

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

ANTIPROLIFERATIVNÍ ÚČINEK EXTRAKTŮ Z *MYRICA*
RUBRA V NÁDOROVÝCH LINIÍCH

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Bc. Barbora Štohanslová

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Na tomto místě bych ráda poděkovala především Prof. RNDr. Lence Skálové, PhD. a Mgr. Veronice Hanušové, PhD. za jejich ochotu, trpělivost, cenné rady a významnou pomoc při vytváření této diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Barbora Štohanslová

Školitel: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Antiproliferativní účinek extraktů z *Myrica rubra* v nádorových liniích**

Myrica rubra je dřevina vyskytující se v jihovýchodní Asii, především v Číně. Plody, listy i kůra z *Myrica rubra* se již dva tisíce let používají v tradiční čínské lidové medicíně. Nedávné studie potvrdily výrazné biologické účinky extraktů z *Myrica rubra* na různé nádorové linie.

Cílem této práce bylo otestovat protinádorovou aktivitu esenciálního oleje z listů *Myrica rubra* na buněčné linie nádorů gastrointestinálního traktu (CACO-2 a HCT-8) a studovat mechanismus jeho účinku z hlediska tvorby volných radikálů a aktivace apoptózy. Rovněž bylo cílem porovnat antiproliferační účinek jednotlivých frakcí esenciálního oleje a dvou nejvíce zastoupených složek v tomto oleji – α -humulenu a β -karyofylenu.

Proliferace buněk byla hodnocena třemi různými metodami (NRU, MTT, x-Celligence), kvantifikace oxidativního stresu byla stanovena pomocí DCF. Expresí apoptotických markerů byla zjišťována pomocí western blot.

Výsledky ukázaly, že esenciální olej z listů *Myrica rubra* inhibuje proliferaci zkoumaných buněčných linií, citlivější se zdá být linie CACO-2.

Ze získaných frakcí se jako nejúčinnější jeví frakce 2, 6 a 7. α -humulen a β -karyofylen měly antiproliferační efekt jen při vyšších koncentracích, účinnější se ukázal α -humulen. Vlivem testovaných látek stoupala produkce volných radikálů v závislosti na čase a koncentraci.

Ovlivnění esenciálním olejem vyvolalo u buněk zvýšenou expresi některých markerů apoptózy – např. kaspázy 3 a Bax proteinu.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Barbora Štohanslová

Supervisor: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Antiproliferative effect of *Myrica rubra* extracts in cancer cell lines**

Myrica rubra is a woody herb planted in south-eastern Asia, especially in China. Berries, leaves and bark of *Myrica rubra* plant have been used in Chinese folk medicine for hundreds of years. Recent studies established significant biological effect of *Myrica rubra* extracts in some of the cancer cell lines.

The aim of this study was to test anticancer activity of essential oil from *Myrica rubra* leaves (MO) to gastrointestinal cell lines (CACO-2 and HCT-8) and study mechanisms of MO effect (production of free radicals and apoptosis activation). Other goal was to compare antiproliferative effect of essential oil's fraction and α -humulene a β -caryophyllene, two most common components found in MO.

Proliferation were evaluated by three different methods (NRU, MTT, x-Celligence), quantification of oxidative stress was researched using DCF. Apoptotic marker expression was examined by western blot.

Results showed *Myrica rubra* oil inhibited the proliferation of investigated cell lines; CACO-2 seems to be more sensitive. From acquired fractions, fraction 2, 6 and 7 appeared to be the most effective. The antiproliferative activity of α -humulene a β -caryophyllene was observed in higher concentrations, α -humulene was more effective.

Production of free radicals was dependent on concentration of MO and time.

The treatment with essential oil induces higher expression of some apoptotic markers in cells – for example caspase 3 and Bax protein.

Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Nádorové buňky	9
2.2. Buněčná smrt.....	10
2.2.1. Nekróza.....	10
2.2.2. Apoptóza.....	10
2.3. Rostlinné látky s cytostatickým účinkem.....	13
2.3.1. Cytostatické účinky esenciálních olejů	15
2.4. Seskviterpeny.....	16
2.4.1. Alifatické seskviterpeny	16
2.4.2. Cyklické seskviterpeny	16
2.5. <i>Myrica rubra</i>	19
2.5.1. Biologické účinky <i>Myrica rubra</i>	20
2.5.2. Listy <i>Myrica rubra</i>	21
3. CÍL PRÁCE	23
4. MATERIÁL A METODIKA	24
4.1. Materiál a chemikálie.....	24
4.2. Pomůcky a přístroje.....	24
4.3. Metodické postupy	25
4.3.1. Příprava extraktu a oleje z <i>Myrica rubra</i>	25
4.3.2. Buňky nádorových linií	25
4.3.2.1. CACO-2 buňky	26
4.3.2.2. HCT-8 buňky	26
4.3.2.3. Rozmrazování buněk	26
4.3.2.4. Rutinní kultivace	27
4.3.2.5. Pasážování buněk.....	27
4.3.2.6. Nasazování buněk do 96-jamkové destičky.....	28
4.3.3. Primární potkaní hepatocyty.....	28
4.3.4. Testy proliferace.....	28
4.3.4.1. Stanovení pomocí neutrální červeně – Neutral Red uptake test	29
4.3.4.2. Stanovení pomocí MTT	30

4.3.4.3.	Kontinuální sledování přístrojem x-Celligence	30
4.3.5.	Kvantifikace oxidativního stresu	31
4.3.6.	Expres markerů apoptózy metodou western blot.....	31
4.3.6.1.	Příprava buněčného lyzátu	31
4.3.6.2.	Stanovení BCA bílkoviny	32
4.3.6.3.	Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu.....	32
4.3.6.4.	Imunobloting.....	36
4.3.6.5.	Detekce proteinů	38
4.3.6.6.	Chemiluminiscenční detekce	39
4.3.6.7.	Znovupoužití membrány	39
5.	VÝSLEDKY	40
5.1.	Optimalizace nasazování buněk před testy buněčné proliferace	40
5.2.	Stanovení antiproliferačního účinku MO a jeho frakcí v nádorových buňkách	40
5.2.1.	Antiproliferační účinek MO	41
5.2.1.1.	Vyhodnocení proliferace buněk testy NRU a MTT	41
5.2.1.2.	Sledování proliferace buněk přístrojem x-Celligence	43
5.2.1.3.	Porovnání hodnot IC_{50} stanovených metodou NRU a pomocí přístroje x-Celligence	44
5.2.1.4.	Vliv MO na expresi markerů apoptózy	45
5.2.2.	Antiproliferační účinek frakcí MO	53
5.2.3.	Antiproliferační účinek α -humulenu a β -karyofylenu	56
5.3.	Vliv MO na oxidativní stres	58
5.4.	Vliv MO na primární kulturu hepatocytů	59
6.	DISKUZE	60
7.	ZÁVĚR	63
	Seznam zkratk.....	64
	Seznam použité literatury	65

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejpálčivějších problémů moderní doby. V Evropě jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí hned po kardiovaskulárních chorobách, ročně jsou zodpovědná za 7,4 milionů úmrtí na světě, 1,7 milionů v Evropě.

V České republice jsou jedním z nejčastěji diagnostikovaných nádorů nádory gastrointestinálního traktu, konkrétně kolorektální karcinom. Ročně je u nás diagnostikováno kolem osmi tisíc nových případů, mortalita se odvíjí podle toho, v jakém stádiu je nemoc diagnostikována. S nádory lokalizovanými ve sliznici v pětiletém horizontu přežívá 80-90% nemocných, penetruje-li nádor střešní stěnu, pak už je to jen 30%. V naprosté většině případů se tento druh nádoru rozvíjí pomalu, stěžejní je proto včasná diagnostika (Šmejkalová, 2013).

Léčba nádorových onemocnění je často agresivní s množstvím vedlejších účinků, náročná časově i finančně a navíc není mnohdy účinná. Proto probíhá snaha o nalezení takových léčivých přípravků, které by ovlivňovaly cílové struktury selektivně a efektivně. V posledních desetiletích se pozornost soustředí i na přírodní látky s biologickými účinky.

Léčba pomocí rostlin na základě empirických zkušeností je tak stará jako lidstvo samo. Ani na počátku třetího tisíciletí neztrácí přírodní léčiva svůj medicínský význam. Jen metody „pokusů a omylů“ nahradily sofistikovanější postupy – určení struktury pomocí chromatografie a hmotnostní spektrometrie; před testy *in vivo* předchází testy *in silico* a *in vitro*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Nádorové buňky

Normální buňka reaguje v organismu na zpětnovazebné homeostatické mechanismy, a podle signálů přicházejících z vnějšího a vnitřního prostředí se buňka chová - dále roste, proliferuje, zůstává v klidové G₀-fázi či přechází do apoptózy. Při nádorové transformaci ztrácí tato buňka schopnost reagovat na určité signály a stává se buňkou schopnou samostatného růstu a invaze – buňkou nádorovou. Její dceřiní buňky tuto mutaci také zdědí a vzniká z nich nádor, který může neomezeně růst.

Nádorové buňky, ať již vzniknou z jakékoliv tkáně, mají několik společných rysů:

- **Vyvinutí nezávislosti na růstových stimulačních signálech** – normální buňky musí mít k zahájení dělení prahovou koncentraci určitých látek (izoleucin, fosfát, epidermální růstový faktor,...), nádorová buňka se dělí i při jejich nedostatku, dokonce, i když při tom může zahynout; může docházet i ke stimulaci pomocí autokrinní sekrece
- **Vznik refrakterního stavu k signálům inhibice růstu a rezistence vůči apoptóze** – ztráta kontaktní inhibice, normální buňka zastaví růst po vzájemném kontaktu, nádorové buňky rostou neorganizovaně přes sebe v několika vrstvách; rezistence k apoptóze souvisí s proteiny rodiny Bcl-2
- **Překonání buněčného stárnutí a vznik neomezené proliferační kapacity** – zvýšená aktivita telomeráz zabraňuje zkracování telomer a tak i buněčnému stárnutí
- **změnami v metabolismu** – podpora enzymů anaerobní glykolýzy a potlačení enzymů oxidace cestou Krebsova cyklu, „uchvacování“ dusíku nádorovými buňkami, zvýšená lipolýza, tvorba nádorových antigenů
- **Invazivita do okolní tkáně a schopnost tvořit metastázy**
- **Podpora angiogeneze** – převaha tvorby proangiogenních faktorů díky hypoxii buněk v nádoru (Masopust a Průša 2003, Tichotová 2012).

2.2. Buněčná smrt

Za fyziologických podmínek prodělává buňka funkční a morfologické změny dané jejím genetickým programem. Menší patologické podněty dokáže většinou zvládnout buněčnými adaptačními mechanismy, buňka si tak nastaví nový a odlišný rovnovážný stav. Je-li zátěž přílišná nebo dlouhodobá, může dojít k poškození buňky. Poškození může být reverzibilní nebo ireverzibilní, při němž dochází k zániku buňky.

Buněčná smrt nastává nejenom jako konečný důsledek závažného poškození buňky (tento druh buněčné smrti má název nekróza), ale může být naprogramován se záměrem normální eliminace pro organismus již nepotřebných buněk. V tomto případě mluvíme o apoptóze.

Zánik buňky, stejně jako její proliferace nebo diferenciace, hrají důležitou úlohu v homeostáze mnohobuněčných organismů (Masopust a Průša 2003).

2.2.1. Nekróza

Nekróza vzniká jako odpověď buňky na závažné nevratné poškození. Příčiny tohoto poškození mohou být charakteru fyzikálního (mechanické poškození, vlnění, teplota), chemického (porušení nutriční rovnováhy, intoxikace) i biologického (infekční agens, genetické abnormality, přehnaná imunitní odpověď) (Masopust a Průša 2003).

Nekróza se vyznačuje jiným průběhem a morfologickými znaky. Jádro buňky se nejprve zmenšuje a srašťuje, dochází k hromadění chromatinu na periferii jádra, poté se jádro rozpadá- karyolýza. Membrány se stávají propustnější a buňka zvětšuje svůj objem, díky denaturaci bílkovin se cytoplazma stává eozinofilní. Aktivuje se enzymatický aparát, který poškozuje buňku samotnou a po rozpadu buňky i okolní tkáň, dochází k rozvoji zánětu. Na rozdíl od apoptózy se jedná o neregulovaný proces (Nachtigal 2011).

2.2.2. Apoptóza

Apoptóza „buněčná sebevražda“ je důležitý proces, bez kterého by lidský organismus nepřežil. Je důležitá nejen v ontogenezi, při vývoji orgánů, ale i během celého života. U dospělého jedince apoptóza vyvažuje buněčnou proliferaci, uplatňuje

se i v obranyschopnosti – apoptózou jsou ničeny například autoreaktivní lymfocyty, buňky napadené virem nebo buňky nádorově zvrhlé (Alberts et al. 2005).

Na rozdíl od nekrózy, kdy dochází k prasknutí buňky, vylití obsahu včetně proteolytických enzymů a poškození okolní tkáně, umírá buňka apoptózou tak, aby sousedící buňky nepoškodila (Alberts et al. 2005).

Buňky v apoptóze se morfologicky liší od ostatních buněk. Svráští se jádro (tzv. pyknóza), chromatin se zhušťuje, v dalších fázích se rozpadá společně s jádrem – karyorexe; dochází k fragmentaci deoxyribonukleové kyseliny - DNA. V cytoplasmě ubývá voda a elektrolyty, buňka se zmenšuje. Na buněčné membráně se tvoří četné výběžky, dochází k degradaci cytoskeletu, endoplazmatického retikula. Nakonec dochází ke vzniku apoptózových tělísek, malých částí buňky, které jsou fagocytovány makrofágy (Silbernagl a Lang, 2001).

Pokud je apoptóza v nerovnováze s buněčnou proliferací, vede to k mnoha patologickým stavům.

Ke zvýšenému odumírání buněk může docházet při ischemiích, intoxikacích, zánětech či ozáření. Zvýšená apoptóza vede k:

- orgánové insuficienci – snížení počtu buněk v pankreatu vede k rozvoji diabetu mellitu I. typu, při postižení erytropoetických buněk vzniká aplastická anémie, u lymfocytů zase imunodeficiency (např. u infekce HIV);
- neurodegenerativním chorobám – Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza,...;
- rejekcím transplantované tkáně.

Naopak při nedostatečné apoptóze může dojít k:

- maligním onemocněním – nejsou ničeny potenciálně nádorové buňky
- vleklým infekcím – neodumírají buňky infikované viry
- autoimunním onemocněním – při nedostatečné apoptóze autoreaktivních lymfocytů (systémový lupus erythematosus,...)
- poruchám embryonálního vývoje – například syndaktylie (Silbernagl a Lang, 2001).

Programovaná buněčná smrt je proces regulovaný mnoha signálními molekulami a drahami, které rozhodují o přežití či smrti buňky. Může být zahájena stimuly z vnějšího prostředí buňky i impulzem vycházejícím z buňky samotné. Podle toho odkud pocházel první stimul, rozlišujeme dvě základní dráhy apoptózy (Lidová, 2010).

Vnější signální dráha

Mezi vnější stimuly způsobující apoptózu patří některé cytokiny – například tumor nektortizující faktor alfa- TNF α nebo interferon gama způsobující apoptózu makrofágů. Některé cytokiny působí jako inhibitory apoptózy a buněčná smrt nastává při jejich nedostatku, příkladem může být interleukin 3. Kromě cytokinů mohou být spouštěčem apoptózy některá xenobiotika, působící přes Fas-receptory; hormony uplatňující se především při ontogenetickém vývoji; či buňky imunitního systému (Lidová 2010, Zhao 2012).

Vnější dráha je iniciována v buňce přes receptory smrti - například TNF α -receptor nebo Fas-receptor. Při vazbě ligandy dochází k oligomerizaci receptorů a to indukuje agregaci prokaspáz (zejména 8 a 12). Jejich dimerizace vede k autokatalýze, aktivaci a zahájení kaspázové kaskády. Kaspáza 8 aktivuje kaspázy 9 a 3, ale i proteiny rodiny Bcl-2 (Lidová 2010).

Vnitřní signální dráha

Vnitřní stimuly k apoptóze jsou například oxidativní stres, UV nebo rentgenové záření nebo změna intracelulární koncentrace vápníku (Zhao, 2012).

Výše zmíněné mechanismy vedou buď ke zvýšení permeability mitochondriální membrány, nebo k poškození jaderné DNA.

Při poškození jaderné DNA se uplatňuje protein p53, zastavuje proliferaci přes aktivaci genu p21, je-li poškození nevratné, iniciuje apoptózu.

Zvýšená permeabilita je z velké míry způsobena nerovnováhou pro- a antiapoptotických faktorů rodiny Bcl-2. Protein Bax tvoří komplexy Bax/Bax, které působí proapoptoticky. Může být vyvazován proteinem Bcl-2, tato vazba ho inaktivuje; podíl Bax/Bcl-2 je důležitý při spouštění apoptózy. Dalším zkoumaným proteinem je Bid, který působí proapoptoticky tak, že vyvazuje Bcl-2.

Zvýšením propustnosti membrány se vyplavuje cytochrom c, váže se na Apaf-1 (apoptotic-protease-activating-factor 1) a tento komplex štěpí a aktivuje prokaspázu 9 (Lidová 2010).

Kaspázy 9 a 3 jsou efektorové kaspázy, které štěpí substrát a zahajují tak vlastní proces apoptózy. Substrátem mohou být aktin (cytoskelet), laminin (membrány), proteiny účastníci se replikace a transkripce a další.

Tyto kaspázy podléhají inhibici - například proteinem X-linked inhibitor of apoptosis protein – XIAP (Zhao, 2012).

2.3. Rostlinné látky s cytostatickým účinkem

Během posledních 60 let bylo objeveno velké množství rostlinných látek, které inhibují proliferaci, indukují apoptózu, zpomalují vznik metastáz, potlačují angiogenezi či zvyšují účinek chemoterapie (Tan et al. 2011).

Některé jsou již používány v klinické praxi či jsou ve fázi klinických studií.

Významnými klinicky používanými cytostatiky jsou **vinca alkaloidy**. Jedná se o poměrně širokou skupinu alkaloidů, které byly objeveny již v padesátých letech minulého století ve výtažku endemické rostliny z Madagaskaru katarantus (*Vinca rosea*), nyní se používají jejich syntetické analogy. V chemoterapii se s úspěchem používají od šedesátých let. Jejich schopnost vazby na tubulin zabraňuje vzniku mikrotubulů a tím i úspěšnému průběhu mitózy nádorových buněk (Oktábec a Jampílek, 2013).

Druhou klinicky významnou skupinou cytostatik jsou **taxany** (např. paklitaxel, docetaxel). Byly izolovány z kůry stromu tisu - *Taxus brevifolia*, nyní se získávají semisynteticky z jehličí tisu červeného (*Taxus baccata*). Ačkoliv byl účinek taxanů studován již v šedesátých letech, v klinické praxi byly registrovány až v roce 1992. Patří mezi ně i jedno z nejznámějších chemoterapeutik vůbec - paklitaxel. Mechanismus účinku je také dán vazbou na mikrotubuly. Tato vazba však způsobuje inhibici depolymerace tubulů, v jejímž důsledku tyto buňky přestávají růst a dělit se (Oktábec a Jampílek, 2013).

V posledních letech byla řada nových cytostaticky činných látek nalezena v asijských rostlinách. Přehled dosavadních poznatků o látkách z čínských rostlin shrnul ve svém článku Tan et al. (2011). Tyto látky patří především do skupiny alkaloidů, terpenů a terpenoidů, chinonů nebo saponinů. Jejich aktivita byla testována *in vitro* i *in vivo*. V následujících odstavcích uvádím přehled několika vybraných látek, vždy jednoho zástupce z každé skupiny.

Kyselina gambogová je zástupcem alkaloidů. Kromě mnoha dalších účinků (protizánětlivý, antipyretický) se prokázal také antiproliferační účinek u mnoha typů

nádorových linií včetně buněk nádoru prsu, plic, jater a glioblastomu. V současné době probíhají v Číně klinické studie. Mechanismus účinku je pravděpodobně vazba na transferinový receptor a následná apoptóza. Apoptózu zároveň spouští i jako antagonistu proteinu Bcl-2.

Kurkumin patří mezi flavinoidy. V Číně probíhá v současné době již druhé stádium klinického testování na rakovinu pankreatu; *in vitro* byl prokázán efekt i na řadu dalších nádorových linií. Kurkumin působí na mnohé struktury indukující jak vnitřní, tak vnější cestu apoptózy. Kromě toho spouští i neapoptotickou buněčnou smrt autofagií.

Artemisin a jeho deriváty strukturně řadíme mezi terpeny, pochází z pelyňku (*Artemisia annua*) a v Číně je používán k léčbě malárie a horečky. Jeho deriváty vykazují antiproliferační aktivitu *in vitro* na celou řadu buněčných linií včetně buněk leukemických, rakoviny prsu, vaječnicků, jater, plic a kolorektálního karcinomu. Deriváty artemisinu působí cytotoxicky produkcí volných radikálů (ROS) a poškozením endoplazmatického retikula. Indukují mitochondriální vnitřní apoptotickou kaskádu zvyšováním koncentrace Bax a snížením koncentrace Bcl-2. Navíc inhibují angiogenezi, čímž snižují tvorbu metastáz.

Kyselina ursolová je jedním ze zástupců terpenoidů a získává se z rostliny ptačí zob (*Ligustrum lucidum*). Jak samotná kyselina, tak její deriváty vykazují *in vitro* antiproliferační aktivitu proti množství buněčných linií, včetně doxorubicin-rezistentním buňkám hepatomu R-HepG2, ovariálnímu karcinomu Caov-3 a prsního tumoru MMTV-Wnt-1. Apoptózu indukuje spuštěním vnější i vnitřní cesty. Aktivuje kaspázu 9, Fas receptor, snižuje u-PA (enzym urokináza) a expresi matrixové metaloproteinázy. Navíc potlačuje angiogenezi.

Emodin patří mezi antrachinony. Jeho antiproliferační vlastnosti jsou prokázány *in vitro* na řadě buněčných linií - nemalobuněčného karcinomu plic, nádoru prostaty nebo žlučníku. Indukuje apoptózu, buňkám způsobuje oxidativní poškození. Výrazně zvyšuje účinnost chemoterapie za pomoci volných radikálů, uvažuje se o něm jako adjuvanci této léčby.

Ginsenosid Rg₃ strukturně jej řadíme mezi saponiny. Jeho antiproliferační aktivita byla prokázána jak *in vitro* tak *in vivo*. *In vitro* se jedná především o buňky kolorektálního karcinomu HCT-116, buňky ovariálního karcinomu a metastáz plicního

karcinomu. Protinádorově působí pomocí inhibice mitózy, replikace DNA. Významným mechanismem je inaktivace jaderného faktoru - kappa B- NF-κB. Právě tento mechanismus souvisí se zvýšením účinnosti chemoterapeutik (taxanů, cisplatiny, doxorubicinu) po přidání ginsenosidu Rg₃ (Tan et al. 2011).

2.3.1. Cytostatické účinky esenciálních olejů

Esenciální olej (vonné silice) jsou rostlinné produkty obsahující především terpeny a terpenoidy, benzoidy a fenylypropanoidy. Používají se při výrobě parfémů a kosmetiky, a také jako aditiva do potravin a nápojů. Svůj význam mají ale i v medicíně.

V nedávné době se objevilo několik studií ukazujících cytostatické účinky esenciálních olejů. Kromě protinádorového působení byla u různých esenciálních olejů odhalena například aktivita analgetická, protizánětlivá, antioxidantní, esenciální oleje působí i proti virům a zvyšují vstřebávání léčiv při transdermálním podání (Adorjan a Buchbauer 2010).

Esenciální olej z šáchoru (*Cyperus kyllingia*) vykazoval antimalarickou a antibakteriální aktivitu (Bhalla et al. 2013).

Sylvester et al. (2005) se zaměřili na protinádorovou aktivitu esenciálního oleje z voskovníku *Myrica gale*. Antiproliferační účinky byly prokázány na buněčných liniích plicního a kolorektálního karcinomu. Se zvyšujícím se množstvím obsahu seskviterpenů v oleji stoupá i protinádorová účinnost, autoři proto navrhuji korelaci těchto dvou faktorů.

Olej z kurkumovníku (*Curcuma zedoaria*) měl významnou antiangiogenní aktivitu, čímž zabraňoval růstu nádorů a tvorbě metastáz (Chen et al. 2011), esenciální olej z *Helichrysum gymnocephalum* vykazoval cytotoxickou a antimalarickou aktivitu (Afoulous et al. 2011).

Kromě těchto studií byly zjištěny antiproliferační či cytotoxické vlastnosti mnoha dalších esenciálních olejů, jejich přehled je uveden v práci Bhalla et al. (2013). Rostlinami, jejichž esenciální oleje působí antiproliferativně jsou například blahovičnick (*Eucalyptus benthamii*), máta (*Mentha piperita*), hřebíček (*Syzygium aromaticum*) a jiné.

Nejvýznamnější složkou esenciálních olejů jsou seskviterpeny, proto budou podrobněji popsány v následující kapitole.

2.4. Seskviterpeny

Seskviterpeny řadíme mezi terpeny. Terpeny jsou rozsáhlá a různorodá skupina látek přírodního charakteru. Nachází se především v rostlinách, některé složitější struktury (například skvalen) nacházíme i u zástupců živočišné říše (Sell 2003).

Terpeny rozdělujeme podle počtu uhlíků - pomocí „izoprenového pravidla“. Izopren (2-methyl-buta-1,3-dien) je považován za základní stavební jednotku terpenů, podle počtu obsažených isoprenů dělíme terpeny na jednotlivé skupiny, kdy každá skupina obsahuje $5n$ uhlíků (kdy n představuje přirozené číslo) (Reusch 2013).

Seskviterpeny jsou tvořeny třemi isopreny; sumární vzorec tedy je $C_{15}H_{24}$, jejich molární hmotnost je 204,35 g/mol.

Seskviterpeny se vyskytují především u rostlin a hmyzu, kde slouží ke komunikaci pomocí chemických sloučenin (feromony, kairomony, ...).

Podle typu řetězce se rozlišují seskviterpeny alifatické a cyklické. Cyklické seskviterpeny se dále dělí na monocyklické, bicyklické a tricyklické (Reusch 2013).

2.4.1. Alifatické seskviterpeny

Zástupcem alifatických seskviterpenů je farnesen. Jeho derivát farnesyldifosfát je meziproduct při syntéze seskviterpenů a seskviterpenoidů. Reakcí geranyldifosfátu s isopentyldifosfátem vzniká farnesyldifosfát - sloučenina s patnácti uhlíky a třemi dvojnými vazbami na poloze dva, šest a deset. Výsledné produkty syntézy se odvíjejí *cis*- a *trans*- konfigurace na jednotlivých násobných vazbách (Sell, 2003).

2.4.2. Cyklické seskviterpeny

Vznikají cyklizací alifatických seskviterpenů, konkrétně z farnesyldifosfátu. Cyklizace je započata ztrátou difosfátu, vznikem allylového kationtu a následnou cyklizací řetězce.

Výsledný produkt závisí na původní konfiguraci farnesyldifosfátu. Po cyklizaci mohou proběhnout další úpravy – izomerace dvojných vazby, oxidace, přesmyky a podobně. Podle počtu cyklů rozlišujeme seskviterpeny monocyklické, bicyklické a tricyklické.

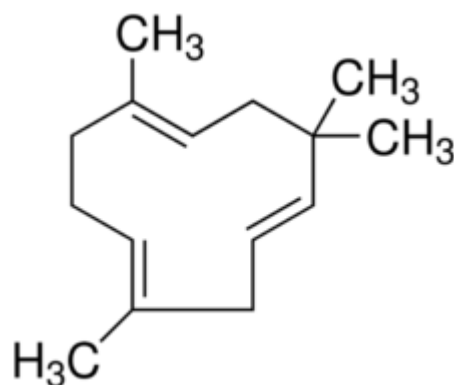
Mezi další zástupce, kromě níže jmenovaných, patří například azuleny, typicky se vyskytující například v silicích čeledi hvězdnicovitých - *Asteraceae* (Sell 2003).

a) α -humulen

Neboli humulon, 3,7,10-humulatrien, alfa-caryofylen, systematickým názvem (1E,4E,8E)-2,6,6,9-tetramethylcykloundeca-1,4,8-trien je monocyklický seskviterpen.

Jeho cyklus je tvořen jedenácti uhlíky a obsahuje tři nekonjugované dvojné vazby. (Pubchem a)

Poprvé byl identifikován v esenciálním oleji chmelu otáčivého (*Humulus lupulus*), odkud pochází i jeho pojmenování. Jeho přítomnost je dokazována ve stále se zvyšujícím počtu rostlin, jako jsou borovice (*Pinus sylvestris*), šalvěj (*Salvia officinalis*), máta (*Mentha piperita*), zázvor (*Zingiber officinale*) nebo konopí seté (*Canabis sativa*) (Bhalla et al., 2013).



Obr. 1 – Struktura alfa-humulenu
(Sigma-Aldrich 2014 a)

α -humulen vykazuje protizánětlivé účinky snížením hladin mediátorů zánětu (interleukin 1, TNF α , prostaglandin E, destičky aktivující faktor...) (Fernandes et al. 2007 Rogerio et al. 2009), antimykobakteriální účinky, působí indukci produkce glutation-S-transferázy. (Pubchem a)

Antiproliferační aktivita byla prokázána několika studiemi. El Hardi et al. (2010) zkoumali aktivitu esenciálního oleje z šalvěje (*Salvia officinalis*) a jeho frakcí obsahujících alfa-humulenu a beta-karyofylen. Obě látky prokázaly protinádorovou aktivitu, alfa-humulenu vykazoval nižší IC₅₀.

Hlavní cytotoxická složka oleje z jedle balzámové (*Abies balsamea*) je také alfa-humulenu; ten snižuje produkci redukovaného glutationu v buňce, zvyšuje tak produkci ROS a tím způsobí zánik buněk (Legault et al. 2003).

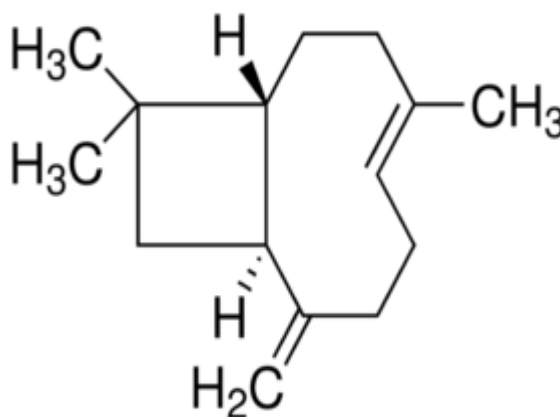
b) Beta-karyofylen

Neboli (trans-) karyofylen má systematický název (1R,4E,9S)-4,11,11-trimetyl-8-metylenbicyklo[7.2.0]-undec-4-en.

Jedná se o bicyklický seskviterpen, kdy jeden z cyklů je tvořen cyklobutanem, v přírodě se téměř nevyskytující strukturou. Na dvojné vazbě v poloze 4 je dvojná vazba

v konfiguraci *trans*. V *cis*-konfiguraci se tato struktura - izokaryofylen – v přírodě vyskytuje v menším množství (Tkachev 1987), a je cytotoxická (Legault et al. 2013, Amiel et al. 2012).

Karyofylen je jeden z nejvíce v přírodě zastoupených seskviterpenů, je možno ho nalézt v celé řadě rostlin, často společně s α -humulenem v konopí setém (*Canabis sativa*), hřebíčku (*Syzygium aromaticum*), chmelu (*Humulus lupulus*), levanduli (*Lavandula angustifolia*), černém pepři (*Piper nigrum*) a mnohých dalších (Gertsch et al. 2008, Tkachev 1988).



Obr. 2- Struktura beta-karyofylenu

(Sigma-Aldrich 2014 b)

Je schválen americkou Food and Drug Administration – FDA jako potravinářské aditivum (FDA 2013).

Na protizánětlivé účinky se soustředili Fernandez et al. (2007), zjistili, že karyofylen snižuje produkci některých mediátorů zánětu a cyklooxygenasy 2, tím přispívá k utlumení zánětlivé reakce. Dále se jako agonista selektivně váže na kanabinoidní receptory CB2 (CB1 receptory mají psychomodulační účinky, CB2 je nemají), tím působí protizánětlivě, analgeticky a antipyreticky. CB2 receptory jsou spojovány i s léčbou a rozvojem osteoporózy a aterosklerózy (Gertsch et al. 2008).

Stejně jako α -humulen, má i β -karyofylen prokazatelně antiproliferační aktivitu. Kubo et al. (1996) prokázali aktivitu proti několika nádorovým liniím solidních tumorů, stejně jako el Hardi (2010). β -karyofylen je významně zastoupen i v olejích či extraktech z rostlin, vykazujících protinádorovou účinnost (Bhalla et al. 2013).

Amiel et al. (2012) zjistili, že karyofylen, hlavní složka esenciálního oleje Myrhovníku (*Commiphora gileadensis*), způsobuje indukci apoptózy, aktivaci endonukleáz a kaspázy-3, a to pouze v nádorově zvrhlých buňkách myšího lymfomu, nikoliv proti buňkám normálním, fibroblastům.

Legault a Pichette (2007) prokázali zvýšení účinnosti léčby α -humulenem, isokaryofylenem a paklitaxelem při současném podání karyofylenu.

Antiproliferační účinnost vykazuje i jeho v přírodě se často vyskytující derivát- β -karyofylen oxid (Jun et al. 2011).

2.5. *Myrica rubra*

Myrica rubra (česky voskovník, čínsky yangmei, japonsky yamamomo) je stále zelený subtropický strom patřící do čeledi *Myricaceae* (Kunghsol et al. 2004).

Ačkoliv se vyskytuje po celé jihovýchodní Asii, kultivace pro komerční účely je omezena výhradně na jeho zemi původu- Čínu. Hlavními ekonomickými producenty jsou především čínské provincie Zhejiang, Jiangsu a Fujian (He et al. 2004).



Obr. 3- Strom *Myrica rubra*
(Yamamomo 2013)

Voskovníku se velice dobře daří v podobných oblastech jako citrusům, oproti citrusům má ale vyšší toleranci k chladu - může růst i v oblastech, kde je zima, teploty však nesmí být nižší než 2°C. Velice důležitým faktorem pro růst i dozrávání plodů je vlhkost vzduchu. Stromům nejvíce vyhovují místa s velkou vlhkostí ve stínu (He et al. 2004, Kunghsol et al. 2004).

Kořeny *Myrica rubra* jsou zapuštěny mělce v zemi. Rostlině svědčí alkalická půda s pH mezi čtyřmi a šesti. Díky symbióze s nitrogenní bakterií *Actinomyces frankia* může růst i v půdách s nedostatkem minerálů a živin, dokonce se jí zde daří lépe než v úrodných půdách. Dobře roste i na úpatích hor i v půdě konzistence hlíny či písku (He et al. 2004).

Jeho plody se mohou vyskytovat ve formě bílých, růžových až tmavě červených bobulí, záleží na kultivaru i zralosti bobulí (Zhang et al. 2008).

Díky své výrazné chuti a časnému dozrávání (plody dozrávají od května do začátku července) je v Číně oblíbeným ovocem. Plody se jedí jednak čerstvé, dále i ve formě džusů, zavařenin, vína apod. (Kunghsol et al., 2004).

V současné době je známo více než tři sta kultivarů *Myrica rubra*, pro komerční účely se používá osmnáct z nich (He et al. 2004).

Z vlastností *Myrica rubra* vyplývá využití. Plody se široce využívají v potravinářství, jak je zmíněno výše; plody, listy, kořeny a kůra jsou součástí tradiční čínské medicíny po mnoho staletí. Díky symbiotickému vztahu s *Actinomyces frankia* je cíleně vysazována pro zvýšení obsahu živin v půdě a tím zvýšení úrodnosti půdy.

Voskovník je vysoký strom s pěkně tvarovanou korunou, odolný vůči nemocem a dobře rezistentní ke smogu, vysazuje se proto i podél silnic nebo se pěstuje v zahradách nejen v Asii, ale i v Turecku a v Evropě. Z kůry stromu se vyrábí barviva využitelná v textilním průmyslu, z plodů se vyrábí potravinářská barviva (He et al. 2004).



Obr. 4 -Plody *Myrica rubra*
(UQ News 2010)

2.5.1. Biologické účinky *Myrica rubra*

Plody, kořeny, listy i kůra mají přes 2000 let své místo i v tradiční čínské a japonské medicíně.

Používají se proti kašli a nachlazení, při trávicích obtížích, jako adstringentium a antidotum, při popáleninách, kožních problémech i bolestech hlavy. Kořeny mají pozitivní účinky na hojení ran, listy se používají k utlumení zánětlivé reakce (Sun et al. 2013).

Studie posledních let podporují roky zkušeností lidové medicíny; pozornost se zaměřuje nejen na účinky částí *Myrica rubra*, ale i na složení a zastoupení látek v nich obsažených. Studovány jsou především plody, listy a kůra, respektive výtažky těchto částí (Sun et al. 2013).

Prokázána byla antioxidační aktivita všech zkoumaných částí. Plody obsahují jednak vitamín C, dále flavinoidy a antocyaniny atd. Obsah těchto látek velice dobře

koreluje s mírou antioxidační aktivity. Mechanismus účinku je různý, jednak zvyšování hladiny redukovaného glutationu v játrech, zvýšení aktivity enzymů glutathionreduktázy, katalázy a superoxiddismutázy nebo vyvazování volných radikálů (Yang et al. 2011).

S antioxidační úzce souvisí antidiabetická aktivita – látky obsažené v plodech mají protektivní účinek proti peroxidu vodíku, tím snižují tvorbu kyslíkových radikálů a zvyšují životnost β -buněk pankreatu (Sun et al. 2012a).

Protizánětlivá a protialergická účinnost je dáвана především do souvislosti s výtažky z listů a kůry; dochází k inhibici tvorby oxidu dusnatého a snížení TNF α , antialergenní působení je zajištěno snížením hladiny β -hexosaminidázy - markeru degranulace (Sun et al. 2013).

Další studie se soustředí na antiproliferační aktivitu. Zkoumány jsou především výtažky z listů, kůry a plodů.

Z výtažku plodů *Myrica rubra* izolovali Sun et al. (2012b) kyanidin-O-glukosidu. Zjistili, že působení této látky na buňky žaludečního karcinomu vede ke snížení proliferace, nižší adhezenci a morfologickým změnám charakteristickým pro apoptózu.

Ve výtažku kůry byl zkoumán anthocyanin prodelfinidin B-2 3,3'-di-O-gallát. Ten indukuje apoptózu u buněk karcinomu prsu MCF-7 a nemalobuněčného plicního karcinomu (Kuo et al. 2004 a, Kuo et al. 2004 b).

Dalším významným je antibakteriální účinek, výtažek z plodů způsobuje inhibici růstu především střevních patogenů – rodů *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* či *Vibrio cholera*. Tyto studie jsou navíc podpořeny léty praxe čínské lidové medicíny, kdy byly výtažky z plodů podávány k léčbě průjmů (Sun et al 2013, Fang 2009).

2.5.2. Listy *Myrica rubra*

Kromě antiproliferační aktivity, která bude probrána níže, mají listy *Myrica rubra* i celou řadu dalších příznivých účinků.

Antioxidační aktivita koreluje s obsahem fenolických sloučenin z extraktu listu, mezi nejvíce zastoupené patří anthocyaniny - především cyanidin-3-glukosid, flavonoly jako myricetin či myricitrin a fenolické kyseliny (Zhang et al. 2008).

Jedná se především o inhibici tyrozinázové a lipoxygenázové aktivity a rovněž o vyvazování volných radikálů (Matsuda et al. 2010).

Listy voskovníku se v čínské lidové medicíně užívají k utlumení zánětu. Za protizánětlivé účinky jsou podle studie zodpovědné flavinoidy, konkrétně například

myricetin a myritricin, kterých obsahují výtažky z listů velké množství. Při podání myricetinu z listů *Myrica rubra* dochází k utlumení chronického i akutního zánětu mechanismem snížení zvýšené permeability cév, snížení počtu leukocytů a menšímu vazivovatění tkáně při chronickém zánětu (Wang et al. 2010).

Myritricin snižuje produkci TNF α a zároveň snižuje i koncentrace imunoglobulinu E v séru, takže kromě protizánětlivých prezentuje i antialergenní účinky. (Shimosaki et al. 2011)

Bylo prokázáno, že extrakt z listů *Myrica rubra* inhibuje růst *in vitro* u buněk lidského karcinomu děložního čípku (HeLa) či u linie myších leukemických buněk, a *in vitro* i *in vivo* u P-388 leukemických myší způsobuje remisi. Jako hlavní sloučeniny způsobující apoptózu u HeLa buněk byly označeny epigalokatechin-3-O-galát a prodelfinidin A-2,3'-O-galát. Obě tyto sloučeniny působí proapoptoticky – aktivují kaspázu-3 (Yang et al. 2003).

V rámci práce naší výzkumné skupiny byl z listů voskovníku připraven esenciální olej. Chemická analýza složení esenciálního oleje pomocí techniky GCxGC-TOFMS ukázala, že hlavní složku esenciálního oleje tvoří seskviterpeny. Hlavní obsahové látky v oleji z *Myrica rubra* uvádí tabulka 1.

Tabulka 1 – Složení esenciálního oleje *Myrica rubra*

Název látky	Obsah látky v esenciálním oleji [%]
β -karyofylen	43,24
α -humulen	21,59
Humulen epoxid	7,59
Valencen	5,97
epi- α -selinen	5,87
γ -muurolen	3,46
β -karofylen oxid	2,60

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

- ✓ Stanovení antiproliferační aktivity esenciálního oleje z *Myrica rubra* na buněčných liniích
- ✓ Stanovení exprese markerů apoptózy po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*
- ✓ Stanovení antiproliferační aktivity frakcí oleje z *Myrica rubra* na buněčných liniích, určení nejúčinnějších frakcí
- ✓ Stanovení antiproliferační aktivity α -humulenu a β -karyofylenu na buněčných liniích
- ✓ Určení vlivu esenciálního oleje z *Myrica rubra* na oxidativní stres
- ✓ Stanovení vlivu esenciálního oleje *Myrica rubra* na primární kulturu hepatocytů

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál a chemikálie

- Buněčné linie CACO-2, HCT-8 – American Type Culture Collection
- Esenciální olej z *Myrica rubra*
- Frakce oleje *Myrica rubra*
- Minimum Essentials Medium Eagle – MEME, RPMI-1640 medium (Medium vyvinuté v Roosevelt Park Memorial Institut), neutrální červeň - Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
 - FBS (fetální bovinní sérum), gentamycin sulfát – Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
 - BSA (hovězí sérový albumin)- Fluka (Praha, ČR)
 - Kity na určení markerů apoptózy (p53, XIAP, Bax, BID, kaspázy 3, 8 a 9) – Cell Signaling Technology (Danver, MA, USA)
 - Amershan ECL Prime Western Blot Detection Reagent - GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, GE)
 - Běžné chemikálie čistoty p.a.

4.2. Pomůcky a přístroje

Pomůcky

Pomůcky pro testy cytotoxicity: sterilní kultivační lahve 75 ml, sterilní pipety, elektrický pipetovací nástavec, sterilní odsávací pipety, kádinky, automatické pipety, sterilní špičky, Bürkerova komůrka, mikrozkuhavky, stojan na mikrozkuhavky, 96jamkové mikrotitrační destičky, destičky „E-plates“, multikanálová pipeta, stopky, rukavice, váženka, gumové rukavice.

Pomůcky pro western blot: Petriho misky, odměrné baňky různých velikostí, stojánky, hřebínky, skla na elektroforézu, nanášecí blok, blotovací sendvič, blotovací houbičky, silné filtrační papíry, membrána, blotovací vana, plastové krabičky, pinzeta.

Přístroje a zařízení

- Laminární box – BioAir AURA 2000 M.A.C.
- Mikroskop – Nikon Eclipse TS 100
- CO₂ inkubátor – HeraCell
- Vodní lázeň – Memmert
- Analytické váhy – Scaltec SBC 22
- Ultrazvukový homogenizátor – Sonoplus Bandewlin HD 2070
- Spektrofotometrický a spektrofluorimetrický analyzátor – Biorad Microplate

Reade 550 a Tecan Infinite M200

- Inkubátor – Eppendorf Thermomixer Comfort
- Kývačka – IKA MS2 Minishaker
- Vortex – LabDancer
- Mrazicí box - HeraFreeze
- xCELLigence RTCA analyzer, Boehringer Mannheim- Roche
- BIO-RAD Power Pac HC
- Gel Logic 2200 Pro

4.3. Metodické postupy

4.3.1. Příprava extraktu a oleje z *Myrica rubra*

Listy *Myrica rubra* byly nasbírány v čínské provincii Zhejiang. Olej byl extrahován přímo z listů metodou hydrodestilace při 160°C, extrakce trvala 8 hodin. Olej byl vysušen přidavkem síranu sodnému anhydrátu a skladován při -20°C.

Rozpouštění a naředění oleje proběhlo v DMSO (dimetylsulfoxid) ještě před přidáním k buněčným liniím.

4.3.2. Buňky nádorových linií

Veškeré použité buňky byly dodány z ATCC (American Type Culture Collection). Buňky byly rozděleny do tří pasáží a alikvoty byly zmrazeny a skladovány v tekutém dusíku. Pro každou sérii pokusů byl rozmražen a použit nový alikvotní vzorek.

4.3.2.1. CACO-2 buňky

Ačkoliv jsou tyto buňky získány z epiteliálního adenokarcinomu tlustého střeva, při kultivaci vyznačují mnohé morfologické znaky společné spíše enterocytům; rostou v jedné vrstvě, jsou polarizované, na apikální straně s mikrokly, klasické je spojení pomocí tight junctions. Jsou adherentní (ATCC a)

Složení kultivačního média

440 ml MEME- Eagle's minimum Essentials medium,
50 ml inaktivovaného fetálního bovinního séra – FBS (10%)
5 ml roztoku neesenciálních aminokyselin (1%)
5ml L-glutaminu (1%)
2,5 ml roztoku penicilinu a streptomycinu (0,5%)

4.3.2.2. HCT-8 buňky

HCT-8 linie je totožná s linií HRT-18. Jejich zdrojem je karcinom ilea 67letého muže. Morfologicky jsou tyto buňky epiteliální; mají pozitivní imunoperoxidázovou reakci na keratin. Jsou adherentní (ATCC b).

Složení kultivačního média

450 ml RPMI-1640 medium
25 ml FBS (5%)
25 ml inaktivovaného koňského séra (5%)
2,5ml roztoku penicilinu a streptomycinu (0,5%)
5ml Na pyruvátu.(1%)

4.3.2.3. Rozmrazování buněk

Oba použité typy buněk byly rozmrazeny velmi podobným postupem. Lišily se pouze v užití příslušného média pro daný typ buněk.

Do 15 ml zkumavky se napipetovalo nezahřáté médium. Zkumavka se zmraženými buňkami se temperovala ve 37°C vodní lázni po dobu 1-2 minut. Poté se rozmražená suspenze napipetovala do zkumavky s médiem, pomocí pipety byla směs homogenizována.

Směs byla následně centrifugována (70xg po dobu 5 minut), odsát se supernatant a sediment se resuspendoval v dalších 15 ml daného kultivačního média. Médium s buňkami bylo přeneseno do T-75 kultivační lahve a buňky se nechaly růst při 37°C s 5% CO₂ v inkubátoru. Druhý den bylo médium vyměněno, pokračovalo se klasickou pasáží.

4.3.2.4. Rutinní kultivace

Při rutinní kultivaci bylo z lahve slito veškeré médium a po stěně se opatrně napipetovalo 13 ml nového, předem vytemperovaného média. Kultivační lahev se znovu uzavřela a vložila do termostatu – 37°C, 5%CO₂.

Médium bylo měněno podle potřeby, se snižujícím se obsahem živin měnilo médium svoji barvu z jasně růžové na oranžovou.

4.3.2.5. Pasážování buněk

Kultivace probíhala v T-75 kultivačních lahvích.

Pasážování buněk se provádělo podle potřeby, u CACO-2 buněk většinou jednou týdně, u HCT-8 buněk dvakrát týdně. Postup u obou typů buněčných linií byl stejný, lišil se pouze použitím různých médií určených pro daný typ buněk.

Buňky se nejdříve dvakrát opláchly fosfátovým pufrům PBS (Phosphate buffer saline), aby se zbavily vápníku a zajistilo se tak správné působení enzymu. Poté byly přidány 2 ml Trypsin-EDTA (předem rozmraženého zahřátého ve vodní lázni na 37°C), kývavými pohyby lahve se zajistilo rozprostření a rovnoměrné působení enzymu.

Vše se nechalo přibližně půl minuty inkubovat. Následovalo odsátí přibližně dvou třetin obsahu a kultivační lahve se vložily do inkubátoru na 3-5 (ne však více než 10) minut. Když získala většina buněk kulovitý tvar, přidalo se 4 ml kultivačního média (opět předem zahřátého na 37°C), tímto bylo zabráněno dalšímu působení enzymu a poškození buněk. Buněčná suspenze byla homogenizována pomocí pipety.

Do další kultivační lahve, kde bylo již předem napipetováno 13 ml kultivačního média, bylo přeneseno přibližně 0,1 ml suspenze, kývavými pohyby byly buňky rozprostřeny po celém dně lahve. Tato kultivační lahev se označila popisem obsahujícím typ buněčné linie, datem a číslem pasáže.

Z buněčné suspenze bylo také možné nasazovat buňky do 96-jamkových destiček.

4.3.2.6. Nasazování buněk do 96-jamkové destičky

Nasazování buněk na pokus probíhalo z buněčné suspenze, která vznikla při pasážování buněk.

Pipetou se odebralo malé množství suspenze, kterou byla naplněna Bürkerova komůrka (na každou polovinu byl použit nový náběr). Buňky se počítaly v 10 středních čtvercích (v každé polovině komůrky 5 čtverců po úhlopříčce) s tím, že se počítaly buňky uvnitř čtverců a ty, dotýkající se dvou sousedících stran – počítány byly buňky dotýkající se pravé nebo horní strany zevnitř i zvenku. Buňky dotýkající se levé nebo dolní strany se nepočítaly.

Podle vzorce byla zjištěna koncentrace (počet buněk/ml) ve čtyřmililitrové buněčné suspenzi: $c = x * 4 * 10^4 * 10$

c.....	počet buněk ve 4 ml suspenze
x.....	průměrný počet buněk v jednom čtverci
$4 * 10^4$	přepočet na 4 ml
10.....	ředění

Z této koncentrace bylo pak trojčlenkou vypočítáno, jak se bude ředit suspenze s médiem k nasazení na destičku.

4.3.3. Primární potkaní hepatocyty

Izolace byla provedena dvoustupňovou metodou za použití kolagenázy.

Buňky jater se nejdříve promyly roztokem solí ve fosfátovém pufru obsahujícím vápník vyvazující látku (EGTA). Poté se promyly fosfátovým pufrům obsahujícím chlorid vápenatý a kolagenázu. Po 5-6 minutách byl pufr nahrazen roztokem BSA (bovinní sérový albumin), vzniklá suspenze se filtrovala a centrifugovala. Peleta buněk se následně resuspendovala a dvakrát promyla ledovým pufrům.

4.3.4. Testy proliferace

Olej byl rozpuštěn a ředěn v 0,1% DMSO. Testované koncentrace se pohybovaly v rozmezí 0,1 – 100 $\mu\text{g/ml}$. Jako kontroly byly použity jednak 0,1% DMSO a 0,1% DMSO s rozpuštěným sojovým olejem o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Jako pozitivní kontrola byl použit 10% roztok DMSO.

Proliferace buněčných linií se zjišťovala po 72hodinové nebo 24hodinové expozici za pomoci barvení neutrální červení, barvením za použití MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid) a pomocí systému x-Celligence. Proliferace hepatocytů byla zjišťována za pomoci MTT po 24hodinové expozici.

4.3.4.1. Stanovení pomocí neutrální červeně – Neutral Red uptake test (NRU)

Neutrální červeň je barvivo, které proniká do živých buněk neionizovanou difuzí a kumuluje se v lysozomech. Pokud je buňka poškozena, ztratí schopnost udržet protonový gradient na membráně lysozomu, dochází ke zvýšení permeability membrány a k vyplavení neutrální červeně.

NRU test byl použit u obou buněčných linií.

V případě CACO-2 buněk bylo nasazováno 500 buněk/100 μ l, po 72hodinové inkubaci byly buňky ovlivněny různými koncentracemi *Myrica rubra* a nechaly se opět inkubovat 72 hodin při 37°C a 5% CO₂.

V případě HCT-8 buněk bylo nasazováno 4000 buněk/100 μ l a nechávaly se inkubovat pouze 24 hodin.

Po ovlivnění buněk různými koncentracemi účinné látky byl už postup pro obě linie stejný.

Nejprve bylo odsáto veškeré médium a přidáno 100 μ l roztoku neutrální červeně v médiu o výsledné koncentraci 40 μ g/ml.

Po tříhodinové inkubaci se odsálo veškeré médium s barvivem a k buňkám se přidalo 100 μ l fixačního roztoku (1g/ 100ml CaCl₂ v 0,5% roztoku formaldehydu). Destičky se nechaly stát 15 minut při pokojové teplotě.

Poté byl fixační roztok slit a bylo přidáno se 200 μ l lyzačního roztoku (1%CH₃COOH v 50% etanolu), destička se nechala třepat 30 minut na kývačce (550 rpm, 25°C).

Tímto došlo k rozrušení buněk a k vylití neutrální červeně do buněčné suspenze. Absorbance se odečítala při 540nm. Při vyhodnocování byla použita hodnota absorbance minus hodnota slepého vzorku.

4.3.4.2. Stanovení pomocí MTT

Pomocí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) jsme zjišťovali životnost jak nádorových buněk, tak i primárních hepatocytů.

MTT je žluté barvivo, které mitochondrie živých buněk přeměňují na fialový formazan.

Na 96-jamkovou destičku bylo nasazeno 500 buněk/100 μ l CACO-2 buněk (kultivace 72 hodin) nebo 4000 buněk/100 μ l HCT-8 buněk (kultivace 24 hodin). Po ovlivnění se buňky nechaly 48 hodin inkubovat.

Poté bylo napipetováno 50 μ l roztoku MTT (3 mg MTT/ 1 ml PBS). Po 1-2 hodinové inkubaci při 37°C, 5% CO₂, bylo médium slito a bylo přidáno 50 μ l lyzačního roztoku (0,08mol/l HCl v izopropanolu), a to i do jamek slepých vzorků.

Buňky se nechaly rozpouštět na kývačce asi 30 minut – do úplného rozpuštění barviva.

Absorbance se měřila při 570 nm a 690 nm.

4.3.4.3. Kontinuální sledování přístrojem x-Celligence

Přístroj X-Celligence umožňuje sledování dynamického procesu v buněčné populaci, jakými jsou buněčná adheze, proliferace, či buněčná smrt.

Buňky jsou nasazeny na destičky „E-plates“, které jsou podobné mikrotitračním destičkám. Každá jamka destičky má však na svém dně zlaté mikroelektrody. Nízké napětí vede ke vzniku elektrického pole mezi elektrodami. Toto pole se mění v závislosti na počtu buněk adherovaných na povrch dna. Výsledný měřitelný signál je vyjádřen jako elektrická impedance, resp. v bezrozměrných jednotkách „buněčného indexu“. Čím silněji buňky adherují nebo čím více buněk je přisedlých na dně jamky, tím vyšší je buněčný index.

Přístroj umožňuje sledování změn buněčného indexu v reálném čase až několik dní, nikoli pouze „end-point“ jako další výše zmíněné metody. Destička „E-plate“, kde probíhá kultivace buněk, je po celou dobu experimentu umístěna přímo v termostatu s 5%CO₂, což umožňuje buňky zároveň pěstovat. (Vatahová, 2012)

Na destičky „E-plates“ bylo do každé jamky nasazeno u CACO-2 buněk 2000 buněk/100 μ l, u HCT-8 buněk 2500 buněk/100 μ l. Buňky se nechaly růst 24 hodin, poté byly ovlivněny stoupajícími koncentracemi oleje z *Myrica rubra*. Ihned po ovlivnění začal přístroj v určitých časových intervalech měřit elektrickou impedanci.

4.3.5. Kvantifikace oxidativního stresu

Pro kvantifikaci uvolněných volných radikálů se používá dichlorofluorescein – DCF.

2, 7 – dichlordifluorescein diacetát je nefluorescentní substrát. Díky působení volných radikálů dochází k přeměně na fluorescentní deriváty. Vyšší vznik volných radikálů je charakterizován i vzestupem fluorescence u tohoto testu. (Wang, Joseph, 1999)

Tento test byl prováděn pouze na linii HCT-8.

Do každé jamky bylo nasazeno 1500 buněk/ 100 μ l a buňky se nechaly růst v inkubátoru 72-96 hodin. Poté bylo odebráno veškeré médium a přidáno se 100 μ l esenciálního oleje (koncentrace 0,1; 0,5; 1; 10; 25; 50 a 100 μ g/ml) rozředěné v PBS. Dále bylo přidáno 100 μ l 10 μ mol/l DCF v PBS. DCF se pipetoval a ředil po tmě.

Destička se vložila na 4 hodiny do inkubátoru. Měření probíhalo v 5minutových intervalech po dobu 60 minut při 37°; excitační vlnová délka byla 490nm, emisní činila 530nm.

4.3.6. Expres markerů apoptózy metodou western blot

Tento experiment se prováděl na CACO-2 buněčné linii.

Na Petriho misky se nasadily CACO-2 buňky. Po 72hodinové inkubaci byly buňky ovlivněny různými koncentracemi esenciálního oleje *Myrica rubra* (1; 25; 30; 50 μ g/ml). Ten se nechal působit 4, respektive 8 hodin. Poté byl z buněk připraven buněčný lyzát.

4.3.6.1. Příprava buněčného lyzátu

Všechny následně popsané kroky bylo třeba provádět na ledu.

Z jednotlivých misek bylo odsáto veškeré médium a buňky byly opláchnuty 3 ml PBS, které bylo následně odsáto do sucha. Přidalo se 150 μ l ledového lyzačního pufru s inhibitory proteáz a ten se nechal působit 2 minuty.

Poté se jednotlivé misky seškrábaly a buňky se opatrně přenesly do 1,5 ml mikrozkuvek postavených na ledu. Škrabka se mezi jednotlivými miskami oplachovala destilovanou vodou a osušila.

Buňky se v mikrozkuvkách homogenizovaly injekční stříkačkou s jehlou. Homogenát se nechal stát 20 minut na ledu. Poté následovala centrifugace v předem

předchlazené centrifuze - 10 minut při 13000 rpm a 4°C. Odebral se supernatant. V této fázi bylo možné buňky zmrazit v případě, že se další postup odkládal. Pokud ne, stanovilo se množství bílkoviny.

4.3.6.2. Stanovení BCA bílkoviny

Proteiny reagují s Cu^{2+} v alkalickém prostředí za vzniku Cu^+ . Tento ion působí jako redukční činidlo, reaguje s BCA (bicinchonic acid) za vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny.

Buňky se naředily 1:9 destilovanou vodou (5 μl buněk:45 μl H_2O). Tato ředění se udělala dvě, z každého ředění se napipetovaly čtyři vzorky do mikrotitrační destičky. 10 μl vzorku se smíchalo s 200 μl roztoku, který vznikl smíšením roztoků

NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 mol/l NaOH
a 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v poměru 50:1.

Směs buněk a roztoku se promíchala a nechala se inkubovat při 37°C 30 minut za třepání 250 rpm.

Absorbance se měřila při 562 nm oproti hodnotě destilované vody (slepý vzorek).

Vzorky byly následně naředěny vzorkovým roztokem s SDS (dodecylsírán sodný) a lyzačním pufrem tak, aby měly všechny vzorky stejnou koncentraci bílkovin.

4.3.6.3. Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu

Zásobní roztoky:

4mol/l HCl

Do 150 ml redestilované vody se přililo 88 ml koncentrované HCl, objem se doplnil v odměrné baňce na 250 ml.

. Roztok se uchovával v lednici.

Zásobní roztok AA + bis AA

Bylo nutné pracovat v rukavicích!

Navážilo se 30g AA (akrylamidu) a 0,8 g bisAA (bis-akrylamidu), to se rozpustilo v malém množství redestilované vody na míchačce, objem se doplnil v odměrné baňce na 100 ml.

Roztok se uchovával v lednici pod argonovou atmosférou

1,5 mol/l Tris-HCl pufr, pH 8,8

Navážilo se 18,5 g Trisu (tris(hydroxymethyl)aminomethan), přidalo se 75 ml redestilované vody, rozpouštělo se mícháním. Poté se upravilo pH na pH-metru pomocí 4 mol/l HCl. Objem se doplnil v odměrné baňce na 100 ml.

Roztok se uchovával v lednici

0,5 mol/l Tris-HCl pufr, pH 6,8

Navážilo se 6 g Trisu, přidalo se 75 ml redestilované vody, rozpustilo se mícháním. Poté se upravilo pH na pH-metru pomocí 4 mol/l HCl. Objem se doplnil v odměrné baňce na 100 ml.

Roztok se uchovával v lednici

10% SDS

Navážilo se 10 g SDS, rozpustilo se v 80 ml redestilované vody a objem se doplnil v odměrné baňce na 100 ml. Roztok se uchovával při laboratorní teplotě.

Koncentrovaný elektrodotový pufr

Navážilo se 72 g glycinu, 15 g Trisu a 5 g SDS, vše se rozpustilo v 900 ml redestilované vody. Na pH-metru se upravilo pH na 8,3 pomocí 4mol/l HCl a objem se doplnil v odměrné baňce na 1000 ml.

. Poté byl pufr rozlit do plastických nádobek po 100 ml a dal se zamrazit.

Zásobní roztoky na ředění vzorků

4xSDS vzorkový pufr

Na přípravu tohoto pufru se smíchaly složky uvedené v tabulce:

Složka + konečná koncentrace	Pipetované množství/navážka
Tris-HCl pufr, pH 6,8 – 200mmol/l	4 ml
Glycerol – 40%	9,41 ml
SDS – 6%	1,2 g
DTT – 0,2 mol/l	0,617 g
Bromfenolová modř	0,1 g
Redestilovaná voda	20 ml

Lyzační pufr

Na přípravu tohoto pufru se smíchaly složky uvedené v tabulce:

Složka + konečná koncentrace	Pipetované množství/navážka
Tris-HCl pufr, pH 7,4 – 50mmol/l	50 ml
NaCl – 150 mmol/l	8,766 g
Glycerol – 10%	117,65 ml
Triton-X-100 – 1%	10 ml
EDTA – 2mmol/l	0,58 g
EGTA – 2mmol/l	0,76 g
β -glycerolfosfát	8,52 g
Na ₂ F – 50 mmol/l	2,09 g
Pyrofosfát sodný – 10 mmol/l	4,46 g
Dithiotreitol – 2mmol/l	0,3085 g
NaVO ₃ - 200 μ mol/l	0,03678 g

Před použitím se ke 13 ml lyzačního pufru přidalo 130 μ l směsi inhibitorů (Sigma-Aldrich) a 130 μ l PMSF(fenylmetansulfonylfluorid). Takto upravený lyzační pufr se neskladoval v mrazáku, ale pouze v lednici.

Izobutanol nasycený vodou

Smíchal se čistý izobutanol s redestilovanou vodou, izobutanol nasycený vodou se nacházel v horní vrstvě. Roztok se uchovával v lednici.

Pracovní roztoky

Separační gel

Na tuto separaci byl použit 12,5% separační gel, 1,5mm silný. Na dva gely bylo třeba množství uvedené v tabulce

Složka	12,5%, 2 gely, 1,5mm
Redestilovaná voda	6,4 ml
Tris-HCl pufr pH 8,8 – 1,5M	5 ml
Roztok AA + bisAA	8,4 ml
10%SDS	0,2 ml
Iniciace polymerace	
Roztok APS	200 μ l
TEMED (v digestoři)	16 μ l

Zaostřovací gel

Používal se 4% zaostřovací gel, silný 1,5 mm. Na dva gely bylo třeba množství uvedené v tabulce.

Složka	12,5%, 2 gely, 1,5mm
Redestilovaná voda	6,1 ml
Tris-HCl pufr pH 6,8 – 1,5M	2,5 ml
Roztok AA + bisAA	1,3 ml
10%SDS	0,1 ml
Iniciace polymerace	
Roztok APS	200 µl
TEMED (v digestoři)	16 µl

10% persíran amonný

25 mg persíranu amonného (APS) se rozpustilo v 250 µl redestilované vody. Tento roztok se připravoval těsně před použitím.

Elektrodotový pufr

70 ml zásobního zaostřovacího pufru se smíchalo s 280 ml redestilované vody.

Postup

Příprava vzorku

Podle zjištěného obsahu bílkoviny se vzorek naředil tak, aby výsledná koncentrace bílkoviny byla 1µg/µl. Vzorek se ředil 4xSDS a lyzačním pufrům s roztoky inhibitorů. SDS pufr tvořilo ¼ celkového objemu, vzniklo tak 1xSDS.

Příprava gelu

Připravil se nalévací stojánek, sklo, sklo se spacerem, spony a hřeben. Skla a hřeben se důkladně omyly saponátem, vodou, redestilovanou vodou, lihometanolem a nechaly se ve svislé poloze uschnout. Skla se přiložila na sebe a spojila se sponami, poté se postavila na gumovou podložku v nalévacím stojánku, přitlačila a přichytila vrchním kolíkem.

V kádince se smíchal roztok na spodní gel, lehce se promíchal pipetou a nalil se mezi skla asi 4,5 cm od spodního okraje. Opatrně se převrstvil izobutanolem nasyceným vodou (200µl) a nechal se 30-60 minut polymerovat.

Po polymeraci se izobutanol slil a gel se opatrně vysušil filtračním papírem. Dále se namíchal roztok na zaostřovací gel, lehce se promíchal a pipetou se nalil na spodní gel až po horní okraj skel. Následně se do něj až po drážky ponořil hřeben; nechal se polymerovat 30 minut.

Gel bylo možné připravit si den dopředu a skladovat ho v lednici.

Elektroforéza

Naředěné vzorky se daly temperovat v předem předeřtém termostatu na 5 minut při 95°C. Vzorky bylo možné následně znovu zamrazit a takto použít opakovaně.

Gely společně se skly se vyndaly ze stojánku, omyly se pitnou a redestilovanou vodou a opatrně se z nich vytáhl hřeben.

Připravil se stojánek na elektroforézu, skla s gelem se přitlačila z každé strany na těsnění, vnitřní část se zasunula do vnější části stojánku na elektroforézu a přitáhla se sponami. Stojánek se poté vložil do vaničky.

Do vnitřního elektrodového prostoru se nalil elektrodový pufr, aby byl ponořen celý gel (cca 125ml) a zkontrolovalo se, zda nepodtéká. Do vnějšího elektrodového prostoru se nalil elektrodový pufr tak, aby hladina byla nad drátkem (cca 200 ml).

Pomocí nanášecího bloku se do každé jamky nanoslo 25 μ l vzorku, do jedné jamky byl nanosen molekulový standard - 5 μ l. Bylo-li jamek víc než vzorků, do krajních jamek byl napipetován 1xSDS zředěný vodou.

Vanička se ponořila do ledové lázně, přiklopila se víčkem a připojila se ke zdroji, nastavilo se konstantní napětí 90 V a spustila se elektroforéza.

Když čelo dosáhlo spodního okraje gelu, zdroj se vypnul.

Stojánek se vyndal z vaničky, elektrodový pufr se vylil (pufr z vnějšího prostoru bylo možno dále uchovávat), povolily se spony, skla s gelem se vyndala. Pomocí zeleného klínku se skla otevřela, gel se odřízl od spacerů a zaostřovacího gelu.

Všechny součásti použité při elektroforéze se důkladně omyly, usušily a uklidily.

4.3.6.4. Imunobloting

Zásobní roztoky

Blotovací pufr

Navážilo se 6,06 g TRIS (25mmol/l), 28,8 g glycinu (192mmol/l) a rozpustilo se v redestilované vodě - 500 ml. Přidalo se 400ml metanolu a objem se doplnil v odměrné baňce na 2000 ml.

Roztok se uchovával v lednici v 1l lahvích.

Postup

Všechny úkony bylo nutno provádět v rukavicích.

Na membránu se propisovací tužkou napsal název proteinu, který je detekován a buněčná linie. Membrána byla aktivována namočením do metanolu – 5 minut. S membránou se manipulovalo pouze pomocí pinzety. Na stranu membrány, kde probíhalo blotování, se rukama vůbec nesahalo. Při manipulaci s membránou bylo nutné vždy mít suché rukavice!

Separční gel oddělený od spodního skla se vložil do blotovacího pufru v plastové krabičce s víčkem. Do tohoto pufru se ponořila i nitrocelulózová membrána aktivovaná metanolem. Tlustý filtrační papír (BioRad, 2 kusy na jeden gel) a blotovací houbičky byly namáčeny také v blotovacím pufru, ale v jiné krabičce. Vše se v blotovacím pufru nechalo cca 20 minut.

Z blotovacího sendviče se vysunula zástrčka a sendvič se začal skládat odspodu směrem nahoru:

- 1 blotovací houbička
- 1 silný filtrační papír
- Gel (žebříček je na pravé straně) – rukama se uhladil, aby se odstranily bubliny
- Membrána – položila se na gel tak, aby byla nápisem dolů, na stejné straně jako žebříček – svrchu se opět uhladila, aby se odstranily bubliny
- 1 silný filtrační papír - od prostředku se uhlazuje prsty – odstranění bublinek
- 1 blotovací houbička

Blotovací sendvič se zavřel a vložil se do blotovacího nástavce (vždy černá strana k černé straně). Nástavec se vložil do vany tak, aby kolíky byly uprostřed, do volného prostoru vany se daly chladicí nádoby s ledem. Celá vana se pak ponořila do ledové lázně, aby nedocházelo ke zbytečnému přehřívání, připojila se pomocí víka s kabely ke zdroji. Zdroj se nastavil na 100 V a 250 mA a zapnul se, pro 1,5milimetrový gel se blotování nechalo běžet hodinu a půl.

Po skončení blotování se opatrně pinzetami vyjmula membrána z blotovacího sendviče.

Veškeré součásti použité při western blotu se opláchly redestilovanou vodou, nechaly se osušit a uklidily se.

4.3.6.5. Detekce proteinů

Zásobní roztoky

0,1 mol/l Tris pufr, pH 8,0

Navážilo se 12,11 g TRISu, toto množství se rozpustilo v 800 ml redestilované vody. pH se upravilo na 8,0 pomocí 4,0mol/l kyseliny chlorovodíkové. V odměrné baňce se roztok doplnil do 1000 ml redestilovanou vodou. Uchovával se v lednici.

TBST (Tris-buffer saline tween)

Navážilo se 8,77 g NaCl, rozpustilo se v asi 300 ml redestilované vody. Přidaly se 3 ml Tweenu 20 a 100ml TRIS pufru, pH 8,0. Roztok se doplnil na 1000 ml redestilovanou vodou. Uchovával se v lednici.

Primární protilátky

Zásobní protilátka se naředila podle pokynů výrobce TBST s 1% BSA (mlékem). Skladovala se v mrazáku, před použitím bylo třeba ji včas vyndat a rozmrazit.

Sekundární protilátky

Zásobní protilátka se naředila podle pokynů výrobce TBST s 1% BSA (mlékem). Skladovala se v mrazáku, před použitím bylo třeba ji včas vyndat a rozmrazit.

Postup

Membrána se pinzetou přenesla do plastové misky s víčkem, veškeré inkubace a oplachování se provádělo ve stejné nádobě, membrány se nevyndávaly, roztoky se z nádoby slévaly.

Stříčkou se do krabičky nalila redestilovaná voda, nádobka se v ruce pokývala, poté se voda vylila. Toto omytí se zopakovalo třikrát.

Na membránu se nalilo přibližně 25 ml 5% roztoku mléka v TBST (BioRad), krabičky se umístily na kývačku a nechaly se alespoň hodinu blokovat.

Poté se roztok s mlékem slil, membrána se opláchla redestilovanou vodou a nechala se okapat.

Následně se membrána inkubovala s primární protilátkou, inkubace probíhala přes noc.

Další den se primární protilátka odpipetovala a zamrazila pro opakované použití, membrána se oplachovala zhruba 15 ml TBST pufru, po 10 minutách se pufr slil. Omytí se opakovalo šestkrát.

Poté se membrána inkubovala 1 - 2 hodiny se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou. Sekundární protilátka se po jejím použití vylila. Pak se membrána oplachovala zhruba 15 ml TBST pufru, po 10 minutách se pufr slil. Omytí se opakovalo šestkrát.

4.3.6.6. Chemiluminiscenční detekce

Vzhledem k použité sekundární protilátce značené křenovou peroxidázou byl použit detekční systém Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent. Roztok A (luminol solution) a roztok B (peroxide solution) se smísily v poměru 1:1.

Z krabičky s membránou se slil TBST pufr, na povrch membrány se napipetovalo tolik roztoku substrátu, aby jí byl pokryt celý povrch membrány (asi 1,5 ml), nechal se inkubovat 5 minut.

Zapnul se počítač a program Carestream.

Membrána se vyndala ze substrátu, nechala se okapat a přenesla se do přístroje Gel Logic (pinzetou, držet za roh), umístila se tak, aby byla vidět na monitoru počítače.

Doba osvitu se mohla měnit podle aktuálních podmínek, začínalo se s 1 minutou, poté se čas případně zkrátil, nebo prodloužil (záleželo především na stáří a typu protilátky). Membrána svítila až několik hodin.

4.3.6.7. Znovupoužití membrány

Membrána se po chemiluminiscenční detekci zabalila do potravinářské folie a dala se do lednice (vydrží i několik týdnů).

K odstranění protilátek se využilo tzv. „stripování“. Membrána se nechala oplachovat ve 30ml stripovacího pufru 30 minut při 50°C.

Poté se membrána opláchla TBST po dobu 15 minut, tento postup se opakoval čtyřikrát. Následně se membrána ponořila na hodinu do roztoku s mlékem.

Další postup byl od kroku přidání primární protilátky totožný s postupem při prvním použití membrány.

5. VÝSLEDKY

5.1. Optimalizace nasazování buněk před testy buněčné proliferace

Na testy s linií CACO-2 bylo do jednotlivých jamek 96jamkové mikrotitrační destičky nasazováno 500 buněk na 100 μ l, inkubace před ovlivněním trvala 72 hodin.

Linie HCT-8 proliferuje rychleji než CACO-2 buňky, proto bylo nejprve nasazeno do každé jamky 250 buněk ve 100 μ l média při 72hodinové inkubaci. I tento počet se ukázal jako příliš vysoký, buňky během pre-inkubace zcela zaplnily dno jamky a přerůstaly přes sebe. Proto byl čas pre-inkubace snížen na 24 hodin, přičemž se nasazovalo 4000 buněk na 100 μ l. V tomto nastavení podmínek bylo už možné provést testy antiproliferační účinnosti oleje z *Myrica rubra* (MO) a jeho frakcí.

5.2. Stanovení antiproliferačního účinku MO a jeho frakcí v nádorových buňkách

V testech buněčné proliferace se zjišťoval antiproliferační účinek MO a jeho jednotlivých frakcí na nádorové buněčné linie CACO-2 a HCT-8.

Životnost buněk byla porovnávána oproti kontrole – roztoku buněk v 0,1% DMSO.

Testované látky byly rozpuštěny v 0,1% DMSO. Před přidáním testovaných látek bylo nezbytné připravené roztoky důkladně promíchat na kývačce. Doba expozice byla stanovena na 48 hodin. Buněčná proliferace byla hodnocena metodami Neutral Red Uptake a MTT a kontinuálně monitorována na přístroji x-Celligence.

Naměřené hodnoty byly zaznamenány v grafu jako závislost životnosti buněk udávané v procentech na koncentraci esenciálního oleje (μ g/ml) či typu frakce. Také byly zjištěny hodnoty IC_{50} , tedy koncentrace, při které cytostatikum sníží proliferaci na 50% buněk.

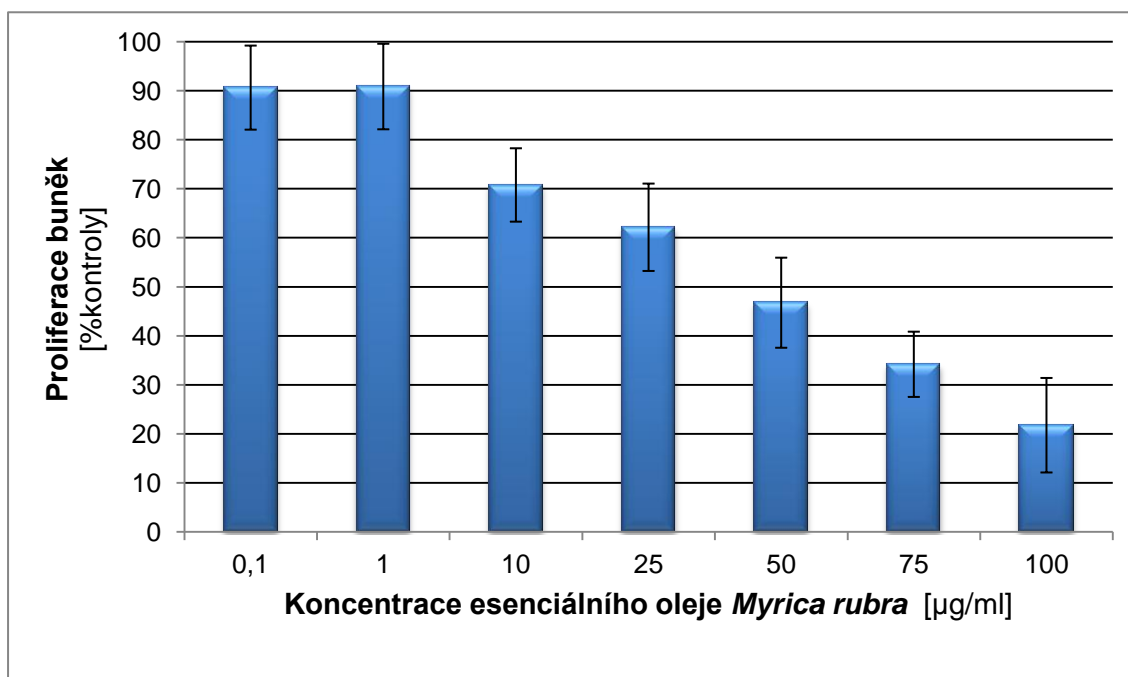
IC_{50} byla stanovena jednak metodami NRU a MTT a další hodnota IC_{50} byla stanovena kontinuálním sledováním proliferace buněk na přístroji x-Celligence.

5.2.1. Antiproliferační účinek MO

5.2.1.1. Vyhodnocení proliferace buněk testy NRU a MTT

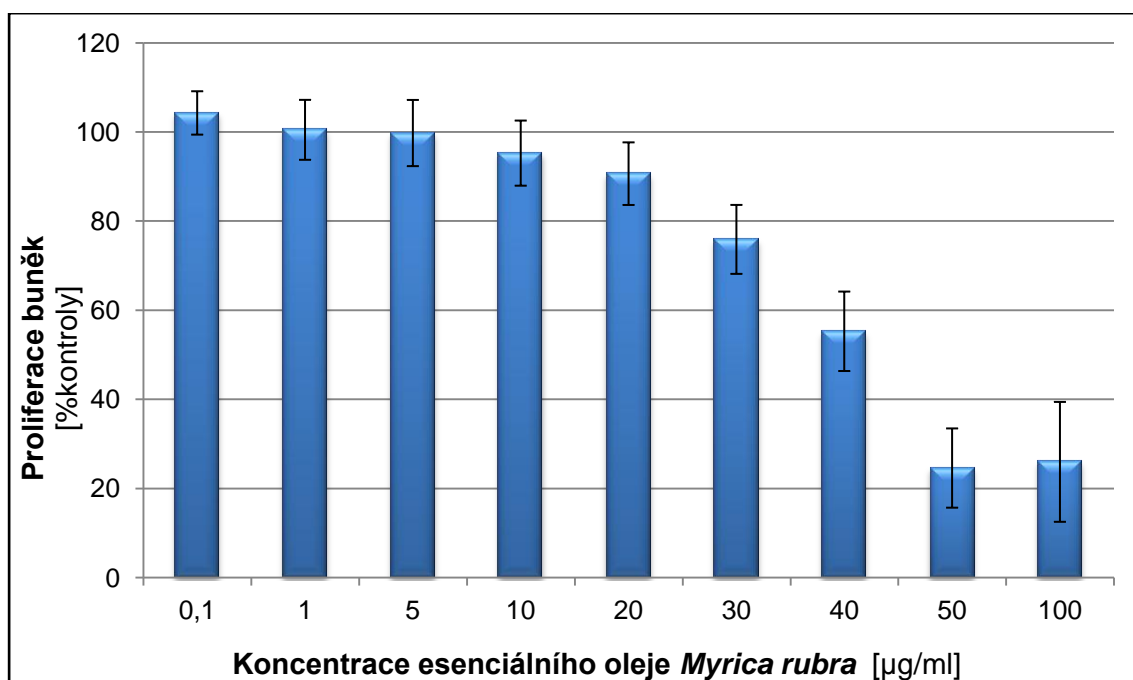
Antiproliferační účinek oleje byl zjišťován v rozmezí koncentrací 0,1-100 µg/ml.

Na linii CACO-2 bylo provedeno hodnocení metodami NRU (Obr. 5) a MTT (Obr. 6), na HCT-8 buněčné linii bylo zhodnocení provedeno pouze za použití neutrální červeně (Obr. 7)

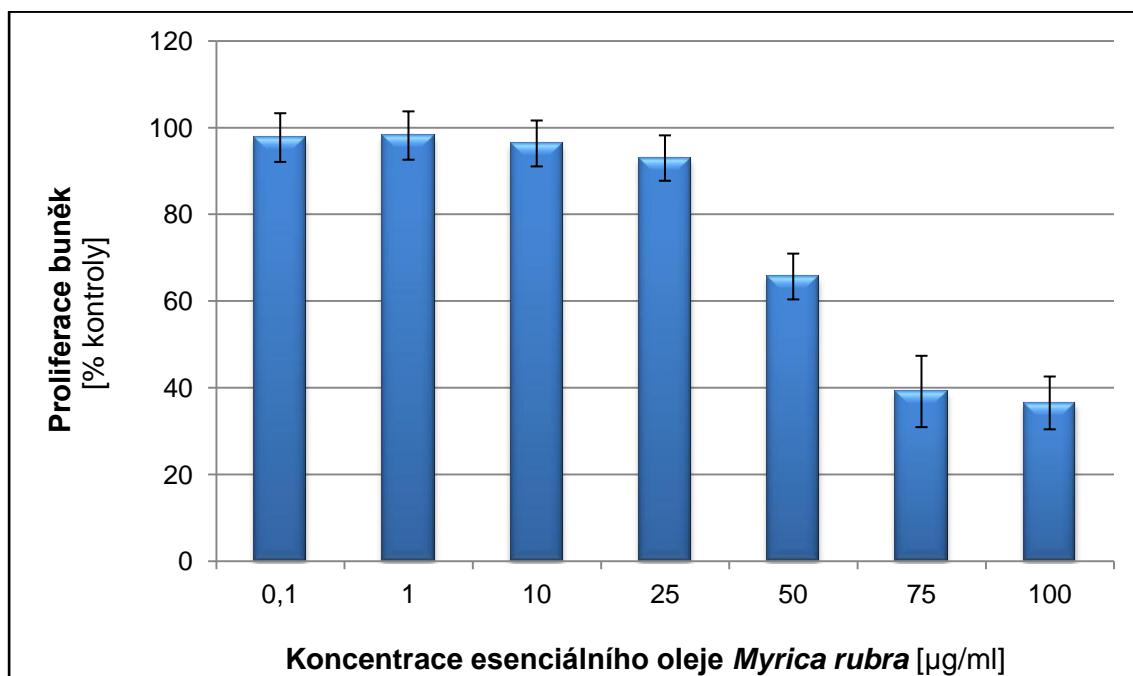


Obr. 5 Porovnání vlivu různých koncentrací MO na proliferaci buněk CACO-2 po 48hodinové expozici – hodnocení NRU testem

Výsledky testů prokazují pokles proliferace buněk ovlivněných olejem *Myrica rubra*. V nižších hodnotách (0,1 - 10 µg/ml) se proliferace buněk nijak zásadně nemění, poté nastává se zvyšující se koncentrací výrazný pokles životnosti. Okolo koncentrace 50 µg/ml se prudký pokles zastaví, některé testy dokonce vykazovaly mírně vyšší viabilitu buněk při koncentraci 100 µg/ml než při 50 µg/ml.



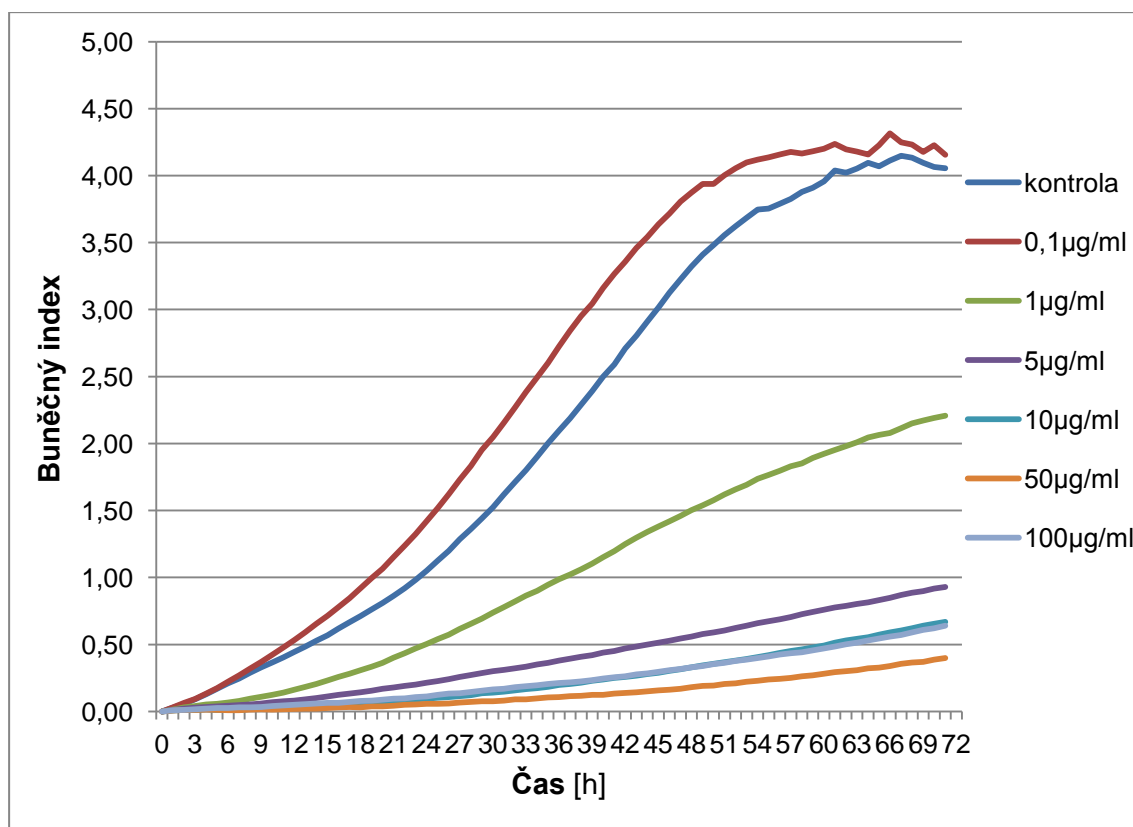
Obr. 6 Porovnání vlivu různých koncentrací MO na proliferaci buněk CACO-2 po 48hodinové expozici – hodnocení MTT testem



Obr. 7 Porovnání vlivu různých koncentrací MO na proliferaci buněk HCT-8 po 48hodinové expozici – hodnocení NRU testem

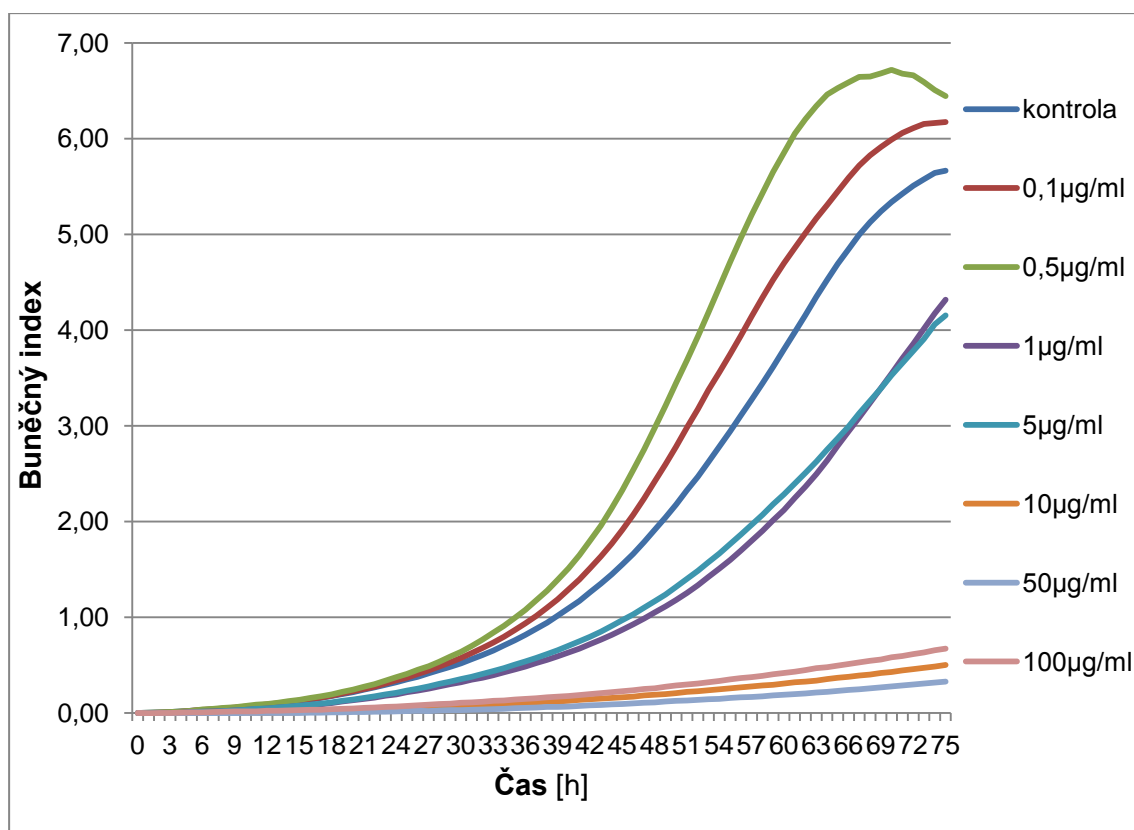
5.2.1.2. Sledování proliferace buněk přístrojem x-Celligence

Účinky esenciálního oleje na obě buněčné linie byly sledovány také kontinuálně pomocí přístroje x-Celligence. Na obrázku 8 a 9 jsou vidět růstové křivky jednotlivých buněčných kultur ovlivněných koncentracemi 0,1-100 $\mu\text{g/ml}$ oleje. Jako kontrola bylo použito 10% DMSO.



Obr. 8 Růstová křivka buněčné linie CACO-2 po ovlivnění různými koncentracemi oleje z *Myrica rubra*

Z výsledků testů na přístroji x-Celligence je patrné výrazné ovlivnění růstu buněk již od koncentrace MO 1 $\mu\text{g/ml}$. Od koncentrace MO 10 $\mu\text{g/ml}$ (u CACO-2 buněk dokonce 5 $\mu\text{g/ml}$) jsou již rozdíly v inhibici buněčného růstu minimální, buněčný index těchto koncentrací je nižší než jedna.



Obr. 9 Růstová křivka buněčné linie HCT-8 po ovlivnění různými koncentracemi oleje z *Myrica rubra*

5.2.1.3. Porovnání hodnot IC_{50} stanovených metodou NRU a pomocí přístroje x-Celligence

Z výsledků testů za použití neutrální červeně a pomocí přístroje x-Celligence byla stanovena hodnota IC_{50} pro každou buněčnou linii, jsou uvedeny v tabulce 2. Buněčná linie CACO-2 je o něco málo více citlivá při použití oleje *Myrica rubra*. Výrazné rozdíly IC_{50} jsou mezi oběma metodami, pravděpodobně kvůli schopnosti esenciálního oleje snižovat adhezi buněk k povrchům.

Tabulka 2 - Hodnoty IC_{50} pomocí NRU a přístroje x-Celligence

Buněčná linie	IC_{50} – pomocí NRU	IC_{50} – pomocí x-Celligence
CACO-2	31,98±0,04	1,483±0,11
HCT-8	49,47±0,02	5,935±0,05

5.2.1.4. Vliv MO na expresi markerů apoptózy

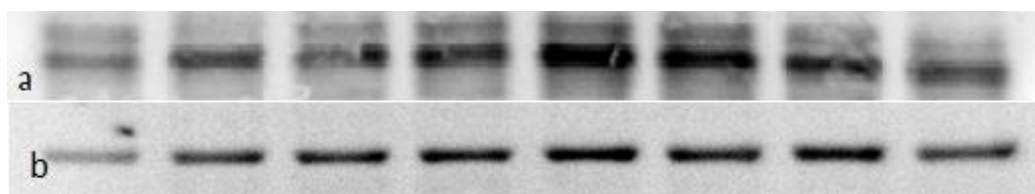
Hodnocení proapoptotických markerů probíhalo na buněčné linii CACO-2. Buňky byly ovlivněny koncentracemi oleje *Myrica rubra* – 1, 30, 50 $\mu\text{g/ml}$ nebo 1, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$. Protože proteinů nebylo extrahováno vždy stejné množství, výsledek není udáván jako množství tohoto proteinu, ale jako jeho poměr oproti α -tubulinu, který je v buňkách exprimován v konstantním množství.

p53

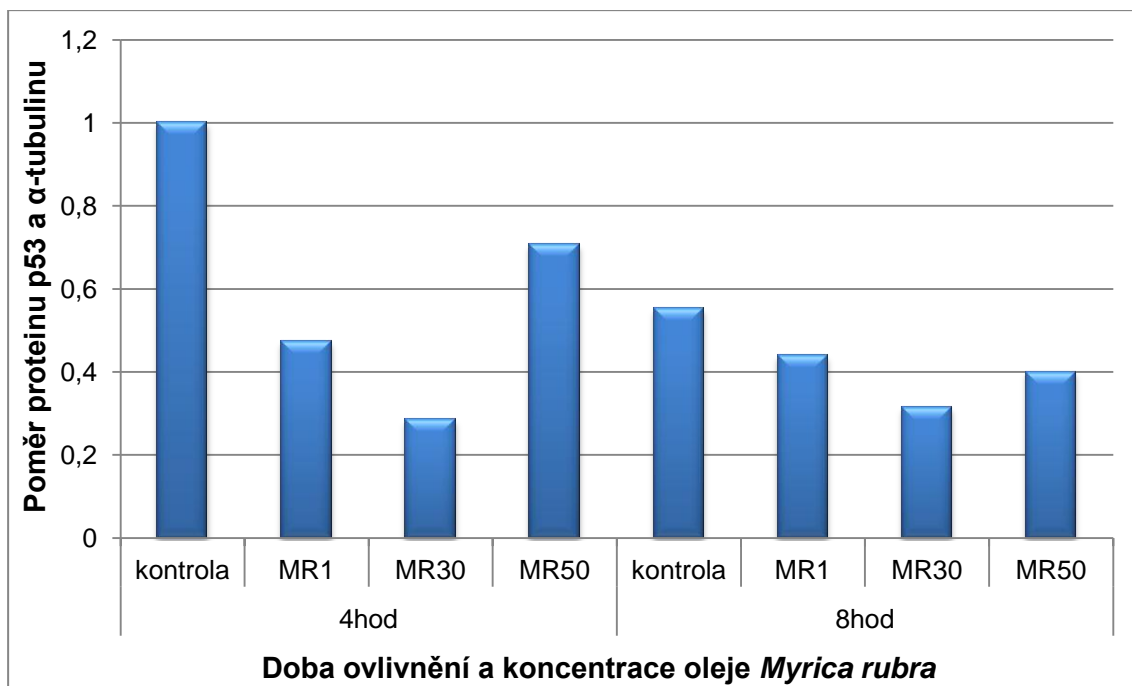
Protein p53 je stěžejní v buněčné odpovědi na poškození DNA. Najde-li poškozené místo, spouští transkripci genu p21, který zastavuje buněčné dělení, případně i apoptózu (Lidová 2010).

Obrázek 10 ukazuje expresi proteinů, čím výraznější pruh po chemiluminiscenční detekci, tím je vyšší exprese příslušného proteinu. Obrázek 11 je grafickým znázorněním hodnot naměřených přístrojem Gel Logic.

Při použití esenciálního oleje po čtyřech hodinách množství p53 kleslo, s vyšší koncentrací oleje – 50 $\mu\text{g/ml}$ – se množství začalo zvyšovat. Podobně, jen ne s tak markantními rozdíly, vypadala i exprese po 8 hodinách.



Obr. 10 Expese p53 (a) a α -tubulinu (b) po 4 hodinách (kontrola, 1, 30, 50 $\mu\text{g/ml}$) a 8 hodinách (kontrola, 1, 30, 50 $\mu\text{g/ml}$) – po chemiluminiscenční detekci



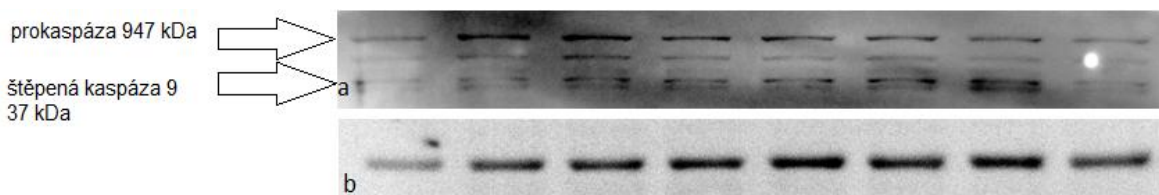
Obr. 11 Semi-kvantifikace exprese proteinu p53 před a po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*

Kaspáza 9

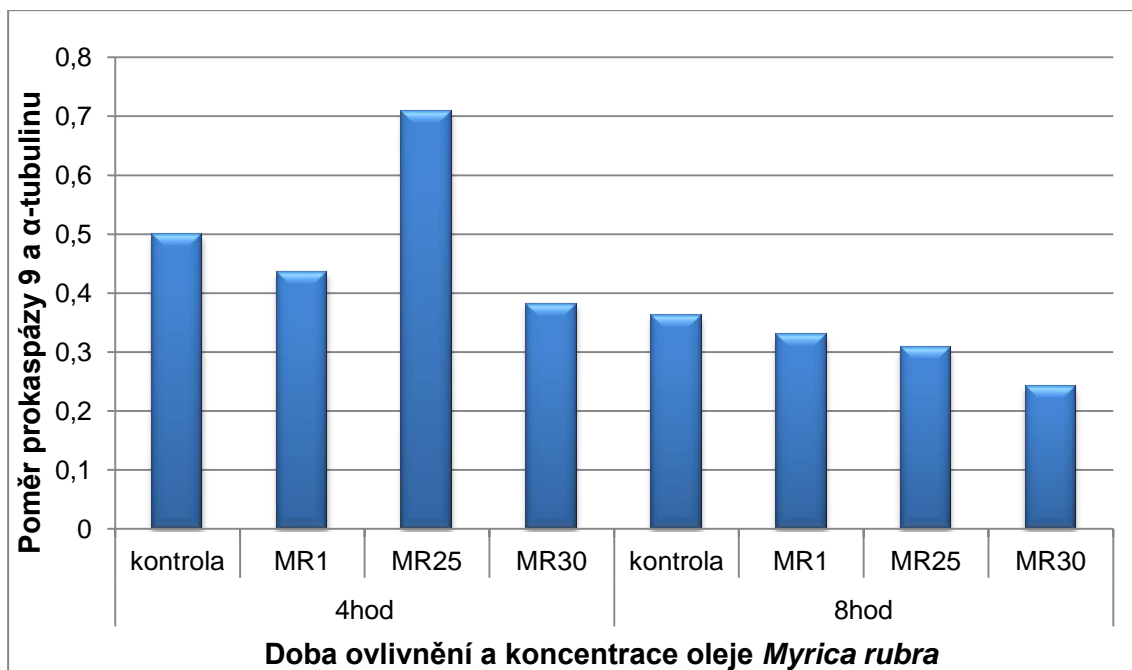
Jedná se o jednu z efektorových kaspáz, která proteolyticky štěpí proteiny membrány, cytoskeletu atd. Kaspáza 9 vzniká z inaktivní prokaspázy účinkem proteinu Apaf-1, který je aktivován jako odpověď buňky na stres (Zhao, 2012).

Obrázek 12 ukazuje expresi prokaspázy i aktivní kaspázy po chemiluminiscenční detekci příslušných proteinů. Obrázky 13 a 14 jsou grafickým znázorněním relativních množství prokaspázy a kaspázy 9 naměřené přístrojem Gel Logic.

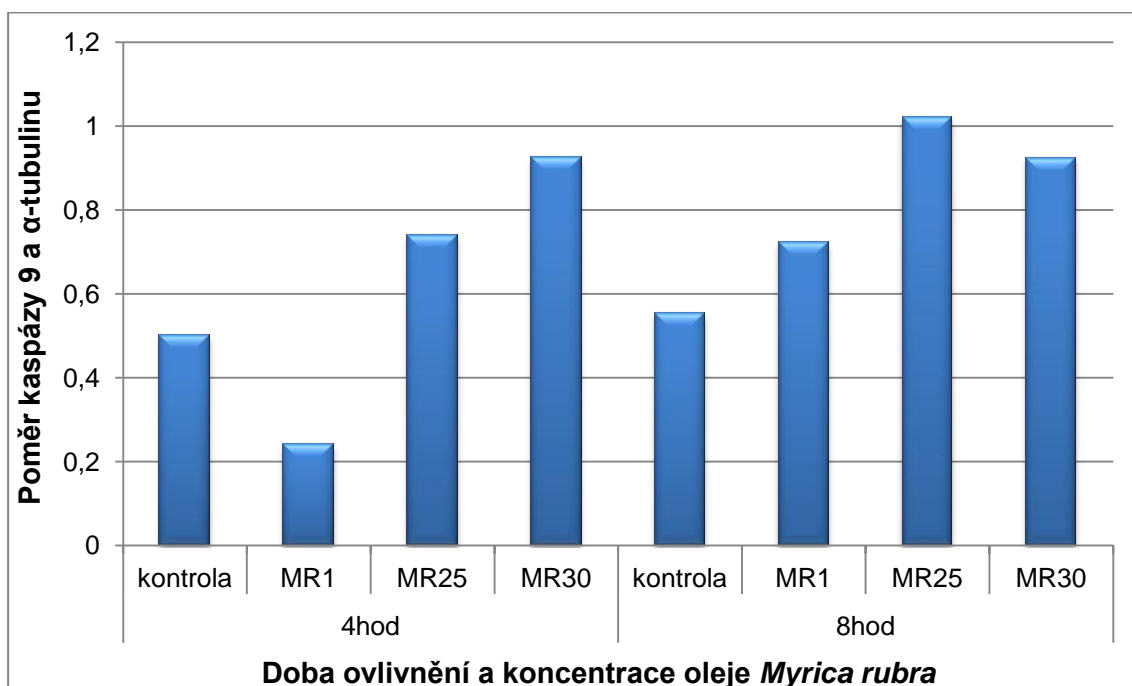
Koncentrace prokaspázy 9 se výrazně zvýšila po ovlivnění MO v koncentraci 25 µg/ml po čtyřech hodinách, po osmi hodinách její koncentrace nestoupá, spíše mírně klesá. Koncentrace štěpené kaspázy 9 po přidání oleje stoupá, kromě ovlivnění 1 µg/ml olejem po čtyřech hodinách.



Obr. 12 Expresi prokaspázy a kaspázy 9 (a) a α-tubulinu (b) po 4 hodinách (kontrola, 1, 25, 30 µg/ml) a 8 hodinách (kontrola, 1, 25, 30 µg/ml) – chemiluminiscenční detekce



Obr. 13 Semi-kvantifikace exprese prokaspázy 9 před a po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*



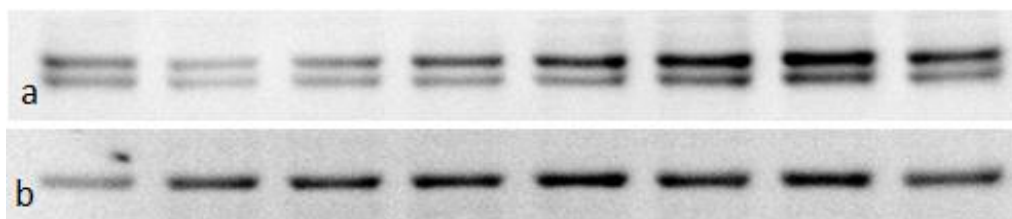
Obr. 14 Semi-kvantifikace exprese aktivované kaspázy 9 před a po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*

Kaspáza 8

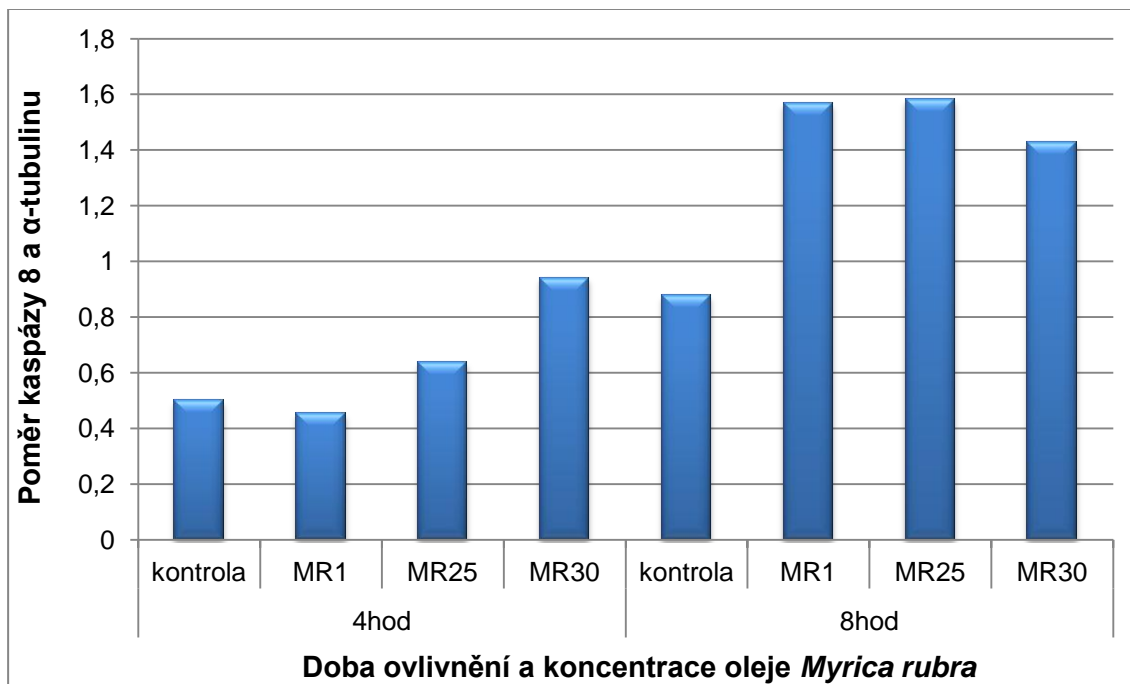
Kaspáza 8 patří mezi iniciační kaspázy, je aktivována například přes receptor pro TNF- α nebo Fas-receptor. Štěpí a aktivuje efektorové kaspázy (Lidová, 2010).

Obrázek 15 ukazuje expresi proteinů, čím výraznější pruh po chemiluminiscenční detekci, tím vyšší exprese. Obrázek 16 ukazuje relativní množství proteinu (měřeno přístrojem Gel Logic).

Po čtyřech hodinách se zvyšující se koncentrací oleje se mírně zvyšuje i exprese kaspázy 8. Po osmi hodinách je výrazný vzestup exprese již po ovlivnění 1 $\mu\text{g/ml}$ oleje, vyšší koncentrace již nevedly k dalšímu nárůstu exprese kaspázy 8.



Obr. 15 Exprese kaspázy 8 (a) a α -tubulinu (b) po 4 hodinách (kontrola, 1, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$) a 8 hodinách (kontrola, 1, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$) – po chemiluminiscenční detekci



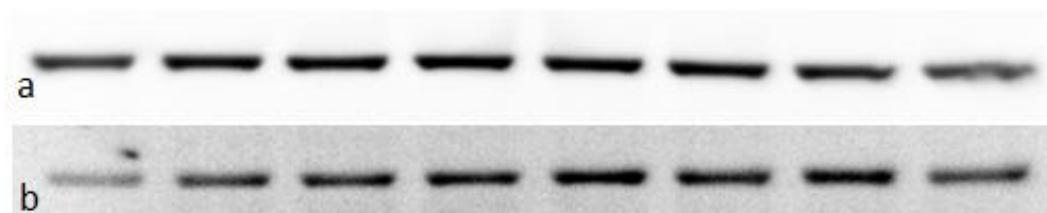
Obr. 16 Semi-kvantifikace exprese kaspázy 8 před a po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*

Kaspáza 3

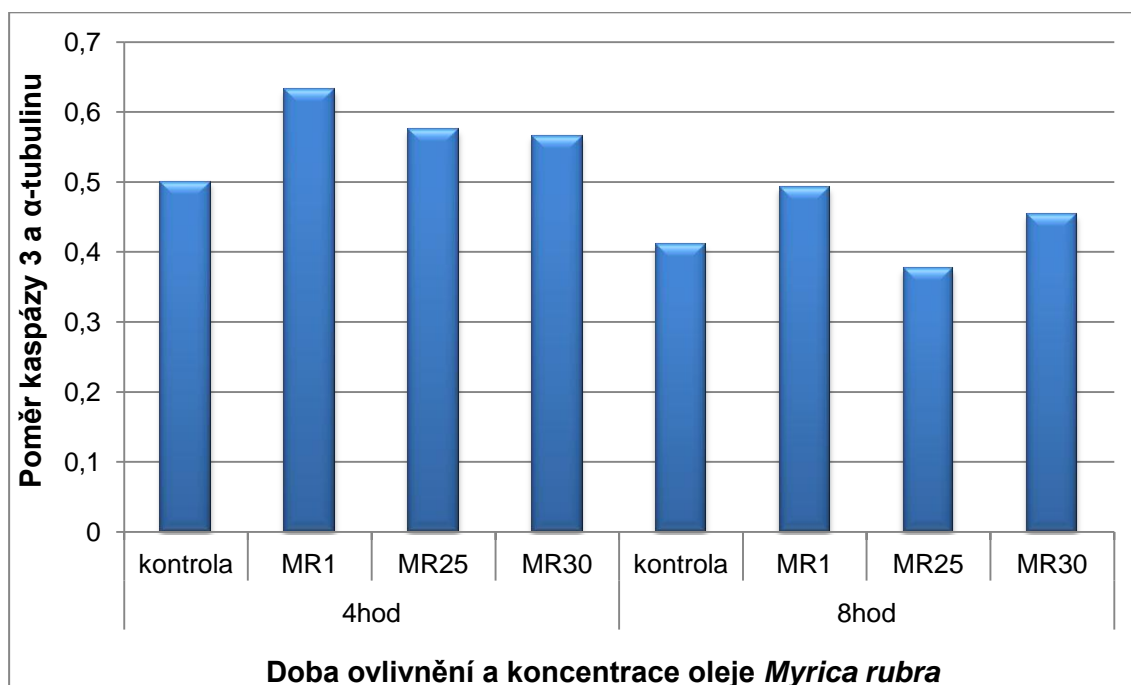
Patří mezi efektorové kaspázy, je aktivována kaspázami iniciačními. Proteolyticky štěpí proteiny membrány, cytoskeletu atd. (Lidová, 2010).

Obrázek 17 ukazuje expresi proteinů po chemiluminiscenční detekci, obrázek 18 je znázorněním relativního množství proteinu (měřeno přístrojem Gel Logic).

Výrazné změny v expresi kaspázy 3 po ovlivnění esenciálním olejem nenastaly.



Obr. 17 Expres kaspázy 3 (a) a α -tubulinu (b) po 4 hodinách (kontrola, 1, 25, 30 μ g/ml) a 8 hodinách (kontrola, 1, 25, 30 μ g/ml) – po chemiluminiscenční detekci



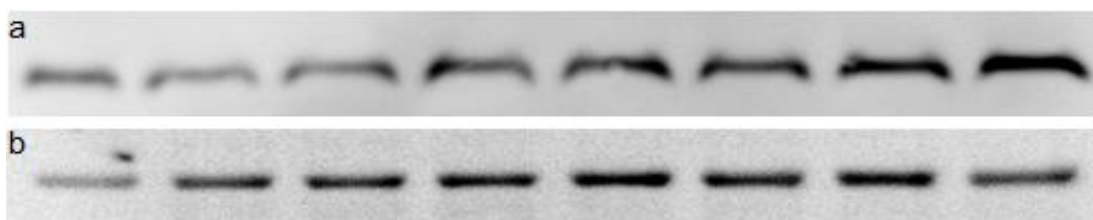
Obr. 18 Semi-kvantifikace exprese kaspázy 3 před a po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*

Bax protein

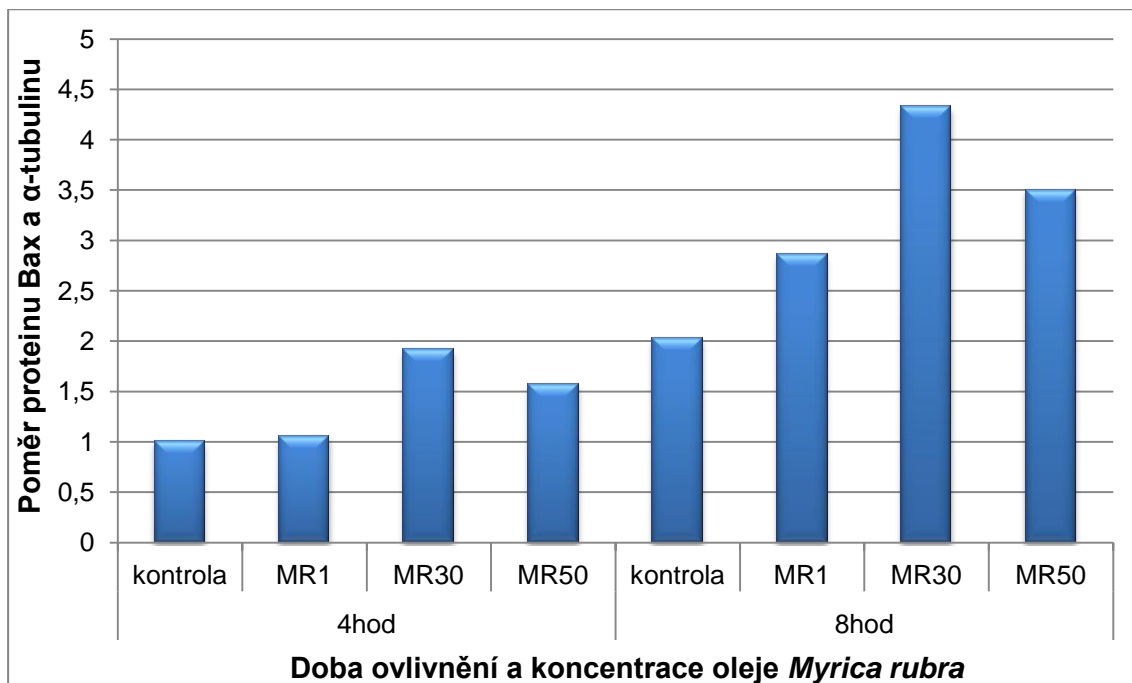
Bax patří do rodiny Bcl proteinů a je jedním z předních aktivátorů vnitřní cesty apoptózy tím, že mění permeabilitu mitochondriální membrány (Zhao, 2012).

Obrázek 19 ukazuje expresi proteinů po chemiluminiscenční detekci, obrázek 20 je znázorněním relativního množství proteinu (měřeno přístrojem Gel Logic).

Po ovlivnění *Myricou* stoupá exprese Bax proteinu. V koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ je tento vzestup menší, při vyšších koncentracích výraznější. V obou časech stoupla nejvíce exprese při ovlivnění 30 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 19 Exprese Bax proteinu (a) a α -tubulinu (b) po 4 hodinách (kontrola, 1, 30, 50 $\mu\text{g/ml}$) a 8 hodinách (kontrola, 1, 30, 50 $\mu\text{g/ml}$) – po chemiluminiscenční detekci



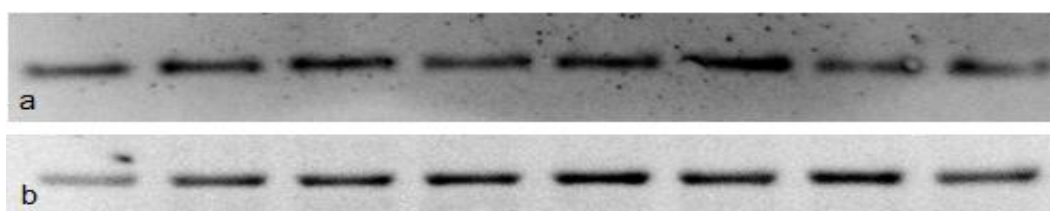
Obr. 20 Semi-kvantifikace exprese proteinu Bax před a po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*

Bid protein

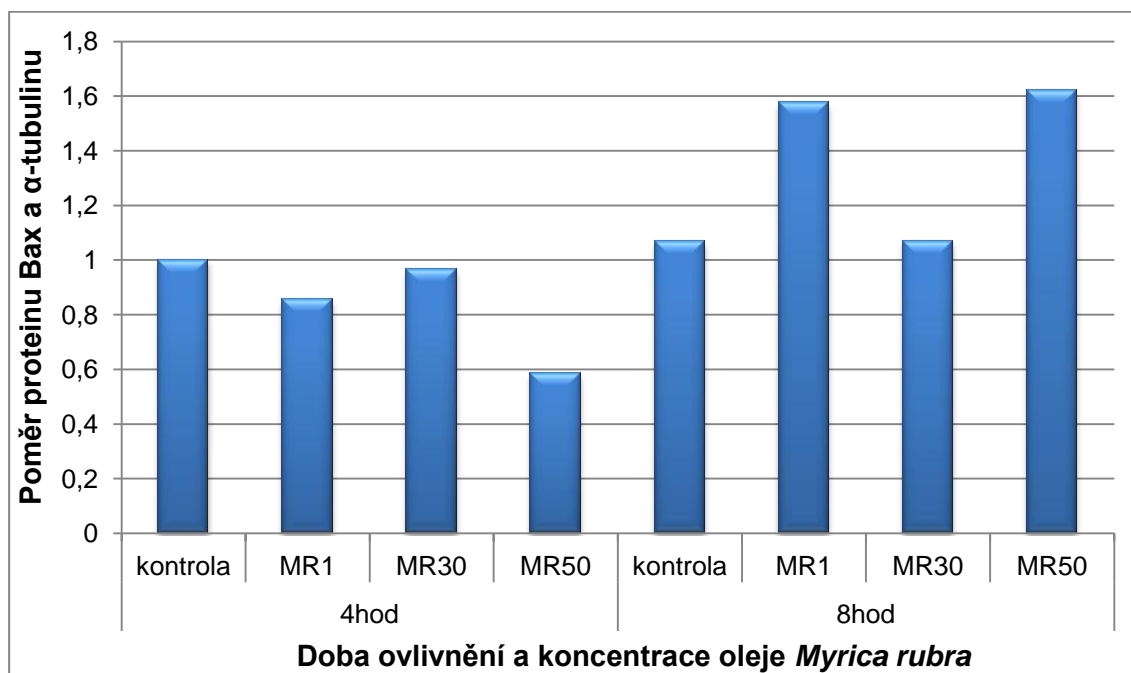
Bid protein je dalším členem rodiny Bcl proteinů. Proapoptoticky působí tak, že vyvazuje protein Bcl-2 (Zhao, 2012).

Na obrázku 21 je vidět exprese proteinů po chemiluminiscenční detekci, obrázek 22 ukazuje porovnání relativního množství proteinu.

Po čtyřech hodinách exprese Bid proteinu vlivem MO nestoupá, naopak mírně klesá. Po osmi hodinách při koncentraci MO 1 a 50 $\mu\text{g/ml}$ stoupá zastoupení tohoto proteinu v buňce výrazně.



Obr. 21 Exprese Bid proteinu (a) a α -tubulinu (b) po 4 hodinách (kontrola, 1, 30, 50 $\mu\text{g/ml}$) a 8 hodinách (kontrola, 1, 30, 50 $\mu\text{g/ml}$) – po chemiluminiscenční detekci



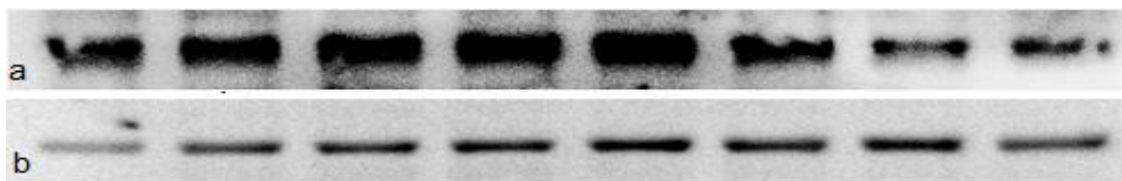
Obr. 22 Semi-quantifikace exprese proteinu Bid před a po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*

XIAP protein

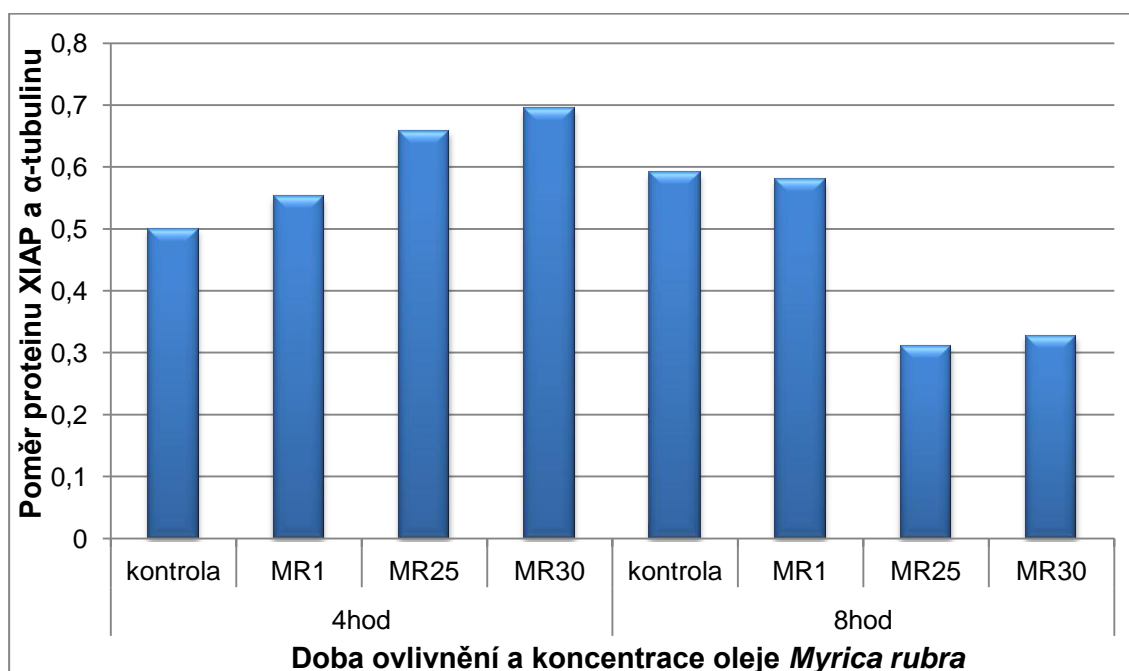
XIAP patří do rodiny proteinových inhibitorů apoptózy. Působí přímou vazbou na některé kaspázy např. 3 a 7 (Zhao, 2012).

Obrázek 23 ukazuje expresi proteinů po chemiluminiscenční detekci, obrázek 24 je semi-kvantitativním porovnáním hodnot naměřených přístrojem Gel Logic.

Jak je vidět z grafu, po čtyřech hodinách exprese XIAP proteinu se zvyšující se koncentrací mírně roste; po osmi hodinách se při vyšších koncentracích (25 a 30 $\mu\text{g/ml}$) prudce snižuje.



Obr. 23 Exprese proteinu XIAP (a) a α -tubulinu (b) po 4 hodinách (kontrola, 1, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$) a 8 hodinách (kontrola, 1, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$) – po chemiluminiscenční detekci



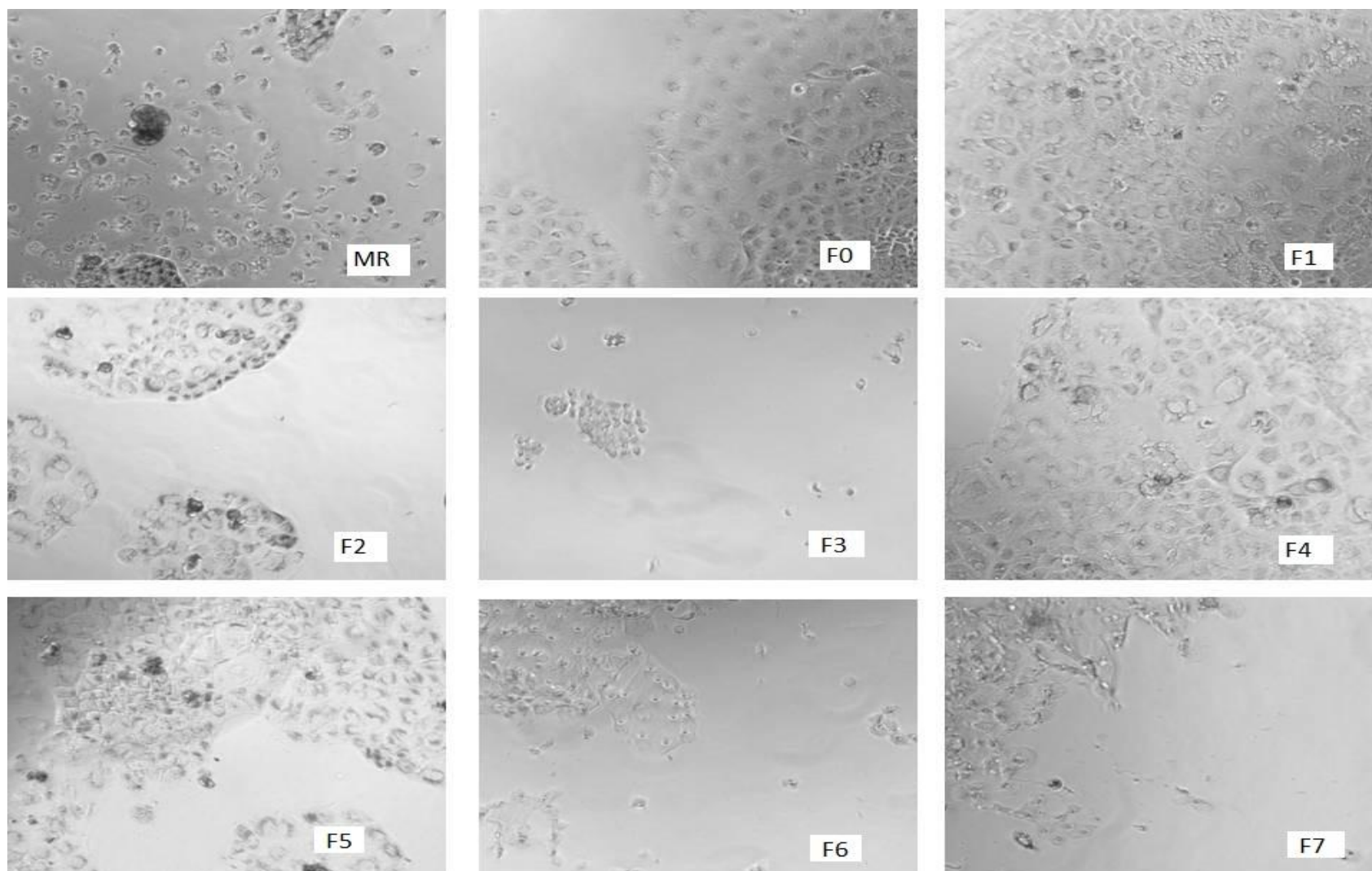
Obr. 24 Semi-kvantifikace exprese proteinu XIAP před a po ovlivnění olejem z *Myrica rubra*

5.2.2. Antiproliferační účinek frakcí MO

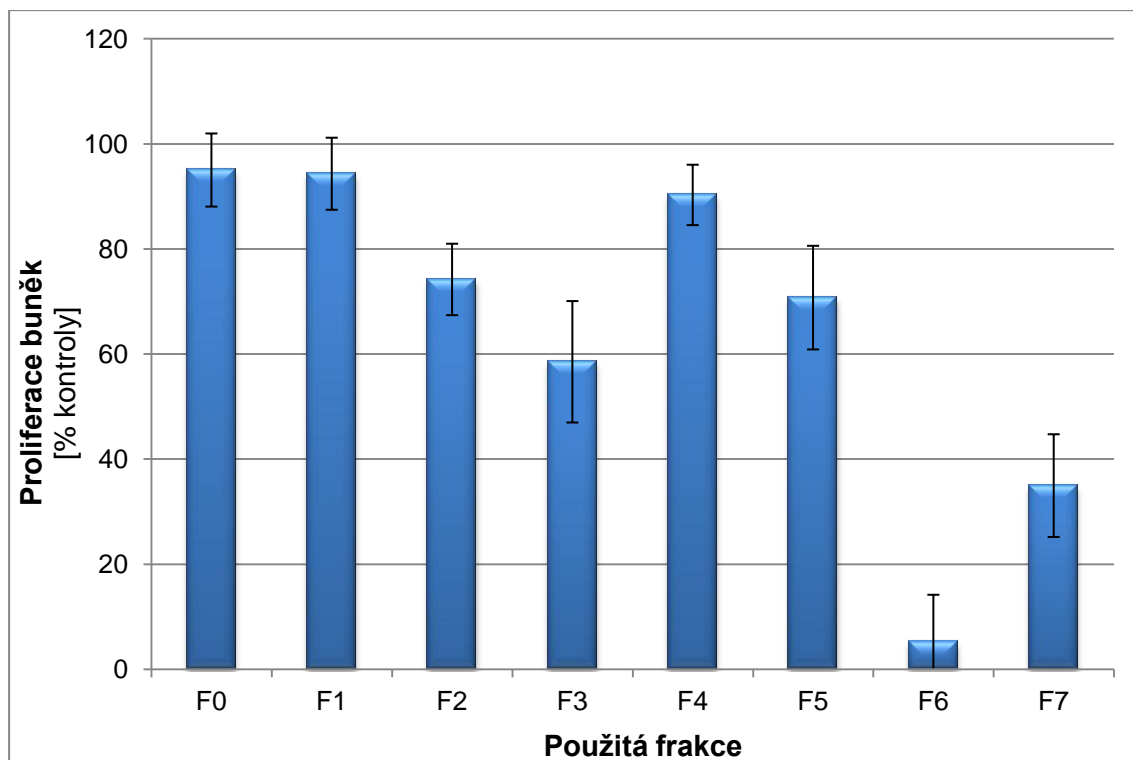
Olej byl poslán na frakcionaci do ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky. Frakcionace probíhala chromatograficky s gradientovou elucí dichlormetanu v petroleteru. Jejím výsledkem bylo sedmdesát frakcí, tyto se sloučily do osmi skupin (F0-F7). Frakci F0 představoval petroleter jako kontrola, že tato sloučenina není sama o sobě toxická a za toxické účinky jsou zodpovědné seskviterpeny. Každá z frakcí se testovala na buněčné linii CACO-2 v koncentraci 30 µg/ml, tedy v přibližné hodnotě IC₅₀ esenciálního oleje z *Myrica rubra*.

Obrázek 25 je porovnáním buněk ovlivněných jednotlivými frakcemi tak, jak se jevíly ve světelném mikroskopu.

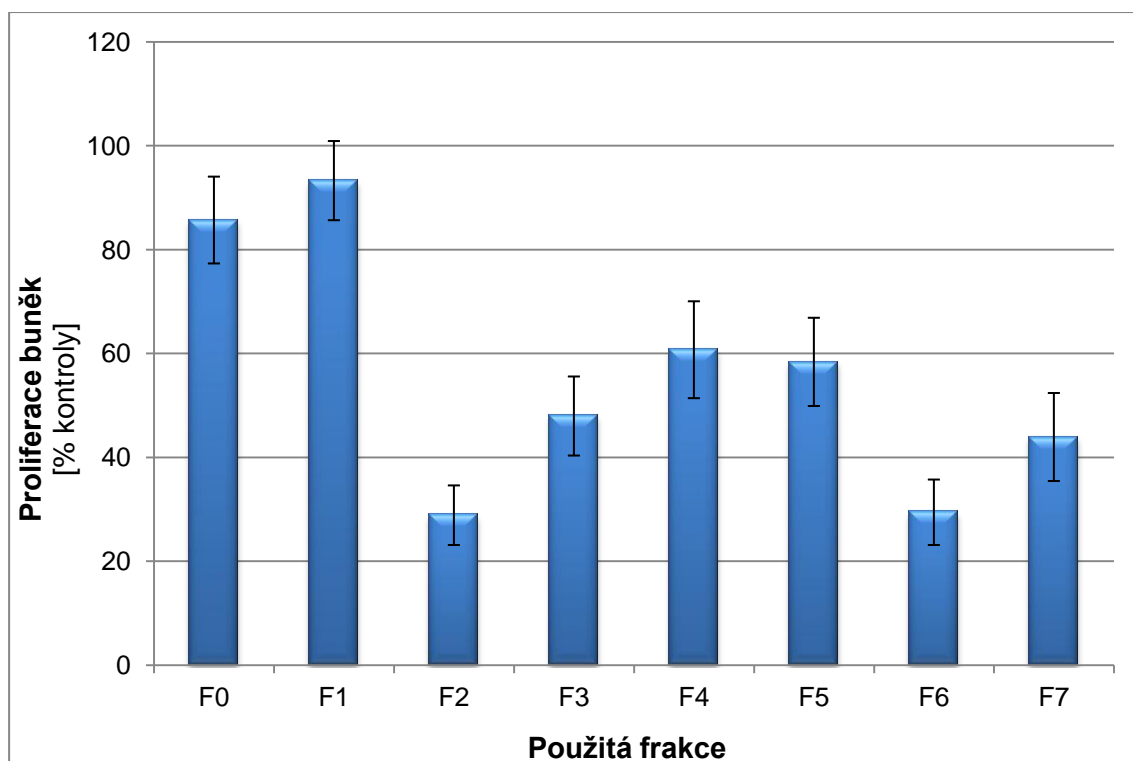
Vyhodnocení testů buněčné proliferace probíhalo barvením neutrální červení a pomocí MTT. Na obrázcích 26 a 27 jsou grafy znázorňující proliferaci buněk v závislosti na použité frakci.



Obr. 25 Buňky CACO-2 (x100) po 48hodinové inkubaci s olejem z *Myrica rubra* (MR) a jednotlivými frakcemi (F0-F7), vše v koncentraci 30 μ g/ml



Obr. 26 Porovnání vlivu různých frakcí o koncentraci 30 µg/ml na proliferaci buněk CACO-2 po 48hodinové expozici – hodnocení NRU testem



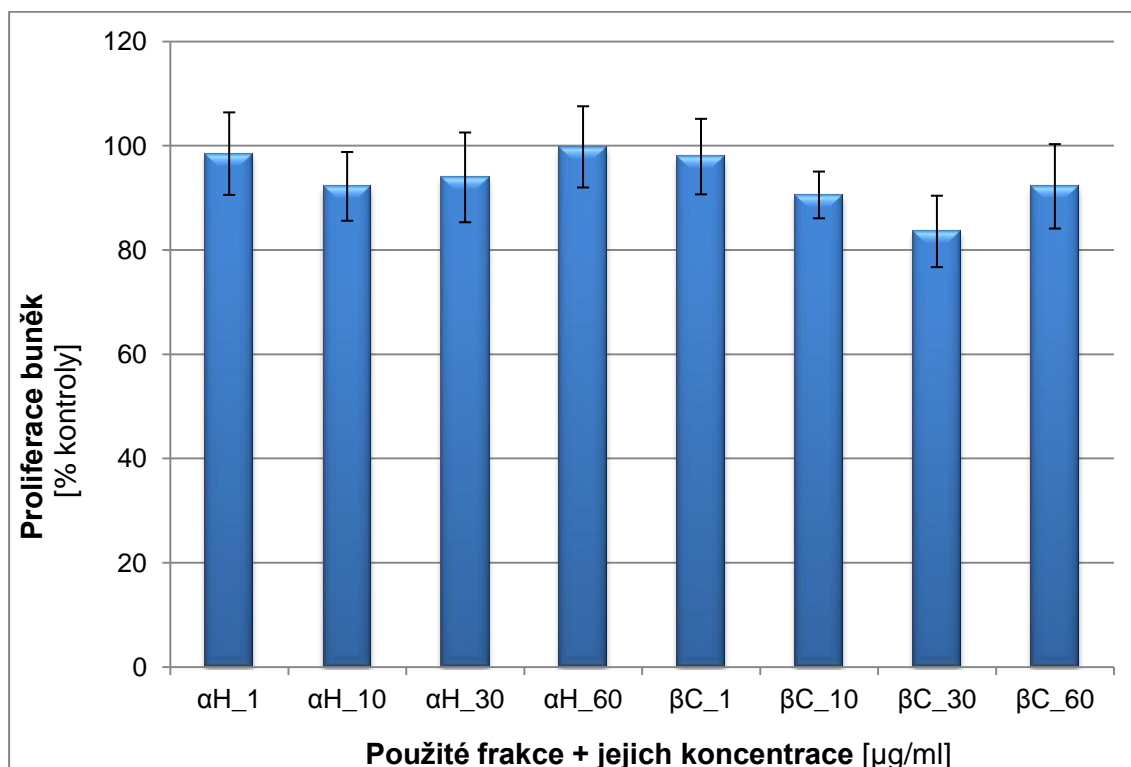
Obr. 27 Porovnání vlivu různých frakcí o koncentraci 30 µg/ml na proliferaci buněk CACO-2 po 48hodinové expozici – hodnocení MTT testem

Frakce 0 ani frakce 1 neměly na CACO-2 buňky v této koncentraci antiproliferační efekt ani v jednom z testů. U frakce 2 byly výsledky při použití testu MTT výrazně nižší, řádově o desítky procent. Frakce 3, 4 a 5 měly rovněž vyšší efektivitu při použití testu MTT, ale ne tak výraznou jako frakce 2. Frakce 6 způsobila výrazný úbytek buněk především při hodnocení NRU testem (proliferace byla oproti kontrole pouze 6%), při hodnocení MTT byly její výsledky také z nejnižších (29% kontroly). Frakce 7 v obou testech snížila proliferaci buněk na cca 40% oproti kontrole.

5.2.3. Antiproliferační účinek α -humulenu a β -karyofylenu

Analýza esenciálního oleje pomocí GCxGC-TOFMS (tabulka 1) ukázala, že dvě nejvíce zastoupené složky jsou α -humulen a β -karyofylen. Tedy seskviterpeny, u kterých byla na některých buněčných liniích cytotoxická aktivita prokázána (El Hardi et al. 2010).

Buněčná linie CACO-2 byla ovlivněna vzestupnými koncentracemi α -humulenu a β -karyofylenu – 1, 10, 30 a 60 $\mu\text{g/ml}$. Hodnocení probíhalo testem NRU (-obr.28) - i MTT (-obr.29).

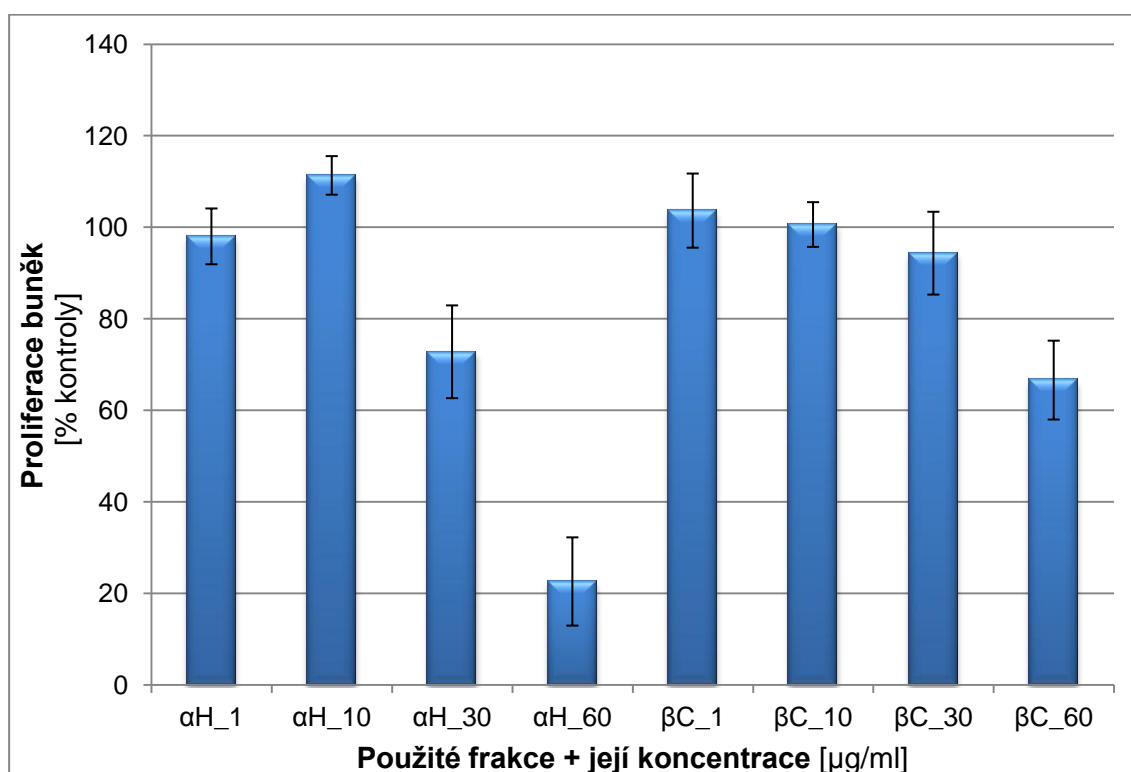


Obr. 28 Porovnání vlivu různých koncentrací α -humulenu (αH) a β -karyofylenu (βC) na proliferaci buněk CACO-2 po 48hodinové expozici – hodnocení NRU testem

Při barvení neutrální červení se antiproliferační účinek obou testovaných látek téměř neprojevil.

Při hodnocení MTT testem vykazovaly obě látky jistý antiproliferační účinek.

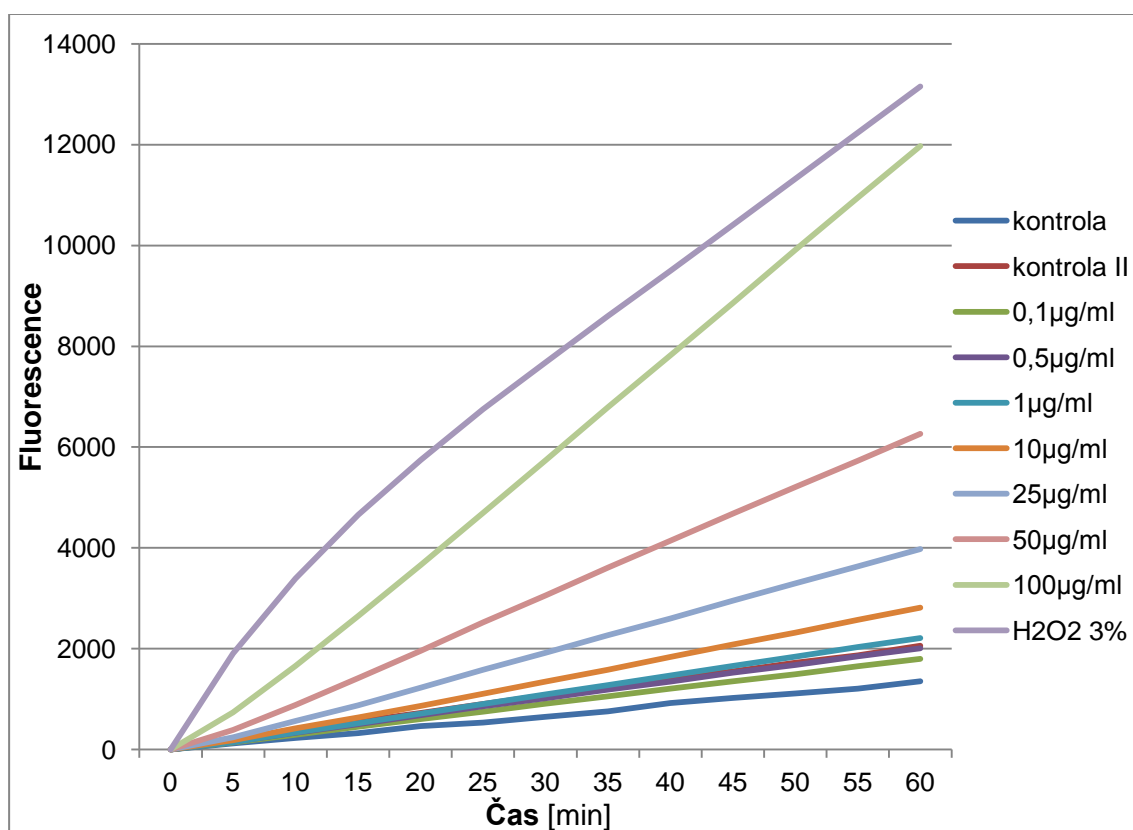
Koncentrace α -humulenu 30 $\mu\text{g/ml}$ způsobila signifikantní pokles proliferace buněk, ještě výraznější snížení proliferace bylo pozorováno při použití této látky v koncentraci u 60 $\mu\text{g/ml}$. β -karyofylenu způsobil signifikantní pokles proliferace až při koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 29 Porovnání vlivu různých koncentrací α -humulenu (αH) a β -karyofylenu (βC) na životnost buněk CACO-2 po 48hodinové expozici – hodnocení MTT testem

5.3. Vliv MO na oxidativní stres

Kvantifikace oxidativního stresu proběhla pouze u buněčné linie HCT-8. Její výsledky jsou vidět na obrázku 30. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% roztok DMSO (v obrázku označen jako „kontrola“) a 0,1% DMSO s olejem („kontrola II“). Jako pozitivní kontrola byl použit 3% roztok peroxidu vodíku, přidaný těsně před měřením. Koncentrace oleje z *Myrica rubra* se pohybovaly v rozmezí 0,1-100 µg/ml.

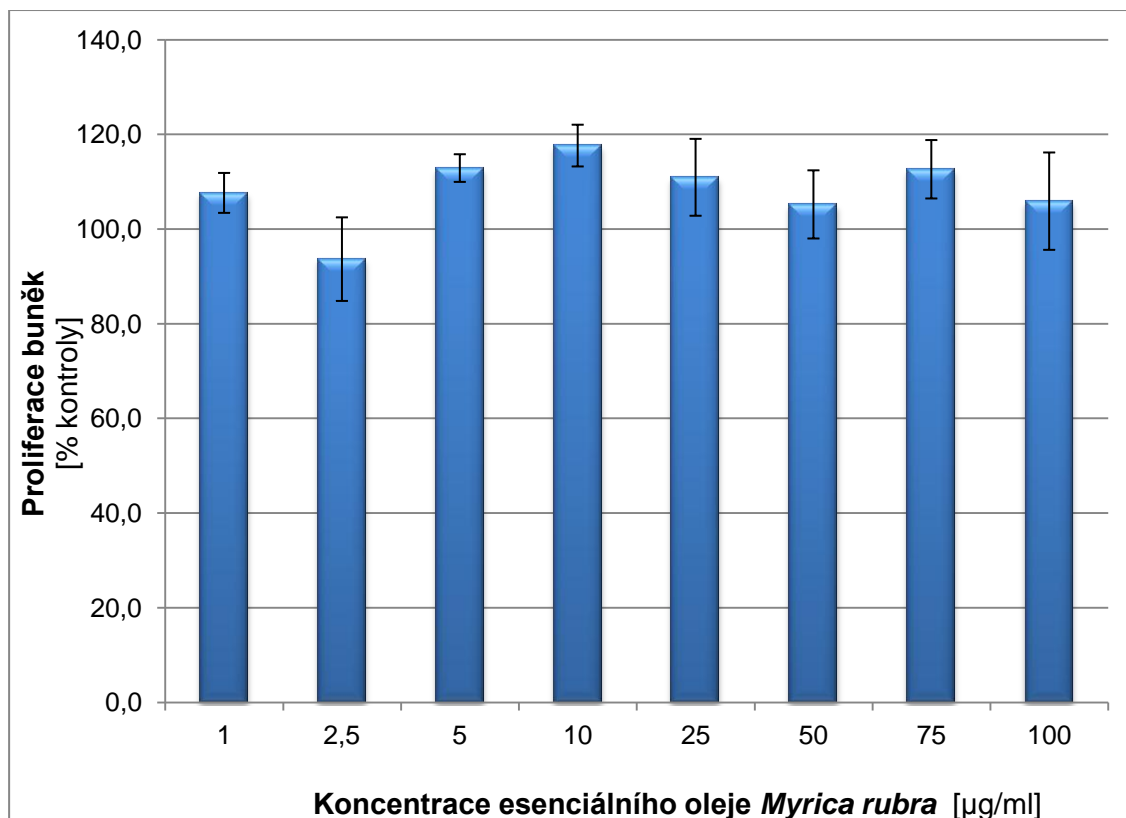


Obr. 30 Graf produkce volných radikálů buněčnou linií HCT-8 po ovlivnění buněk olejem *Myrica rubra*

Při zvyšující se koncentraci oleje z *Myrica rubra* stoupala i produkce volných radikálů, nejvyšší produkci ROS vyvolala nejvyšší koncentrace - 100 µg/ml.

5.4. Vliv MO na primární kulturu hepatocytů

Kultura primárních hepatocytů se používá ke zjištění cytotoxicity testované látky na normální, ne nádorově zvrhlé buňky. Hepatocyty byly ovlivněny stejnými koncentracemi jako testované nádorové linie, výsledky znázorňuje graf na obrázku 31.



Obr. 31 Porovnání vlivu různých koncentrací esenciálního oleje z *Myrica rubra* na životnost buněk kultury primárních hepatocytů – hodnoceno MTT testem

Výsledné hodnoty všech koncentrací oscilovaly víceméně okolo sta procent, někdy i mírně nad touto hranicí. Esenciální olej z *Myrica rubra* neměl na hepatocyty, na rozdíl od buněk testovaných nádorových linií, cytotoxický účinek.

6. DISKUZE

V posledních letech je na čínskou rostlinu *Myrica rubra* v souvislosti s jejím dlouhodobým používáním v asijské lidové medicíně zaměřován vědecký zájem. Účinné látky nalezené v jejích částech (plody, listy, kořeny i kůra) mají široké spektrum možného účinku. Mají aktivitu antioxidační, antidiabetickou, protizánětlivou, antibakteriální, používají se jako antidotum a adstringens (Sun et al. 2013).

Protinádorová účinnost výtažků z různých částí *Myrica rubra* byla zjištěna několika studii. Například extrakt z listů prokázal aktivitu na HeLa buňkách *in vitro*, u leukemické linie P-388 byla tato aktivita potvrzena jak *in vitro*, tak *in vivo*. Extrakt z kůry se ukázal jako účinný u linie nádoru prsu MCF-7. Všechny tyto výzkumy pracovaly s etanolovými extrakty, jejichž hlavními složkami jsou především polyfenolické sloučeniny (Yang et al. 2003, Sun et al. 2013).

V této diplomové práci jsme studovali možné protinádorové účinky esenciálního oleje z listů *Myrica rubra*, protože v experimentech provedených naší laboratoří měl tento olej v porovnání s etanolovým a etylacetátovým extraktem výrazně vyšší účinnost.

Existuje mnoho studií zabývajících se biologickými vlastnostmi esenciálních olejů. Byla u nich prokázána antioxidační, analgetická, protizánětlivá, antivirová a samozřejmě i antiproliferační aktivita. Antiproliferační aktivita je dávana do souvislosti s obsahem terpenů v esenciálním oleji (Bhalla et al 2013, Sylvestre et al 2009).

Přestože bylo protinádorové působení pozorováno u celé řady esenciálních olejů, MO má ve srovnání s mnohými nižší IC_{50} , tedy vyšší účinnost. Esenciální olej ze dvou druhů saturejek (*Satureja montana*, *S. hortensis*) obsahoval především α -pinen, β -terpenen, 4-terpinol, α -terpinol a karyofylen a měl IC_{50} mezi 329-98 $\mu\text{g/ml}$. Esenciální olej z máty (*Mentha arvensis*) měl na leukemické linii K562 antiproliferační účinek s IC_{50} 85 $\mu\text{g/ml}$ (Bhalla et al. 2013). Vyšší účinnost MO může být dána použitými buněčnými liniemi; Shrama et al. (2009) zkoušeli esenciální olej *Cymbopogon flexuosus* na dvanácti různých buněčných liniích, kdy střevní buňky měly spolu s buňkami neuroblastomu nejnižší IC_{50} . Dalším možným důvodem vyšší účinnosti MO je vysoký obsah α -humulenu a β -karyofalenu. Legault a Pichette (2007) totiž prokázali výrazné zvýšení antiproliferační aktivity α -humulenu při současné přítomnosti β -karyofylenu.

MO se skládá především ze seskviterpenů – β -karyofylenu, α -humulenu, humulen epoxidu, valencenu a dalších. Nejsou známy studie, které by také provedly analýzu esenciálního oleje *Myrica rubra*, Sylvestre et al. (2009) nicméně provedli analýzu esenciálního oleje z rodově příbuzné rostliny *Myrica gale*. Je zajímavé, že ačkoli i tento olej obsahuje velké množství seskviterpenů jeho složení je diametrálně odlišné; α -humulen není zastoupen ve vyšší koncentraci v *Myrica gale*, na druhou stranu chybí mezi hlavními složkami MO myrcen, dominantní složka oleje z *Myrica gale*.

Testy vlivu MO a jeho složek na buněčnou proliferaci byly prováděny na dvou nádorových buněčných liniích, přičemž buňky CACO-2 se ukázaly být citlivější. Hodnocení proběhlo dvěma „end-point“ metodami- NRU a MTT testem – a buněčná proliferace byla kontinuálně sledována přístrojem x-Celligence. Při porovnání hodnot IC_{50} je zřejmé, že při použití přístroje x-Celligence vycházely hodnoty IC_{50} o řád nižší. Možným vysvětlením této nesrovnalosti je to, že MO významně ovlivňuje adhezenci buněk k povrchu, přičemž nepřisedlé buňky se přístroji jeví jako buňky mrtvé.

Důležitou vlastností každého chemoterapeutika je selektivní ovlivnění pouze nádorových buněk. Aby se vyloučila cytotoxicita MO na normální nenádorové buňky, byl MO testován na primární kultuře hepatocytů potkana. Ukázalo se, že MO v testovaných koncentracích (do 100 μ g/ml) životnost primárních hepatocytů nijak neovlivňuje.

S cílem zjistit látky, které jsou zodpovědné za antiproliferační působení MO, byl MO frakcionován. Frakcionace probíhala chromatograficky s gradientovou elucí petroleterem, sedmdesát získaných frakcí bylo pak sloučeno do sedmi. Osmou frakcí tvořil samotný petroleter; ten, jak se ukázalo, neměl na testované buněčné linie žádnou účinnost. Jako nejúčinnější se ukázaly frakce 2, 6 a 7. Zvýšení účinnosti oproti MO je způsobeno změněným zastoupením jednotlivých seskviterpenů v daných frakcích.

Dalším z cílů diplomové práce bylo studovat možný mechanismus antiproliferačního působení MO. Nejprve jsme chtěli zjistit, zda MO pouze inhibuje buněčný růst nebo zda způsobuje apoptózu buňky. Indukce apoptózy vlivem extraktů z *Myrica rubra* nebo esenciálními oleji z různých rostlin byla popsána v mnohých studiích. Například Kuo et al. (2004) uveřejnili, že látka získaná z *Myrica rubra* prodelfinidin B-2 3,3'-di-O-galát způsobuje v buněčné linii MCF-7 aktivaci apoptózy přes Fas receptor. Ovlivnění esenciálním olejem *Citrus aurantifolia* indukovalo

apoptózu zvýšením poměru Bax/Bcl-2 (Patil et al. 2009). Průtokovou cytometrií byla prokázána indukce apoptózy u esenciálního oleje *Lycopus lucidus*, jehož hlavní složky tvořili α -humulen a β -karyofylen (Yu et al. 2011).

V naší práci jsme proto zjišťovali vliv MO na produkci různých proapoptotických markerů. Koncentrace proteinu p53 po ovlivnění buněk MO mírně klesla, vypadá to tedy, že protein p53 nehraje stěžejní roli v aktivaci apoptózy v časných hodinách po ovlivnění buněk MO.

Koncentrace prokaspázy 9 se zvýšila po ovlivnění 25 μ g/ml MO po čtyřech hodinách, po osmi hodinách se však koncentrace v buňce oproti neovlivněné kontrole snižuje. Po osmi hodinách se naopak zvyšuje exprese aktivované kaspázy 9, je proto pravděpodobné, že snížená koncentrace prokaspázy souvisí spíše s její aktivací než se sníženou expresí.

Zvýšená exprese kaspázy 8 po osmi hodinách od ovlivnění MO naznačuje možnou aktivaci apoptózy i vnější cestou přes receptory.

Expresce kaspázy 3 se výrazně neměnila, kaspáza 3 však patří mezi efektorové kaspázy a je možné, že její produkce stoupá déle než po osmi hodinách, maximálním čase, kdy byla produkce proapoptotických markerů sledována.

Indukce buněčné apoptózy je výrazně ovlivněna mnoha buněčnými procesy a signály. Jedním z těchto signálů může být i zvýšená produkce volných radikálů.

Produkce ROS po ovlivnění esenciálními oleji byla prokázána několika studiemi. Například Jo et al.(2012) prokázali zvýšení produkce volných radikálů po přidání esenciálního oleje borovice (*Pinus densiflora*) zvyšující se v závislosti na koncentraci. Paik et al. (2005) zase zjistili snížení antiproliferační aktivity oleje *Zanthoxylum schinifolium* po ošetření buněk po předchozím ovlivnění antioxidantním činidlem Trolox. Zjištění této práce, zvyšující se produkce volných radikálů je závislá na čase a koncentraci MO, jsou v souladu s předchozími studiemi.

Vysoká produkce ROS poukazuje na pravděpodobné spuštění apoptózy vnitřní cestou, kdy cytochrom c nestíhá oxidovat superoxid, proniká z mitochondrie do cytosolu, kde pomocí proteinu Bax aktivuje apoptotickou kaskádu (Vrhliková 2011). Tuto teorii podporuje i zvýšená exprese Bax proteinu po osmihodinové expozici MO.

Po osmi hodinách se zvyšuje také exprese Bid proteinu (nezvyšující se exprese u koncentrace 30 μ g/ml je zvláštní, může být způsobena chybou měření), třebaže ne tak výrazně jako v případě Bax proteinu. I toto podporuje teorii aktivace apoptózy vnitřní cestou.

Zároveň způsobil MO po osmi hodinách ve vyšších koncentracích i snížení exprese proteinového inhibitoru apoptózy XIAP, čímž podporuje apoptotický proces.

7. ZÁVĚR

Esenciální olej z *Myrica rubra* (MO) má antiproliferační efekt na obě testované buněčné linie, přičemž buňky CACO-2 jsou citlivější. Díky ovlivnění adherence MO jsou výsledné IC_{50} stanovené přístrojem x-Celligence řádově nižší než ty stanovené NRU.

MO v nádorových buňkách působí změny v expresi některých apoptotických markerů. Po osmi hodinách výrazně stoupá exprese kaspázy 8, kaspázy 9, Bax a Bid protein a snižuje se exprese inhibitoru XIAP. Všechny tyto změny značí, že MO vyvolává v nádorových buněčných liniích apoptotický proces.

MO vyvolává v nádorových buňkách oxidativní stres, resp. produkci volných radikálů, která roste v závislosti na koncentraci MO i době ovlivnění.

Při testování antiproliferačních účinků jednotlivých frakcí MO se jako nejúčinnější jevíly frakce 2, 3, 6 a 7. Frakce 1 neměla žádný antiproliferační účinek.

Antiproliferační aktivita α -humulenu a β -karyofylenu se projevila pouze při barvení pomocí MTT a to jen u vyšších koncentrací obou látek. α -humulen byl z těchto dvou testovaných látek účinnější.

Na primární kulturu hepatocytů, normální nenádorové buňky neměl MO žádný vliv.

Seznam zkratek

AA – akrylamid
Apaf-1 – Apoptotický proteázu aktivující faktor
APS – persíran amonný
ATCC – American Type Culture Collection
BCA – kyselina bicinchoninová
BSA – Hovězí sérový albumin
CB1 (2) – kanabinoidní receptory typu 1 (2)
DCF – 2,7-dichlordifluorescein diacetát
DMSO – Dimethylsulfoxid
DNA – deoxyribonukleová kyselina
FBS – Fetální bovinní sérum
FDA – Food and Drug Administration
GC – plynová chromatografie
HIV – virus lidského imunodeficitu
MEME – Minimum Essential Medium Eagle
MO – esenciální olej z *Myrica rubra*
MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NF- κ B - jaderný faktor kappa B
NRU – test neutrální červení
PBS – Solný fosfátový pufr
PMSF – fenylmethansulfonylfluorid
ROS – volné radikály
RPMI – Roosvelt Park Memorial Institut Medium
SDS – dodecylsírán sodný
TBST – Tris-buffer saline tween
TNF α – tumor nekrotizující faktor alfa
TOFMS – hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu
u-PA – urokináza
XIAP – X-vázaný inhibitor apoptózy

Seznam použité literatury

Monografie a časopisy

ADORJAN B., BUCHBAUER G.(2010): Biological properties of essential oils: an updated review, *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 25, s. 407-426.

AFOULOUS S., FERHOUT H., RAOELISON E.G., VALENTIN A., MOUKARZEL B., COUDERC F., ET AL. (2011): *Helichrysum gymnocephalum* essential oil: chemical composition and cytotoxic, antimalarial and antioxidant activities, attribution of the activity origin by correlations, *Molecules*, vol. 16, s. 8273–8291

ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (2005): Kontrola buněčného cyklu a buněčná smrt v *Základy buněčné biologie – úvod do molekulární biologie buňky*, 2. vyd, Espero, Praha, s. 572-593

AMIEL E., OFIR R., DUDAI N., SOLOWAY E., RABISKY T., RACHMILEVITCH S. (2012): Beta-caryophyllene, a compound isolated from the biblical balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, no. 2012: 872394

BHALLA Y., GUPTA V.K., JAITAK V.(2013): Anticancer activity of essential oils: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, no. 15, s. 3643-3653

EL HARDI A., DEL RIO M.A.G., SANZ J., COLOMA A.G., IDAOMAR M., OZONAS B.R., GONZALES J.B., REUS M.I.S. (2010): Cytotoxic activity of alpha-humulene and trans-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells, *Anales de la real academia nacional de farmacia*, vol. 76, no. 3, s. 343-356 ABSTRACT

FANG Z.X., ZHANG Y.H., LU Y., MA G.P., CHEN J.C., LIU D.H., YE X.Q.(2009): Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices, *Food Chemistry*, vol. 113, s. 884-888

FERNANDES E.S., PASSOS G.F., MEDEIROS R., DA CUNHA F.M., FERREIRA J., CAMPOS M.M., PIANOWSKI L.F., CALIXTO J.B. (2007): Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*", *European Journal of Pharmacology*, vol. 569, no. 3, s. 228–236

GERTSCH J., MARCO L., RADUNER S., RACZ I., CHEN J.Z., XIE X.Q., ALTMANN K.H., KARSAK M., ZIMMER A. (2008): Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid, *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 105, no. 26, s. 9099-9104

HE X.H., CHEN L.G., ASGHAR S., CHEN Y.(2004): Red bayberry (*Myrica rubra*), a promising fruit and forest tree in China, *Journal of American Pomological society*, vol. 58, s.163-168

CHEN W., LU Y., GAO M., WU J., WANG A., SHI R.(2011):Anti-angiogenesis effect of essential oil from *Curcuma zedoaria* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, s. 220–226

JO J.R., PARK J.S., PARK Y.K., CHAE Y.Z. LEE G.H., PARK G.Y., JANG B.C.(2012): *Pinus densiflora* leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells, *International Journal of Oncology*, vol. 40, s. 1238-1245

JUN N.J., MOSADDIK A., MOON J.Y., JANG K.C., LEE D.S., AHN K.S., CHO S.K. (2011): Cytotoxic activity of beta-caryophyllene oxide isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Lea, *Records of Natural Products*, vol. 5, no.3, s. 242-246
ABSTRACT

KUBO I., CHAUNDRI S.K., KUBO Y., SANCHEZ Y., OGURA T., SAITO T., ISHIKAWA H., HARAGUCHI H. (1996): Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*, *Planta Medica*, vol. 62, is. 5, s. 427-430, ABSTRACT

KUNGHSOL CH., CHANGJIE X.U, BO Z.(2004): Red bayberry: Botany and horticulture, *Horticulture Reviews*, vol. 30, s. 83-114

KUO P.L., HSU Y.L., LIN T.C., LIN C.C. (2004)a: Prodelphinidin B-2,3,3'-di-O-gallate from *Myrica rubra* inhibits proliferation of A549 carcinoma cell via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis, *European Journal of Pharmacology*, vol. 501, no.1-3, s.41-48

KUO P.L., HSU Y.L., LIN T.C., LIN C.C. (2004)b: Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate from *Myrica rubra* via Fas-mediated pathway, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 56, no.11, s. 1399-1406, ABSTRACT

LEGAULT J., DAHL W., DEBITON E., PICHETTE A., MADELMONT J.C. (2003): Antitumor activity of balsam oil: Production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action, *Planta Medica*, vol. 69 no. 5, s. 402-407, ABSTRACT

LEGAULT J., PICHETTE A.(2007): Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 59, no. 12, s. 1643-1647, ABSTRACT

LEGAULT J. COTE P.A., OUELLET S., SIMARD S., PICHETTE A. (2013): Iso-caryophyllene cytotoxicity induced by lipid peroxidation and membrane permeabilization in L-929 cells, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 3, no. 08, s. 25-31, ABSTRACT

LIDOVÁ L. (2010): Úloha protein Bcl rodiny v onkogylekologii, Bakalářská práce, Katedra fyziologie živočichů Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, s. 11-25

MASOPUST J., PRŮŠA R.(2003): Patobiochemie buňky, 1. vydání, Praha, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, s. 229-294

MATSUDA T., SOMEYA T., FUJIMOTO A.(2010): Phenolic inhibitors of chemical and enzymatic oxidation in leaves of *Myrica rubra*, *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 74, s. 212-215

NACHTIGAL P.(2011): *Přednáška Obecná patologie*, Hradec Králové, 2011

OKTÁBEC Z., JAMPÍLEK J.(2013): Stručná historie chemoterapie, *Chemické listy*, vol.107, s. 151-158

PAIK S.Y., KOH K.H., BAEK S.M., PAEK S.H.,KIM J.A.(2005): The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species, *Biological and Pharmaceutical Bullentin*, vol. 28, no.5, s. 802- 805

PATIL J.R., JAYAPRAKASHA G.K., MURTHY K.N.C., TICHY S.E., CHETTI M.B., PATIL B.S.(2009): Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*, *Food Chemistry*, vol. 114, no. 4, s. 1351- 1358

ROGERIO A.P., ANDRADE E.L., LEITE D.F., FIGUEIREDO C.P., CALIXTO J.B. (2009): Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation, *British Journal of Pharmacology*, vol. 158, no. 4, s. 1074-1087

SELL CH. (2003): Perfumery materials of natural origin in *Chemistry in Fragrances*, 2.vyd, Royal Society of Chemistry, Cambridge, s. 24-50

SHARMA P.R., MONDHE D.M., MUTHIAH S., PAL H.C., SHAHI A.K., SAXENA A.K., QAZI G.N. (2009): Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*, *Chemico-Biological Interaction*, vol. 179 s. 160-168

SHIMOSAKI S., TSURUNAGA Y., ITAMURA H., NAKAMURA M.(2011): Antiallergic effects of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extracts in vitro and in vivo, *Natural Product Research*, vol. 25, s. 374-380

SILBERNAGL S., LANG F (2001): Atlas patofyziologie člověka, 1. vyd, Grada, Praha

SUN C.D., ZHANG B., ZHANG J.K., XU C.J., WU C.J., LI X., CHEN K.S.(2012)a: Cyanidin-3-glucoside-rich extract from Chinese bayberry fruit protects pancreatic β cells and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice, *Journal of Medicinal Food*, vol. 15, s. 288–298

SUN C.D., ZHENG Y.X., CHEN Q.J., TANG X.L., JIANG M., ZHANG J.K., LI X., CHEN K.S. (2012)b: Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit, *Food Chemistry*, vol. 131, s. 1287–1294

SUN C., HUANG H., XU C., LI X., CHEN K.(2013): Biological activities of extracts from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.): A Review, *Plant Food for Human Nutrition*, vol. 68, s. 97-106

SYLVESTRE M., LEGAULT J., DUFOUR D., PICHETTE A.(2005): Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L., *Phytotherapy*, vol. 12, no. 4, s. 299-304)

SYLVESTRE M., PICHETTE A., LAVOIE S., LONGTIN A., LEGAULT J. (2007): Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter, *Phytotherapy Research*, vol. 21, no. 6, s. 536-540, ABSTRACT

ŠMEJKALOVÁ J. (2013): Přednáška *Primární a včasná sekundární prevence nádorových onemocnění*, Hradec Králové

TAN W., LU J., HUANG M., LI Y., CHEN M., WU G., GONG J., ZHONG Z., XU Z., DANG Y., GUO J., CHEN X., WANG Y. (2011): Anticancer natural products isolated from Chinese medicinal herb, *Chinese Medicine*, vol. 27, no. 6

TICHOTOVÁ L. (2012): *Přednáška Patobiochemie_Nádory_2012*, Hradec Králové, 2012

TKACHEV A.V.(1987): The chemistry of caryophyllene and related compounds, *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 23, no. 4, s. 393-412

VAHATOVÁ L. (2012): Využití XCelligence při studiu účinků irinotecanu na buňky kolorektálního karcinomu in vivo, Diplomová práce, Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, s. 35-36

VRHLÍKOVÁ L. (2011): Změna antioxidačního statusu buněčných linií podrobených protinádorovým léčivům, Bakalářská práce, Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

WANG A., JOSEPH J.A.(1999): Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free radical biology and medicine*, vol. 27, no. 5-6, s. 612-616

WANG S.J., TONG Y., LU S.A., YANG R., LIAO X., XUY.F., LI X.(2010): Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb.et Zucc. Leaves, *Planta Medica*, vol. 76, s. 1492-1496, ABSTRACT

YANG L.L., CHANG C.C., CHEN L.G., WANG C.C.(2003): Antitumor principle constituents of *Myrica rubra* Var. *acuminata*, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol. 5. s. 2974-2979

YANG Z.F., CAO S.F., ZHENG Y.H.(2011):Chinese bayberry fruit extract alleviates oxidative stress and prevents 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis, *Food Chemistry*, vol. 125, s. 701–705

YU J.Q., LEI J.C., ZHANG X.Q., YU H.D., TIAN D.Z., LIAO Z.X., ZOU G.I. (2011): Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. Var. *hirtus* Regel, *Food Chemistry*, vol. 126, s. 1593-1598

ZHANG W.S., LI X., ZHENG J.T., WANG G.Y., SUN C.D., FERGUSON I.B., CHEN K.S.(2008): Bioactive components and antioxidant capacity of Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. and Zucc.) in relation to fruit maturity and postharvest storage, *Eur Food Res Technol*, vol. 227, s. 1091-1097

ZHAO H. (2012): Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In: *Apoptosis and Medicine*, vyd.1 , InTec, dostupné: <http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review>

Online zdroje:

American type cell culture collection a – Cell line CaCo-2[online]. Poslední revize 16.4.2013 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx>

American type cell culture collection b – Cell line HCT-8[online]. Poslední revize 16.4.2013 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-244.aspx?geo_country=cz#generalinformation

Food and Drug Administration[online]. Poslední revize 2013[cit. 2014-03-02]. Dostupné z: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=172.515>

Pubchem a[online]. Poslední revize 03 2014[cit. 2014-03-01]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=26527448&viewopt=PubChem>

Pubchem b[online]. Poslední revize 2014[cit. 2014-03-01]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=336298>

REUSCH W.: Lipids[online]. Poslední revize 05.2013[cit. 2014-03-02]. Dostupné z: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/lipids.htm#terpen>

Sigma-Aldrich a[online]. Poslední revize 2014 [cit.2014-03-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/53675?lang=en®ion=CZ>

Sigma-Aldrich b[online]. Poslední revize 2014 [cit.2014-03-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w225207?lang=en®ion=CZ>

The University of Queensland News[online]. Poslední revize 2010-11-08 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.uq.edu.au/news/article/2010/11/investors-sought-new-uq-global-fruit-crop>

Yamamomo[online]. Poslední revize 2013-09-07 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://j-gardens.blogspot.cz/2013/09/yamamomo-myrica-rubra.html>