134** (3): 1474–1477.
118. URCAN, E., HAERTEL, U., STYLLOU, M., HICKEL, R., SCHERTHAN, H., REICHL, F. X. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials*. 2010. **26** (1): 51-58.
119. UYEDA, S., SHARMIN, T., SATHO, T. Enhancement and regulation effect of myrcene on antibody response in immunization with ovalbumin and Ag85B in mice. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2016. **34** (4): 314-323.
120. VISHWANATH, V., RAO, H. M. Gutta-percha in endodontics - A comprehensive review of material science. *Journal of Conservative Dentistry*. 2019. **22** (3): 216-222.
121. WANG L, YAN J, FU PP, PAREKH KA, YU H. Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. *Mutation Research*. 2003. **530** (1-2): 19-26.
122. WANG, S., YU, H., WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology In Vitro*. 2011. **25** (8): 2147-2151.
123. WARNATSCH A., TSOUROUKTSOGLU T.-D., BRANZK N., WANG Q., REINCKE S., HERBST S., GUTIERREZ M., PAPAYANNOPOULOS V. Reactive oxygen species localization programs inflammation to clear microbes of different size. *Immunity*. 2017. **46**: 421–432.
124. XING, J. Z., ZHU, L., GABOS, S., XIE, L. Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicology In Vitro*. 2006. **20** (6): 995-1004.

125. YANG, X., GUO, M., WANG, X., HUAN, W., LI, M. Biobased Epoxies Derived from Myrcene and Plant Oil: Design and Properties of Their Cured Products. *ACS Omega*. 2020. **5** (45): 28918-28928.
126. YEO, D., HWANG, S. J., SONG, Y. S., LEE, H. J. Humulene Inhibits Acute Gastric Mucosal Injury by Enhancing Mucosal Integrity. *Antioxidants (Basel)*. 2021. **10** (5): 761.
127. ZHANG, W., MEN, X., LEI, P. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2014. **10** (1): 14-19.
128. ZHANG, Y., LONG, Y., YU, S., LI, D., YANG, M., GUAN, Y., ZHANG, D., WAN, J., LIU, S., SHI, A., LI, N., PENG, W. Natural volatile oils derived from herbal medicines: A promising therapy way for treating depressive disorder. *Pharmacology Research*. 2021. **164**: 105376.
129. ZHAO, D., HU, M., MA, G., XU, X. Five New Terpenes with Cytotoxic Activity from *Pestalotiopsis sp.* *Molecules (Basel)*. 2021. **26** (23): 7229.
130. ZHAO, L., CHEN, X. J., ZHU, J. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature*. 2015. **523** (7562): 607-611.
131. ZHAO, Y., ZHU, K., LI, J., ZHAO, Y., LI, S., ZHANG, C., XIAO, D., YU, A. High-efficiency production of bisabolene from waste cooking oil by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Biotechnology*. 2021. **14** (6): 2497-2513.
132. ZUORRO A. Enhanced Lycopene Extraction from Tomato Peels by Optimized Mixed-Polarity Solvent Mixtures. *Molecules*. 2020. **25** (9): 2038.