

Univerzita Palackého v Olomouci

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2015

Bc. Lenka Juřicová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Fototoxické účinky přírodních látek

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Lenka Juřicová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.

Pracoviště: LF UP, Ústav lékařské chemie a biochemie

Prohlašuji, že jsem se na vypracování diplomové práce podílela sama, za pomoci
Doc. RNDr. Jitky Vostálové, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....
Bc. Lenka Juřicová

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Lenka Juřicová
Název práce: Fototoxické účinky přírodních látek
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty
Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2015
Abstrakt:

Přírodní látky rostlinného původu vykazují mnoho léčivých účinků, které jsou využívány při léčbě různých onemocnění. U některých z těchto látek jsou známy také jejich nežádoucí účinky na lidský organismus. Alkaloid sanguinarin (SA) je obsažen zejména v rostlinách *Sanguinaria canadensis*, *Macleaya cordata* a *Chelidonium majus*. Extrakty/frakce/čisté látky těchto rostlin jsou pro své biologické vlastnosti součástí přípravků k léčbě kožních onemocnění. Fototoxické vlastnosti SA a jeho metabolitu dihydrosanguinarinu (DHSA) byly studovány na primárních lidských kožních fibroblastech. V použitém koncentračním rozmezí SA snižoval hladinu intracelulárního glutathionu (GSH) a aktivoval kaspasu-3. DHSA neovlivňoval tyto parametry. Netoxická dávka UVA záření zvyšovala toxicitu obou alkaloidů, hlavně DHSA. Aplikace DHSA/SA s nízkomolekulárními antioxidanty N-acetylcysteaminem a dithiotreitem snižovala oxidační stres vyvolaný oběma alkaloidy v kombinaci s UVA zářením. Fototoxickou reakci obou alkaloidů je tedy možno potlačit jejich aplikací s nízkomolekulárními antioxidanty.

Klíčová slova: sanguinarin, dihydrosanguinarin, UVA záření, fototoxicita, glutathion, kaspasa-3, nízkomolekulární antioxidanty

Počet stran: 75

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname: Bc. Lenka Juřicová
Title: Phototoxic effects of natural substances
Type of thesis: Master
Department: Department of Medical Chemistry and
Biochemistry, Faculty of Medicine,
Palacky University, Olomouc
Supervisor: Doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.
The year of presentation: 2015
Abstract:

Natural substances of plant origin have many beneficial properties that are used in the treatment of various diseases. Some of these substances are known for their adverse effects on the human body. The alkaloid sanguinarine (SA) is produced mainly in plants including *Sanguinaria canadensis*, *Macleaya cordata* and *Chelidonium majus*. The extracts/fractions/pure compounds of these plants are used for their diverse biological activities in preparations for the treatment of skin disorders. In this study phototoxic potential of SA and its metabolite dihydrosanguinarine (DHSA) was studied on primary human dermal fibroblasts. In the used concentration range SA decreased intracellular level of glutathione (GSH) and activated caspase-3. DHSA had no influence on these parameters. The non-toxic dose of UVA radiation increased toxicity of both alkaloids, mainly DHSA. The combination of DHSA/SA with low molecular weight antioxidants N-acetylcysteamine and dithiotreitol resulted in suppression of oxidative stress induced by both alkaloids and following UVA radiation. Thus phototoxic reaction of both alkaloids may be reduced by co-treatment with low molecular antioxidants.

Keywords: sanguinarine, dihydrosanguinarine, UVA radiation,
phototoxicity, glutathione, caspase-3,
low molecular antioxidant
Number of pages: 75
Number of appendices: 0
Language: Czech

Poděkování

Velké poděkování patří vedoucí této práce doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, velkou obětavost a trpělivost při práci v laboratoři a vypracování této práce. Děkuji také prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. za možnost vypracovat diplomovou práci na Ústavu lékařské chemie a biochemie a všem zaměstnancům za příjemné prostředí. Dále děkuji za finanční podporu grantu IGA_LF_2015_007 a za Institucionální podporu University Palackého v Olomouci.

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1. Kůže.....	11
2.1.1. Pokožka (<i>epidermis</i>).....	11
2.1.2. Škára (<i>dermis</i>).....	13
2.1.3. Podkožní vazivo (<i>subcutis</i>).....	15
2.1.4. Funkce kůže.....	15
2.2. Sluneční záření.....	16
2.2.1. Účinky slunečního záření na kůži.....	18
2.2.1.1. Časný typ účinku.....	18
2.2.1.1.1. Radiačně podmíněný zánět.....	18
2.2.1.1.2. Pigmentace.....	19
2.2.1.1.3. Syntéza vitamínu D.....	19
2.2.1.2. Pozdní typ účinku.....	20
2.2.1.2.1. Stárnutí kůže.....	20
2.2.1.2.2. Karcinogeneze.....	20
2.2.1.2.3. Imunosuprese.....	21
2.3. Fotosenzibilizace.....	21
2.3.1. Fototoxická reakce.....	22
2.3.2. Fotoalergická reakce.....	24
2.3.3. Fotogenotoxická reakce.....	24
2.4. Přírodní látky s fototoxickými účinky.....	25
2.4.1. Furokumariny.....	25
2.4.1.1. Psoralen.....	26
2.4.1.2. Bergapten.....	26
2.4.1.3. Esenciální oleje.....	27
2.4.1.4. Rostlinné extrakty s fototoxickými účinky.....	28
2.5. Benzo[c]fenantridinové alkaloidy.....	28
2.5.1. Sanguinarin.....	29
2.5.1.1. Biosyntéza sanguinarinu.....	30
2.5.1.2. Biologické vlastnosti sanguinarinu.....	33

2.5.1.3. Praktické využití sanguinarinu.....	34
3. CÍLE PRÁCE.....	35
4. MATERIÁL A METODIKA.....	36
4.1. Biologický materiál.....	36
4.1.1. Kůže.....	36
4.1.2. Buňky.....	36
4.1.3. Alkaloidy.....	36
4.2. Chemikálie a roztoky.....	36
4.2.1. Chemikálie.....	36
4.2.2. Roztoky.....	37
4.3. Laboratorní přístroje a ostatní materiál.....	39
4.3.1. Laboratorní přístroje.....	39
4.3.2. Ostatní materiál.....	39
4.4. Použité metody.....	40
4.4.1. Kultivace lidských fibroblastů.....	40
4.4.2. Příprava fibroblastů pro experimenty.....	40
4.4.3. Aplikace alkaloidů na buňky.....	41
4.4.4. Ozáření buněk.....	41
4.4.5. Metody stanovení cytotoxicity alkaloidů.....	42
4.4.5.1. Stanovení aktivity LDH v médiu.....	42
4.4.5.2. Stanovení životnosti buněk pomocí neutrální červeně.....	43
4.4.6. Stanovení aktivity kaspasy-3.....	43
4.4.7. Stanovení hladiny redukováného glutathionu (GSH).....	44
4.4.8. Stanovení bílkovin.....	45
4.4.8.1. Stanovení bílkovin metodou Bradfordové.....	45
4.4.8.2. Stanovení bílkovin metodou dle Lowryho.....	46
4.4.9. Statistická analýza.....	46
5. VÝSLEDKY	47
5.1. Toxicita a fototoxicita SA a DHSA na kožních fibroblastech měřená inkorporací neutrální červeně.....	47
5.2. Vliv nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu alkaloidů SA a DHSA studovaný na kožních fibroblastech.....	49
5.2.1. Vliv nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu alkaloidů sledovaný změnou aktivity LDH v médiu.....	49

5.2.2. Vliv nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu alkaloidů sledovaný změnou aktivity kaspasy-3.....	52
5.2.3. Vliv nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu alkaloidů sledovaný intracelulárním obsahem redukovaného glutathionu..	56
6. DISKUSE.....	61
7. ZÁVĚR.....	65
8. LITERATURA.....	66
9. SEZNAM ZKRATEK.....	75

1. ÚVOD

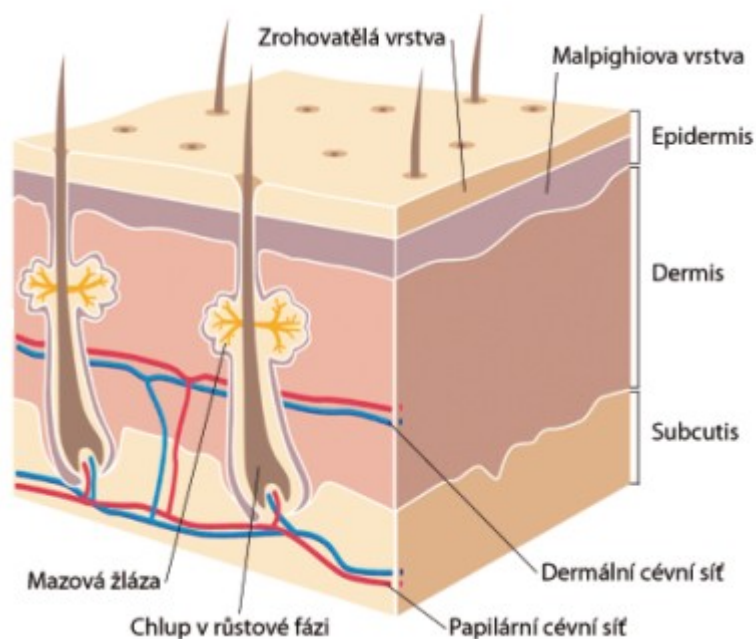
Lidský organismus je po dobu svého života nepřetržitě vystaven vlivu řady fyzikálních, chemických i biologických faktorů. Jedním z těchto faktorů je i sluneční záření a jeho vliv na lidskou kůži, která je první ochrannou bariérou těla. Topická aplikace některých látek však může být v kombinaci se slunečním zářením spojena s fototoxickou reakcí, která může poškodit zdravou tkáň. V takovém případě dochází k toxické odezvě kůže na látku aplikovanou na tělo, která je vyvolána po následné expozici světlu.

Benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (BA) jsou pro své různorodé biologické účinky součástí mnoha kosmetických produktů a přípravků pro léčbu kožních onemocnění. Využívány jsou také v lidovém léčitelství a homeopatii. Naproti tomu některým BA nebo rostlinným extraktům je obsahujícím jsou připisovány nežádoucí účinky na lidský organismus. Do skupina BA patří i rostlinný alkaloid sanguinarin (SA), jehož topická aplikace je spojena s již zmíněnou fototoxickou reakcí, a proto cílem této diplomové práce bylo zkoumat zda, krátkodobá aplikace SA a jeho metabolitu dihydrosanguinarinu (DHSA) v kombinaci s netoxickou dávkou UVA záření na primární kultury lidských kožních fibroblastů může vyvolat také fototoxickou reakci. Současně byl studován vliv nízkomolekulárních antioxidantů (N-acetylcystein, dithiotreitol) na změny vyvolané samotnými alkaloidy nebo jejich kombinací s netoxickou dávkou UVA.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kůže

Kůže (*cutis*) je z hlediska plochy největší orgán lidského těla. U dospělého člověka zaujímá plochu 1,5 až 1,8 m² a dosahuje hmotnosti až 4,5 kg. Vytváří souvislý tělní povrch, čímž odděluje vnitřní prostředí organismu od zevního. Její tloušťka kolísá podle oblasti těla od 0,5 do 4 mm, ale obecně se dělí na tenkou, která pokrývá většinu tělního povrchu a silnou vyskytující se především na dlaních a nohou. Oba typy kůže se skládají ze dvou odlišných, ale těsně připojených vrstev – pokožky (*epidermis*) a škáry (*dermis*), které leží na podkožní vazivě (*subcutis*) (Obr.1).

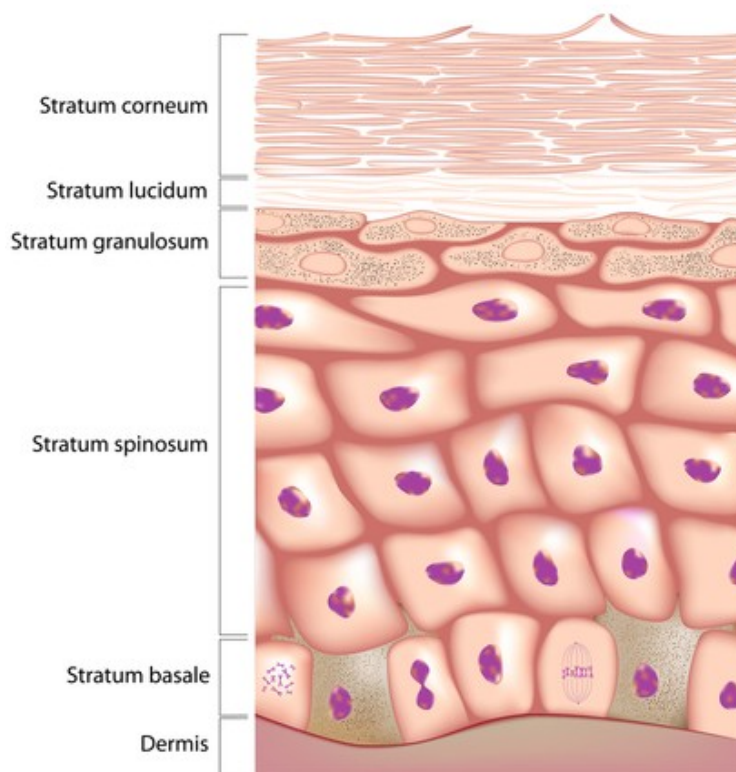


Obr.1: Stavba kůže (www.hypro.cz).

2.1.1. Pokožka (*epidermis*)

Pokožka je vrstva buněk, které se vyskytují na povrchu kůže. Horní část pokožky je tvořena zrohovatělými buňkami, které se postupně odlupují z povrchu. Spodní část se skládá z živých buněk a označuje se jako Malpighiova vrstva. Pokožka je tvořena převážně keratinocyty, které se nacházejí v různém stupni

diferenciace a vytvářejí celkem pět vrstev *epidermis*. Počínaje od nejhlubší vrstvy směrem k povrchu to jsou *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (Obr.2). Kromě keratinocytů obsahuje pokožka i další typy buněk jako melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky.



Obr.2: Struktura pokožky (www.coloradoskinandvein.com).

Keratinocyty jsou buňky účastníci se kontinuálního procesu obnovy povrchu kůže. Tento proces, kdy se keratinocyty posouvají k povrchu kůže, ztrácejí schopnost dělení a prodělávají přeměnu z vysokých cylindrických buněk v buňky ploché a bezjaderné, se nazývá keratinizace a trvá 3-4 týdny. Náhrada vrstev kůže závisí na bazálních buňkách *epidermis*, nacházejících se ve vrstvě *stratum basale*. Tyto buňky mají trvalou schopnost dělení, takže poskytují generace buněk, které se stávají povrchovými buňkami pokožky a přitom stále zůstává zachován jejich určitý počet (Dylevský *et al.* 2009). Nad *stratum basale* je několik vrstev velkých keratinocytů, které již ztratily tuto mitotickou aktivitu a tvoří vrstvu ostnitou (*stratum spinosum*). Nad touto vrstvou se směrem k povrchu kůže nachází 1-5 vrstev plošších buněk, jejichž jádra jsou v procesu degenerace. Tyto buňky obsahující keratohyalin, prekursor keratinu a tvoří vrstvu *stratum granulosum*. Po ztrátě buněčného jádra se

vrstva mění ve *stratum lucidum*, tvořenou plochými buňkami obsahujícími další prekurzor keratinu, bílkovinu eleidin. *Stratum lucidum* přechází v poslední povrchovou vrstvu *stratum corneum*, tvořenou mnoha vrstvami mrtvých, bezjaderných buněk s minimálním obsahem vody tzv. korneocytů. Tyto buňky představují konečnou fázi keratinizace a jsou vyplněny zralým keratinem. Na povrchu kůže se korneocyty kontinuálně odlupují v podobě drobných šupinek (*stratum disjunctum*) a jsou nahrazovány buňkami z hlubších vrstev (Lichnovský *et al.* 2002).

Melanocyty jsou dendritické buňky migrující do pokožky v průběhu embryogeneze. Jsou rozptýleny mezi keratinocyty ve *stratum basale*. Obsahují specifické organely melanosomy s tmavým pigmentem melaninem. Melanosomy jsou transportovány procesem cytotkrinní sekrece do cytoplazmy okolních keratinocytů, kde se hromadí okolo jader a chrání tím jejich DNA před poškozujícím účinkem slunce. Ačkoliv tmavá barva melaninu umožňuje, aby se některé paprsky absorbovaly přímo, hlavní ochranný účinek melaninu spočívá v jeho schopnosti absorbovat volné radikály (Paulsen, 2004).

Langerhansovy buňky jsou důležitou součástí imunitního systému. Zpracovávají a prezentují lymfocytům antigenní materiál, který pronikl povrchem kůže. Do *dermis* se dostávají krevní cestou a po kontaktu s antigenem se vracejí zpět lymfatickou cestou do regionální lymfatické uzliny. Langerhansovy buňky jsou vysoce citlivé na ultrafialové záření a uplatňují se při patologických reakcích např. vzniku atopického ekzému (Elišková *et al.* 2006).

Merkelovy buňky se nacházejí v hlubších vrstvách pokožky, kde jsou v kontaktu se zakončením nervových vláken. Funkce Merkelových buněk není zcela vyjasněna. S největší pravděpodobností fungují jako mechanoreceptory a vyskytují se převážně v pokožce prstů (Paulsen, 2004).

2.1.2. Škára (*dermis*)

Škára je pevná a pružná vazivová vrstva kůže (Obr.1). Tvoří ji dvě vrstvy, které na společné hranici splývají. Povrchová vrstva (*stratum papillare*) je řídké vazivo s mnoha buňkami. Hlubší vrstvu (*stratum reticulare*) tvoří tuhé vazivo s malým počtem fibroblastů a silnými svazky kolagenních a elastických vláken, která se splétají v prostorovou síť (Lichnovský *et al.* 2002). V obou vrstvách *dermis* jsou

vedle převládajících fibroblastů také mastocyty a makrofágy.

Fibroblasty jsou základní buňky vazivové tkáně, jejichž funkcí je udržení tkáňové homeostázy a celistvosti zdravých tkání (Brychtová *et al.* 2010). Jedná se o nejméně specializované buňky, které se za určitých podmínek mohou přeměnit na jednu dalších buněk pojivové tkáně, jako je osteoblast, adipocyt, chondrocyt, či buňka hladké svaloviny. Kožní fibroblasty, hvězdicovitého tvaru s výrazným buněčným jádrem, se účastní procesu hojení ran. V místě poranění se rychle dělí a produkují materiál vyplňující tkáňové defekty. Secernují hlavně kolagen typu III, který je následně nahrazen kolagenem typu I (Paulsen, 2004). Při rozsáhlém poranění kůže je možné odebrat vlastní fibroblasty, které lze po kultivaci a po dostatečném namnožení transplantovat zpět a urychlit tak proces hojení (Elišková *et al.* 2006). V poslední době se stále více zájmu soustřeďuje na roli fibroblastů u nádorových onemocnění, kde se tyto buňky podílejí na transformaci nádorového stromatu a tvorbou řady růstových faktorů přispívají k progresi nádoru (Brychtová *et al.* 2010).

Mastocyty neboli žírné buňky se vyskytují v různých tkáních, ale nejčastěji se nacházejí v kůži a trávicí soustavě. Podobně jako krevní buňky vznikají z hematopoetické kmenové buňky, ale na rozdíl od červených či bílých krvinek zůstávají natrvalo v tkáni. Obvykle jsou oválného tvaru, dosahují velikosti až 30 μm a obsahují množství zrnitých váčků (granul) uchovávajících látky jako heparin či histamin. Za určitých okolností jsou mastocyty schopné uvolňovat tyto látky a bránit tak srážení krve (heparin) či zprostředkovat vznik alergické reakce (histamin).

Makrofágy jsou buňky přirozené imunity a hrají velmi důležitou roli v imunitních reakcích. Vznikají přeměnou z monocytů, jež jsou tvořeny v kostní dřeni z hematopoetické kmenové buňky. Základní funkcí makrofágů je fagocytóza. Buňky pohlcují pevné částice z okolního prostředí. K dalším důležitým funkcím patří prezentace antigenu T-lymfocytům, řízení hemostázy, regulace zánětu, destrukce mikroorganismů a odstraňování mrtvých buněk.

Ve škáře se nachází také mnoho volných nervových zakončení pro vnímání hmatu (Meissnerova tělíska), tepla (Ruffiniho tělíska) a chladu (Krauseho tělíska). Jsou zde uloženy také vlasové folikuly, potní žlázy a mazové žlázy a krevní cévy (Dylevský *et al.* 2009).

2.1.3. Podkožní vazivo (*subcutis*)

Podkožní vazivo je nejhluběji uloženou vrstvou kůže, která fixuje škáru k fascii či periostu (okostici) (Obr.1). Je tvořena převážně adipocyty, fibroblasty a makrofágy. Jde o potenciální tukovou tkáň, schopnou ukládat v buňkách velké množství tukových kapének. Funkcí tohoto podkožního vaziva je izolovat a chránit svaly a nervy. Nachází se zde Vater-Paciniho tělíska, která jsou receptory tlaku a tahu (Dylevský *et al.* 2009). Podkožní tuková vrstva určuje tvar a hmotnost celého těla. Způsob jejího rozložení je ovlivněn pohlavními hormony, a proto se u muže a ženy liší. U žen bývá tato vrstva obvykle silnější.

2.1.4. Funkce kůže

Kůže tvoří první linii obrany organismu před vlivy vnějšího prostředí. Svou stavbou vytváří účinnou fyzikální, biochemickou a imunologickou bariéru a ochraňuje tělo před toxickými látkami, dehydratací, ultrafialovým zářením, nárazem a třením. Kyselé prostředí na povrchu kůže brání průniku mikroorganismů, čemuž napomáhá i produkce potu a mazu obsahujících antibakteriální látky. Mikroorganismy, které proniknou touto bariérou do kůže, jsou zneškodněny lymfocyty a makrofágy. Proti ultrafialovému záření se kůže brání produkcí melaninu a rovněž kožního mazu.

V kůži se nachází několik typů receptorů, které zprostředkovávají informace mezi zevním prostředím a organismem. Umístění jednotlivých typů receptorů v kůži a jejich počet se v různých oblastech těla liší. Jde zejména o mechanoreceptory, jež jsou schopné reagovat na dotyk, tlak a vibrace. Zvláštní typy receptorů, nociceptory, reagují na bolestivé podněty a termoreceptory registrují tepelné rozdíly. Na řízení tělesné teploty se kůže podílí změnou průsvitu cév. V chladném prostředí se cévy stahují (vazokonstrikce), dochází ke zmenšení průtoku krve, a tím k zpomalení výdeje tepla. V teplém prostředí dochází k opačnému stavu, tedy k rozšíření cév (vazodilataci). Ztráta přebytečného tepla je usnadněna odpařováním potu.

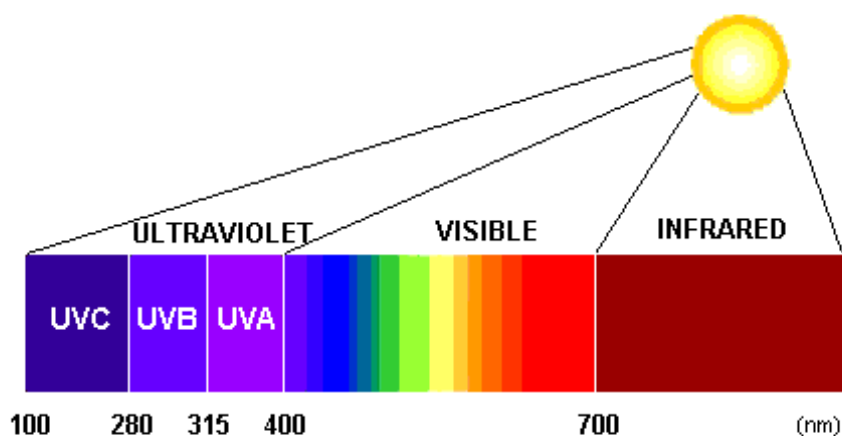
Prostřednictvím kůže se vstřebává a vylučuje velké množství látek. Vstřebávací schopnost kůže je omezena na látky rozpustné v tucích a využívá se při podávání léků ve formě mastí a krémů. Maz na povrchu kůže napomáhá udržet pro vodu nepropustné prostředí a látky rozpustné v tucích tak pronikají kůží snáze.

Zdravá kůže je schopna absorbovat jen malé množství látek. Poškozená nebo nemocná kůže má však změněnou nebo zvýšenou propustnost resorpční schopnosti, což může vést k rozvoji infekcí způsobených mikroorganismy (Rokyta *et al.* 2002).

2.2. Sluneční záření

Sluneční záření je zdrojem energie mnoha procesů probíhajících na Zemi. Přírodním zdrojem takového záření je slunce a jiné hvězdy. V přírodě má toto záření hlavní význam ve fotosyntéze, která je základním procesem udržujícím zemský život.

Sluneční záření je v podstatě elektromagnetickým vlněním, které je tvořené ultrafialovou (UV), viditelnou (VIS) a infračervenou (IR) oblastí (Obr. 3). UV oblast se dělí se podle vlnové délky na vzdálené UVC záření (100 - 280 nm), střední UVB záření (280 - 315 nm) a blízké UVA záření (315 - 400 nm). Sluneční záření o vlnové délce mezi 400 - 700 nm je označováno jako VIS světlo. Záření v pásmu nad 700 nm se nazývá IR a má výrazné tepelné účinky (Grether-Beck *et al.* 2014).

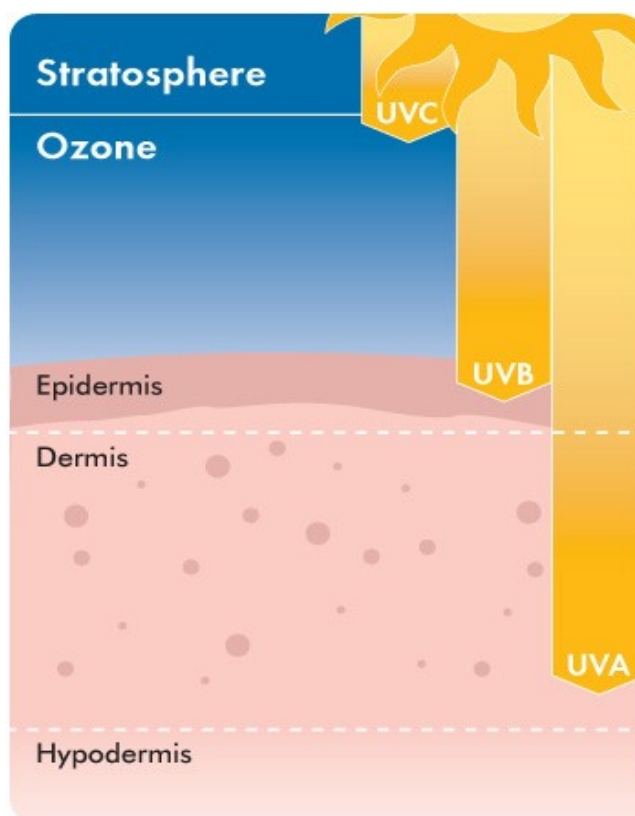


Obr. 3: Sluneční spektrum (www.uvbnarrowband.com).

Na zemský povrch dopadá sluneční záření modifikované přechodem přes atmosféru. Hlavním filtrem je ozónová vrstva (stratosféra), dalšími faktory jsou přítomnost mraků, částic prachu a kouř. Atmosféra zachytává oblast vlnových délek UVC, které jsou životu na Zemi nebezpečné (Obr. 4).

Záření UVB je z větší části absorbováno ozónovou vrstvou a na zemský povrch ho dopadá zhruba 5 %. Po dopadu na kůži prostupuje toto záření především do *epidermis* (Obr. 4) (Bernerd a Asselineau, 1998). Jde o energeticky bohaté záření, které se podílí na poškození buněčných makromolekul, včetně DNA a proteinů, což může v konečném důsledku vést až k mutacím genetické informace kožních buněk a vzniku rakoviny kůže (Burgeson a Christiano, 1997; Ouhtit a Ananthaswamy, 2001).

Samotné UVA záření je ve srovnání s UVB zářením méně karcinogenní a podílí se zejména na fototoxických reakcích. Díky delší vlnové délce se dostává hluboko do kůže a proniká až do *dermis* (Obr. 4), kde vyvolává tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), které poškozují nukleové kyseliny, bílkoviny, lipidy a cukry. Jde o energeticky méně bohaté záření jehož fotobiologický efekt je dlouhodobý.



Obr. 4: Průnik ultrafialového záření do kůže (www.beyondcoaltal.com).

Nedávné studie rovněž prokázaly, že lidský organismus je ovlivňován i vlnovými délkami mimo UV spektrum. Jedná se o VIS a IR záření. Významné biologické účinky má především blízké pásmo IR záření (IRA), které je obsaženo ve slunečním světle a proniká až do podkoží a ovlivňuje také zrak. Dlouhodobé

působení tohoto záření způsobuje zejména šedý zákal oční čočky (Krutmann *et al.* 2012).

2.2.1. Účinky slunečního záření na kůži

Kůže tvořící povrch lidského těla je vystavena slunečnímu světlu, a proto na něj přirozeně reaguje. Nejvíce biologické aktivity vyvolává v kůži oblast UV záření (Slominski a Pawelek, 1998), která se také využívá léčebně u špatně se hojících ran a některých kožních onemocněních. Fyziologické i biologické účinky UV záření závisejí na intenzitě záření, dávce ozáření, schopnosti absorpce záření tkáněmi a na citlivosti organismu. Poškození kůže UV světlem může nastat při zvýšené citlivosti kůže, při některých onemocněních a při podání některých léků. Současné působení IR záření zvyšuje účinek UV záření a tím se zvyšuje i vnímavost kůže (Grether-Beck *et al.* 2014). V zásadě se účinky vyvolané UV zářením na kůži dají rozdělit na časné a pozdní.

2.2.1.1. Časný typ účinku

Časné kožní reakce, vyvolané pobytem na slunci, mohou mít charakter pozitivní i negativní. Prospěšné účinky slunečního záření jsou již dlouhou dobu známé, patří k nim především pocity duševní pohody, tvorba vitamínu D a vznik opálení. Negativní kožní reakce vznikají nejčastěji v důsledku dlouhodobého pobytu na slunci. K nejzákladnějším časným kožním reakcím tohoto typu patří radiačně podmíněný zánět.

2.2.1.1.1. Radiačně podmíněný zánět

Radiačně podmíněný zánět vzniká jako reakce organismu na poškození epidermálních a dermálních buněk, ke kterému dochází v důsledku zvýšené expozice kůže slunečnímu záření. Po absorpci UVB záření dochází k poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a aromatických aminokyselin, což se odráží v narušení buněčné signalizace a poruchou buněčných a tkáňových funkcí a projevující se zánětem (Boh, 1996). Jde v podstatě o přirozenou reakci kůže na ozáření slunečním světlem. Vývoj zánětlivé reakce závisí jednak na genetickém fototypu

kůže, aktuální pigmentaci, hloubce rohové vrstvy kůže, a jednak na intenzitě záření a délce expozice.

Zánětlivá reakce klinicky připomíná popálení 1. a 2. stupně. Příznaky se objevují v průběhu několika hodin až dní a patří k nim zejména začervenání (erytém), pálení, svědění, puchýře, otoky a bolestivost kůže s eventuálním ztmavnutím kůže. Při větším rozsahu postižení se vyskytují celkové příznaky, jako horečka a zvracení. Zánětlivá reakce může být zvýšena i fototoxickým mechanismem (Ettler, 2007), kterému se více věnuje následující kapitola (2.3.1. Fototoxická reakce).

2.2.1.1.2. Pigmentace

Pigmentace je projevem obranné reakce organismu vůči dalšímu poškozujícímu působení UV záření. Jde o fyziologickou odpověď melanocytů na působení slunečního záření. Rozeznáváme okamžitou pigmentaci, vznikající již během ozáření a opožděnou pigmentaci, která je patrná za 3 až 4 dny. Včasná pigmentace vzniká účinkem UVA záření, přetrvává jen několik hodin a je projevem redistribuce existujícího melaninu v epidermálních melanocytech (Gilchrest *et al.* 1996). Opožděná reakce je vyvolána především UVB zářením, ale i vyššími dávkami UVA záření a přetrvává týdny až měsíce. Po expozici slunečním zářením dochází v melanocytech k syntéze enzymu tyrosinasy a následně k tvorbě melaninu. Tento pigment pak brání průchodu pronikavějšího záření UVA do hlubších vrstev kůže. Podle geneticky podmíněné individuální vnímavosti kůže na účinky slunečního záření můžeme klinicky rozlišit šest fototypů kůže.

2.2.1.1.3. Syntéza vitamínu D

Z pozitivních účinků UV záření lze uvést syntézu vitamínu D ze 7-dehydrocholesterolu. Vitamin D účinně řídí metabolismus vápníku a je tak důležitý pro správnou mineralizaci kostí, zubů a pozitivně ovlivňuje i nervový systém. Za syntézu vitamínu D odpovídá UVB záření o vlnové délce 295 - 315 nm. Proto se UV záření těchto vlnových délek využívá v léčbě a prevenci křivice, která je způsobena nedostatkem vitamínu D. Pokud je expozice UV záření nedostatečná, musí být vitamin D podáván perorálně. V letních měsících stačí pro dostatečnou syntézu

vitaminu D expozice slunečnímu záření v oblasti obličeje a rukou asi po dobu 15 minut třikrát týdně (Giacomoni, 2007).

2.2.1.2. Pozdní typ účinku

K pozdním projevům poškození kůže vlivem slunečního UV záření patří zrychlené stárnutí, rakovina kůže a imunosuprese. Zejména UVB záření, které obsahuje nejvíce energetických fotonů, se podílí na všech těchto poškozeních (Sarasin, 1999). Avšak nedávné studie prokázaly, že se na těchto pozdních kožních projevech podílí i UVA záření (Lavker *et al.* 1995; Damian *et al.* 1999). Pobyt na slunci může rovněž pozitivně či negativně ovlivnit klinický průběh i některých dalších chorob kůže s jinou etiologií (*herpes simplex*, *lupus erythematosus*, *dyskeratosis follicularis*), které se také řadí mezi pozdní účinek slunečního záření.

2.2.1.2.1. Stárnutí kůže

Stárnutí kůže je přirozený proces, který je kombinací chronologického stárnutí (věkem) a škod, které na kůži způsobily zevní vlivy. Ze zevních vlivů přispívá k urychlenému procesu stárnutí kůže zejména opakované a nadměrné vystavování kůže účinkům slunečního záření. Chronické působení UVA záření způsobuje degradaci kolagenu, čímž dochází k tvorbě hrubých vrásek a stárnutí kůže. Nedávné studie ukazují, že se na tomto procesu podílí i IR záření (Kim *et al.* 2005; Cho *et al.* 2008). Kůže dlouhodobě a opakovaně vystavovaná slunečnímu záření ztrácí svou funkci a dochází ke změnám struktury. V buňkách dochází ke snížené schopnosti odstraňovat poškozené makromolekuly, které se hromadí uvnitř buněk. Tyto procesy se následně kombinují s přirozeným stárnutím kůže, které však postihují celý kožní povrch, nejen slunci často exponované místa.

2.2.1.2.2. Karcinogeneze

Karcinogeneze je mnohastupňový proces, jehož spouštěcím mechanismem je změna buněčného genomu. UVB záření je známo tím, že v kůži vyvolává chemické poškození genetické informace a zprostředkovaná rozvoj rakoviny kůže (Wondrak *et al.* 2005; Young, 2009). Dochází jednak k vytváření zlomů na DNA, modifikaci bází,

tvorbě fotoproduktů a k uvolňování ROS (Saraf *et al.* 2014). Nedávné studie rovněž ukazují, že i oblast IRA může přispívat k rozvoji rakoviny kůže (Jantschitsch *et al.* 2011). Buňky jsou samozřejmě schopny reparačním systémem endonukleas, polymeras a ligas vyříznout poškozený úsek DNA a nahradit jej novým. Příkladem nemoci, při níž tento mechanismus selhává je *Xeroderma pigmentosum*, geneticky podmíněná enzymová porucha, při níž v buňkách chybí reparační enzym, který odstraňuje pyrimidinové dimery vzniklé působením UV světla. V důsledku neschopnosti buněk odstraňovat vzniklé defekty DNA je výskyt karcinomu výrazně vyšší (Robert a Dubertret, 1995). Rozvoj karcinomu kožních buněk může vzniknout i v důsledku špatné absorpční ochrany opalovacích krémů, které jsou používány proti UV vlnovému pásmu slunečního záření (Rosentein *et al.* 1999).

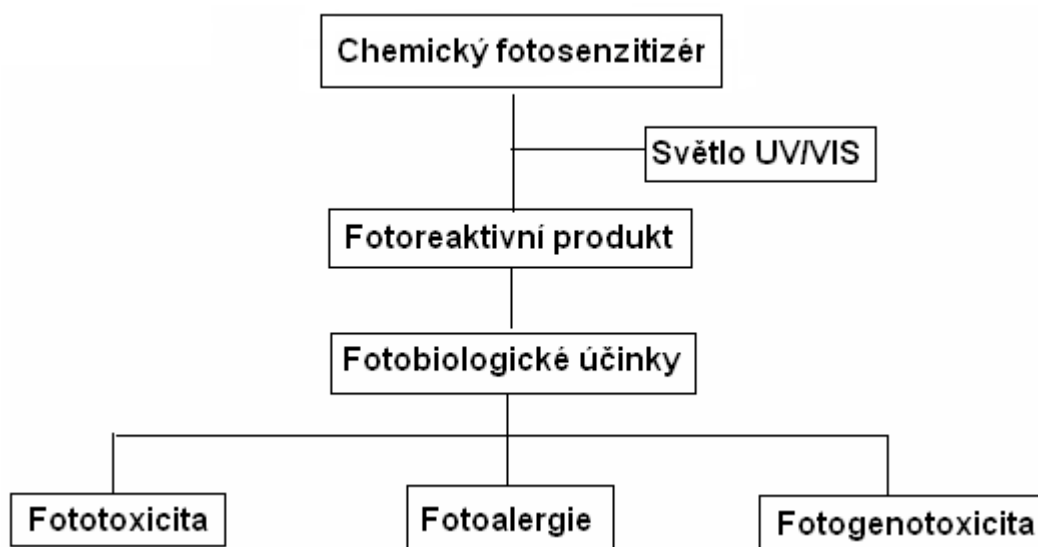
2.2.1.2.3. Imunosuprese

Imunosuprese je stav, kdy je imunitní systém oslaben a není schopen plně reagovat na cizorodé organismy nebo onemocnění. Tato snížená obranyschopnost může být navozena i slunečním světlem, zejména UV zářením. Vlnové délky UVA záření tlumí aktivitu zabíjejících buněk (natur killers), zatímco vlnové délky UVB světla způsobují pokles bílých krvinek a vyvolávají lymfopenii. Ultrafialová oblast slunečního světla způsobuje kvantitativní i kvalitativní změny imunokompetentních buněk a dochází rovněž ke změně prezentace antigenů Langerhansovými buňkami výsledkem čehož je imunosuprese navozená UV světlem (Robert a Dubertret, 1995; Slominski a Pawelek, 1998).

2.3. Fotosenzibilizace

Fotosenzibilizace je proces při němž dochází k nežádoucí kožní reakci na jinak běžně neúčinné dávky záření vlivem přítomnosti specifické fotoaktivní látky tzv. fotosenzitizéru, který absorbuje záření specifické vlnové délky (Ouhtit a Ananthaswamy, 2001; Gruber *et al.* 2007). Absorbovaná energie vyvolává excitaci fotoaktivní látky, čímž dochází ke vzniku fotoreaktivního produktu, který reaguje s biomolekulami a v konečném důsledku způsobuje poškození buňky a vznik nežádoucí kožní reakce. Podle mechanismů, které se uplatňují při poškození

organismu, se tyto nežádoucí kožní reakce dělí na fototoxické, fotoalergické a fotogenotoxické (Obr. 5). Fotoaktivní látky se do kůže dostávají buď kontaktem či krevní cestou (exogenní) nebo vznikají v organismu samotném (endogenní). K exogenním látkám patří jak látky chemické, které jsou součástí předmětů běžného užívání např. kosmetických prostředků, tak látky rostlinného původu a dokonce i některá léčiva (Spielmann *et al.* 1994).



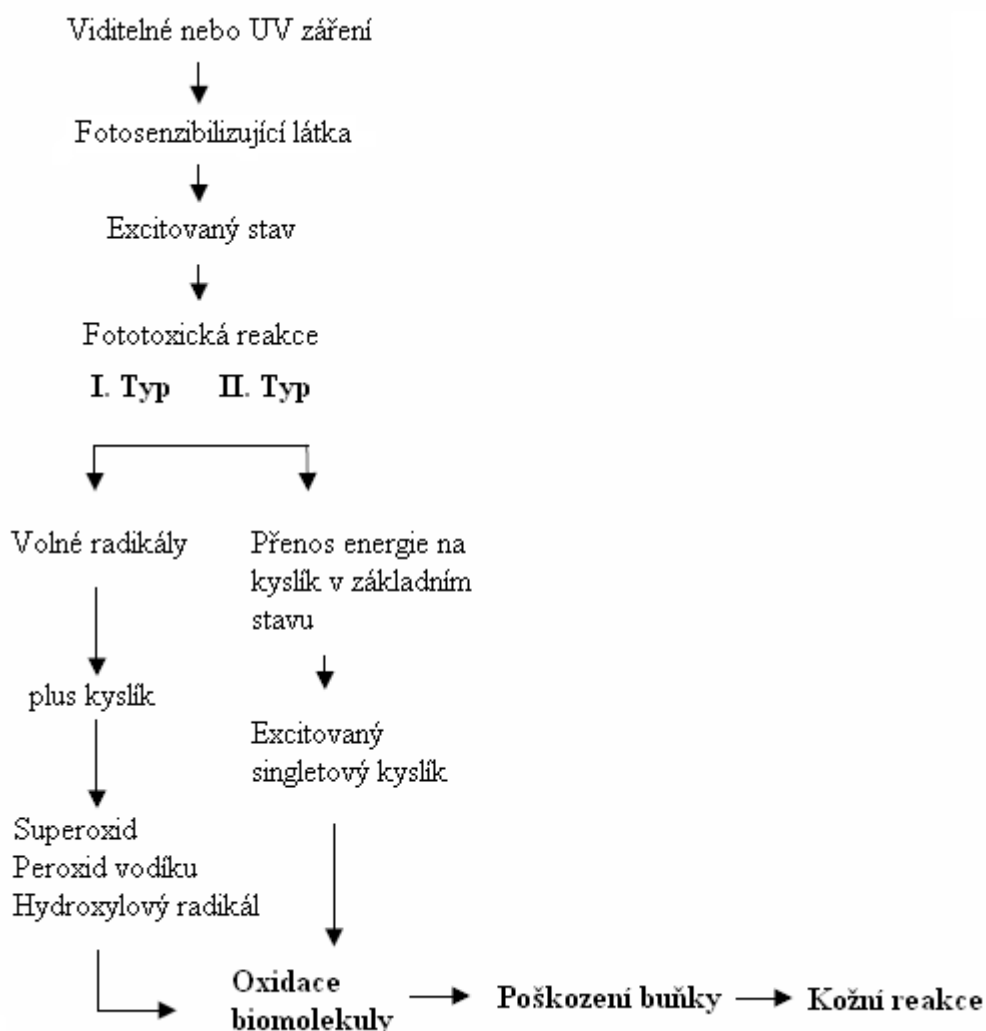
Obr. 5: Fotobiologické účinky (upraveno podle Spielmann *et al.* 1994).

2.3.1. Fototoxická reakce

Fototoxickou reakci můžeme definovat jako toxickou odezvu kůže na látku aplikovanou na tělo nebo podanou systémově, která je vyvolána po následné expozici světlu. Tento typ reakce se může vyvinout u každého jedince, který přišel do kontaktu s fototoxicky působící látkou a byl vystaven dostatečně vysoké dávce záření. Vznik fototoxické reakce závisí na dostatečné absorpci a distribuci látky v tkáních. Fototoxický potenciál příslušné látky se snižuje s fungující vylučovací a detoxikační schopností organismu. Účinek většiny fotoaktivních látek je spuštěn vlivem UV-A záření, existuje však i řada látek se specifickou reakcí na UVB záření nebo na viditelné světlo (Marzulli a Maibach, 1987).

Pro vznik fototoxické reakce je nezbytná absorpce fotonu UV či viditelného záření fotosenzibilizující látkou (Obr. 6). Tímto způsobem dochází ke vzniku nestabilního excitovaného stavu tj. singletu nebo převažujícímu tripletu a k rozvoji

fototoxická reakce I. nebo II. typu. Při fototoxické reakci I. typu fotosenzibilizující látka v excitovaném stavu vyvolává produkci volných radikálů, které následně reagují s kyslíkem za vzniku ROS. Vytvořené ROS (superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (OH^\cdot)) následně oxidují biomolekuly (Crowson *et al.* 2003). Při fototoxické reakci II. typu dochází k přenosu energie z fotosenzibilizující látky v excitovaném stavu na kyslík v základním stavu. Tímto způsobem vzniká excitovaný singletový kyslík, který je vysoce reaktivní a jeho oxidační účinek poškozuje biomolekuly např. lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (Spielmann *et al.* 1994). Poškození biologicky významných molekul (fototoxickou reakcí I. i II. typu) vede ke změnám v aktivitě enzymů, je narušena syntéza nukleových kyselin či specifických bílkovin a dochází k poškození buněk a vzniku nežádoucí kožní reakce.



Obr. 6: Mechanismy fototoxické reakce (upraveno dle Spielmanna *et al.* 1994).

Typ fototoxické reakce závisí na typu fotoaktivní látky, charakteru biologického substrátu (nukleová kyselina, protein, část membrány) a na reakčních podmínkách (pH, obsah kyslíku). Typickým klinickým projevem fototoxické reakce je ostře ohraničený erytém, edém, svědění, zvýšená teplota kůže a při výraznější reakci až puchýře (Kerr *et al.* 2007). Během zánětlivého procesu dochází k uvolnění histaminu, derivátů kyseliny arachidonové a prostaglandinů (Marzulli a Maibach, 2004). V blízkosti lokálně působících fototoxických látek vznikají ložiska zánětu a rozvíjí se i výrazná dlouhotrvající pigmentace (Ditrichová, 2008).

2.3.2. Fotoalergická reakce

Na rozdíl od fototoxických reakcí, které se mohou vyvinout u každého jedince vystaveného UV záření za přítomnosti fototoxicky působící látky, u fotoalergických reakcí dochází účinkem slunečního záření k transformaci těchto látek či ke změně prostorové struktury těchto substancí, čímž se mohou v kůži přeměnit na kompletní antigeny, které mají schopnost vyvolávat imunitní odpověď hypersenzitivního typu. Fotoalergické reakce jsou nejčastěji výsledkem imunitní reakce pozdního typu, která je zprostředkována T-lymfocyty (Dubakiene a Kupriene, 2006) a klinicky se projevuje jako ekzém (Ditrichová, 2008). Fotoalergické reakce vznikají u osob, u kterých se vyvinula přecitlivělost na daný alergen, který vzniká v kůži účinkem UV světla, v ojedinělých případech i viditelného světla. Fotoalergizující potenciál má mnoho látek, které se používají například jako léčiva, nebo jsou součástí mýdel, kosmetických přípravků, případně jde o organické filtry na ochranu proti slunečnímu záření (např. benzofenony). Ačkoliv nejsou fotoalergické reakce tak časté jako reakce fototoxické je třeba mít na paměti, že každá fototoxicky působící látka může zapříčinit také reakci fotoalergickou.

2.3.3. Fotogenotoxická reakce

Fotogenotoxický potenciál některých látek souvisí se vznikem ROS, které narušením genetické informace a jiných buněčných struktur vytvářejí mutace, jež mohou v konečném důsledku vést až ke vzniku nádorů (Loveday, 1996). Fotogenotoxický potenciál byl potvrzen u řady látek používaných ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu, jedná se např. o psoraleny, fenothiaziny, fluorochinolony a

další substance (Wolkenstein a Revuz, 1995). V poslední době je značná pozornost věnována genotoxickému potenciálu 8-methoxypsoralenu, který je více jak 30 let využíván ve fotochemické terapii lupénky a jiných kožních chorob v rámci tzv. PUVA terapie. Tento speciální typ léčby kombinuje UV záření s látkou, která zvýší citlivost kůže k tomuto záření. V posledních letech bylo prokázáno, že aplikace 8-methoxypsoralenu v rámci PUVA terapie může vést ke zvýšenému výskytu maligních melanomů a jiných typů kožních nádorů (Müller *et al.* 1998).

2.4. Přírodní látky s fototoxickými účinky

Přírodní látky rostlinného původu jsou používány lidmi již po několik tisíciletí a staly se nedílnou součástí každodenního života. Léčivé účinky přírodních látek jsou již dlouhou dobu známy a využívány jak v tradiční, tak i klasické medicíně. Některé z těchto přírodních látek však mohou mít fototoxické vlastnosti a vyvolávat nežádoucí kožní reakce tzv. fytofotodermatózy. Jde o zvláštní formu fototoxické dermatitidy, při které se jako fototoxicky účinné látky uplatňují zejména furokumariny rostlinného původu (Zhai a Maibach, 2004).

2.4.1. Furokumariny

Furokumariny jsou obranné látky, které jsou součástí silic některých rostlin. Jde o heterocyklické sloučeniny s kumarinovou strukturou navázanou na furanové jádro (Tisserand a Balacs, 1995). Vyskytují se především v rostlinách z čeledi miříkovité (*Apiaceae*), routovité (*Rutaceae*) a morušovníkovité (*Moraceae*). Tyto fotoaktivní látky zcitlivují kůži na slunce nejen po kontaktu, ale i po perorálním podání (Pathak, 1986). Absorbují UV záření v rozsahu 300-335 nm, čímž dochází k vzniku fototoxické reakce II. typu. Následné poškození buněčných membrán, enzymů a jader je způsobeno singletovým kyslíkem, který vznikl v rámci fototoxické reakce (Morliere *et al.* 1990). Mezi nejrozšířenější furokumariny patří psoralen a bergapten (Zhai a Maibach, 2004).

2.4.1.1. Psoralen

Psoralen je jednou z nejznámějších látek patřících do skupiny furokumarinů. Nachází se v některých běžných druzích zeleniny (celer, petržel), ovoci (citron, limetka), ale také v rostlinách jako je např. třemdava bílá (*Dictamnus albus*). Vědecké studie jasně ukazují, že psoralen zvyšuje citlivost kůže k UV záření a je tedy látkou s fototoxickými účinky (Ljunggren, 1990). Některé odrůdy celeru musely být dokonce staženy z trhu, protože v rámci šlechtění u nich došlo až k osminásobnému zvýšení obsahu psoralenu, což vedlo k závažným kožním onemocněním u dělníků, kteří se zmíněnou odrůdou přišli do přímého kontaktu. Fototoxický potenciál psoralenu dokládá také zaznamenaný případ, kdy konzumace citrusového džusu s vysokým obsahem psoralenu vyvolala fototoxickou reakci po následné návštěvě solária (Ljunggren, 1990). Této negativní vlastnosti psoralenu se ovšem využívá i léčebně v rámci PUVA terapie, kdy tablety psoralenu zvyšují citlivost kůže k léčebným účinkům UVA záření (Müller *et al.* 1998).

2.4.1.2. Bergapten

Bergapten je přírodní toxická látka, nacházející se v rostlinách rodu bolševník, zejména pak v bolševníku velkolepém (*Heracleum mantegazzianum*), který způsobuje těžké fotodermatitidy (Kavli a Volden, 1984). Bergapten je obsažen také v kůře citrusových plodů (pomeranče, limetky, mandarinky) a v kořenové zelenině (celer). V případě bergaptenu bylo potvrzeno, že má fotogenotoxické i fotokarcinogenní účinky (Averbeck *et al.* 1990). V řadě studií je publikováno, že po opakované topické aplikaci vyvolává u myši zvýšený výskyt karcinomů kůže (Young *et al.* 1990). Znepokojující skutečností je, že v aromaterapeutických přípravcích není obsah bergaptenu nijak omezen, a proto se objevují i případy závažného poškození kůže po použití sauny s aromaterapeutickou koupelí a následnou expozicí UV záření v soláriu (Kaddu *et al.* 2001).

2.4.1.3. Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou těkavé, organické látky rostlinného původu, které specificky ovlivňují jejich chuť a vůni. Nacházejí se v různých částech rostliny např. květech, listech či plodech, z kterých jsou získávány destilací (Tisserand a Balacs, 1995). Destilací dochází k zvýšení jejich koncentrace (až 100 krát), což může mít negativní dopad na lidský organismus při jejich používání.

Esenciální oleje jsou lidmi používány již po staletí pro jejich antimikrobiální, analgetické, protizánětlivé a sedativní účinky. Přírodní původ esenciálních olejů však nezaručuje jejich bezpečnost. Teprve v dnešní době dochází k odhalení mechanismů jejich účinku (Bakkali *et al.* 2008). Velká pozornost je věnována citrusovým esenciálním olejům, které mají výrazný fotosenzibilizační potenciál. Řada těchto olejů (bergamotový, citrónový nebo pomerančový) je součástí receptur kosmetických prostředků jako složky parfémových kompozic. Při topické aplikaci mohou vlivem slunečního záření vyvolat fototoxické reakce, které bývají spojené s přetrvávající hyperpigmentací (Ditrichová, 2008). Tento stav byl popsán již v roce 1916 a je znám jako *berloque dermatitis* neboli přívěšková dermatitida (Obr. 7). Typickým projevem tohoto onemocnění je vznik skvrn lokalizovaných především na krku, obličeji a pažích, které vznikají po aplikaci parfémů s obsahem bergamotového oleje a následné expozici slunečnímu záření (Zaynoun *et al.* 1981).



Obr. 7: Přívěšková dermatitida - Berloque dermatitis (www.dermatoweb.com).

2.4.1.4. Rostlinné extrakty s fototoxickými účinky

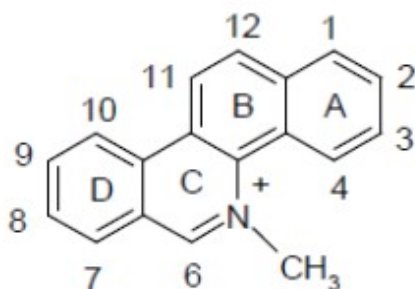
Řada extraktů z rostlin, které obsahují furokumariny, je v kosmetických prostředcích pro své toxické účinky již úplně zakázána např. pakmín větší (*Ammi majus*); u fíkovníku smokvoně (*Ficus carica*) a verbeny citrónové (*Lippia citriodora*) jsou zakázány jejich extrakty z listů jako součást parfémů. Nejnovější poznatky vedou také k otázce, zda rozšířená konzumace citrusových plodů a džusů nemá spojitost se zvýšeným výskytem karcinomu kůže v posledních 50 letech (Sayre a Dowdy, 2008).

2.5. Benzo[c]fenantridinové alkaloidy

Alkaloidy jsou zásadité, nízkomolekulární látky obsahující dusík, rostlinného původu, které jsou produkovány jako ochrana před patogeny a býložravci. Tato skupina látek má mnoho biologických účinků, jež jsou velmi ceněné i v medicíně např. morfin je využíván jako analgetikum (Vrublová, 2010).

Benzo[c]fenantridinové alkaloidy (BA) náleží do velké skupiny isochinolinových alkaloidů a dělí se do šesti skupin - hexahydrobenzofenantridiny, dihydrobenzofenantridiny, N-demethylbenzofenantridiny, kvartérní benzofenantridiny, dimerní dihydrobenzofenantridiny a sekobenzofenantridiny. Kvartérní BA jsou syntetizované převážně v rostlinách čeledi mákovité (*Papaveraceae*), routovité (*Rutaceae*) a zeměděymovité (*Fumariaceae*) (Šimánek, 1985). Mezi nejvíce studované rostliny produkující tyto alkaloidy patří okecek srdčitý (*Macleaya cordata*), krevnice kanadská (*Sanguinaria canadensis*), vlašovičník větší (*Chelidonium majus*) a *Dicranostigma lactucoides*. Základní strukturu kvartérních BA tvoří N-methylbenzo[c]fenantridinový kationt složený ze čtyř aromatických kruhů, které jsou v obrázku označeny písmeny A, B, C, D (Obr. 8). Dusíkový atom se v molekule nachází na pozici 5 a nese methylovou skupinu a kladný náboj. Iminová vazba mezi dusíkem N5 a uhlíkem C6 je pravděpodobně nejreaktivnějším místem v molekule, které často podléhá nukleofilnímu ataku, čímž dochází ke strukturním a fyzikálním změnám (Šimánek, 1985). Na základní strukturu jsou dále navázané hydroxylové, methoxylové a methylendioxylové skupiny, jejichž různou kombinací se od sebe jednotlivé kvartérní BA odlišují. Díky svým

biologickým účinkům patří k nejčastěji studovaným kvartérním BA sanguinarin a chelerythrin.



Obr. 8: *N*-Methylbenzo[*c*]fenanthridinový kation.

2.5.1. Sanguinarin

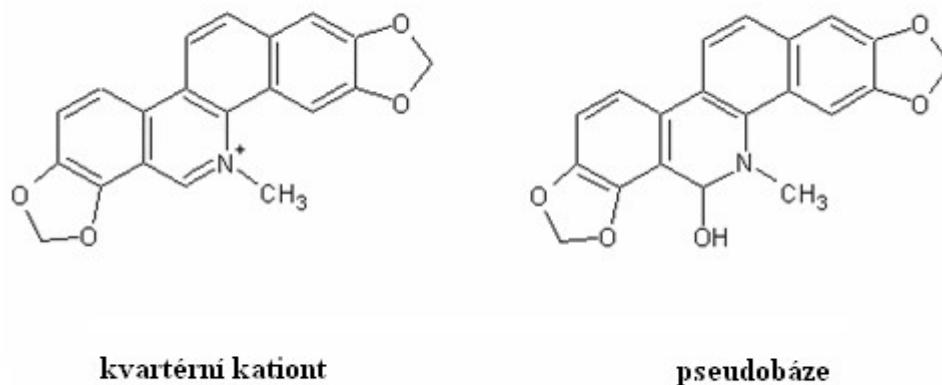
Sanguinarin (SA) je rostlinný alkaloid obsažený zejména v *Sanguinaria canadensis* (Obr. 9), *Macleaya cordata* a *Chelidonium majus*. SA je syntetizován rostlinami jako ochrana před působením vnějších škůdců a stresových faktorů. Pro své široké spektrum biologických aktivit a zajímavý farmakologický profil je SA stále předmětem zájmu vědeckých týmů.



Obr. 9: *Sanguinaria canadensis* (www.edgewoodgarden.com).

V roce 1827 byl SA objeven v rostlině *Sanguinaria canadensis*, avšak struktura byla objasněna až mnohem později (Dostál a Slavík, 2000). *Sanguinaria canadensis* (Obr. 9) je jedovatá rostlina z čeledi mákovité, původně pocházející z východní části Severní Ameriky. Ve své domovině byla často využívána v tradiční medicíně, ale dnes již patří k ohroženým druhům. Tato vytrvalá bylina s bílými květy roste převážně ve vlhkých lesích a křovinách, na březích vodních toků a v záplavových oblastech. Dorůstá do výšky 50 cm a po poranění uvolňuje červený latex, díky čemuž je lidově nazývána jako krevnice. U nás je SA obsažen zejména ve vlaštovičníku větším.

Alkaloid SA se nachází ve vodném prostředí současně ve dvou strukturních formách (Obr. 10), které se liší svými biologickými vlastnostmi. V kyselém prostředí se vyskytuje ve formě kvartérního kationtu SA, který je výrazně barevný a ve vodě rozpustný. V zásaditém prostředí přechází na neutrální formu tzv. pseudobázi, která je bezbarvá a ve vodě nerozpustná. Za fyziologického pH existuje rovnováha mezi oběma těmito formami (Dostál a Slavík, 2000).

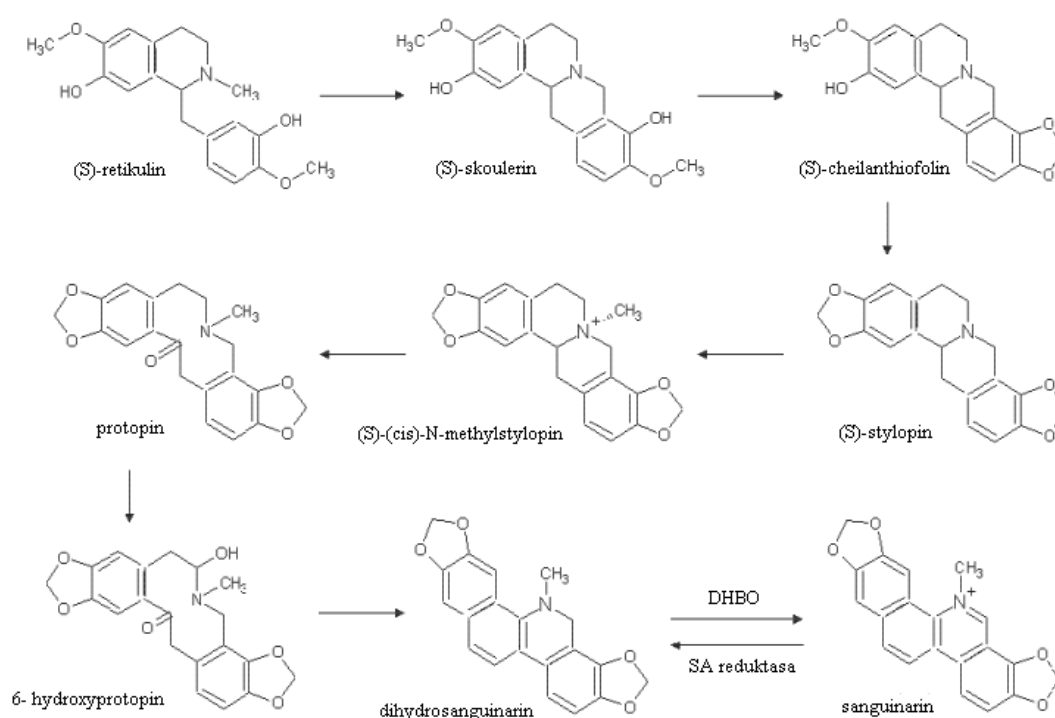


Obr. 10: Strukturní formy sanguinarinu.

2.5.1.1. Biosyntéza sanguinarinu

Biosyntéza SA vychází z aromatické aminokyseliny (L)-tyrosinu, který je přeměňován na (S)-norkoklaurin. Dalšími čtyřmi kroky je (S)-norkoklaurin převeden na (S)-retikulín, který je výchozí sloučeninou pro syntézu mnoha tříd

isochinolinových alkaloidů. Z (S)-retikulinu se vytváří (S)-skoulerin prostřednictvím enzymu (S)-retikulinoxidoreduktasy, která umožňuje vznik methylenového můstku. Následnou oxidací (S)-skoulerinu vzniká (S)-stylopin. Tato reakce je katalyzována dvěma specifickými cytochrom P450 oxidasami (S)-cheilanthifolinsynthasou a (S)-stylopinsynthasou. Na (S)-stylopin je v dalším kroku navázána methylenová skupina z S-adenosyl-L-methioninu, čímž vzniká (S)-cis-N-methylstylopin. Tato reakce je katalyzována enzymem N-methyltransferasou. Následným působením enzymu methyltetrahydroprotoberberin-14-monooxygenasy vzniká protopin, který je přeměňován protopin-6-monooxygenasou na nestabilní 6-hydroxyprotopin. Ten se spontánně přeměňuje na dihydrosanguinarin (DHSA). V posledním kroku je DHSA oxidován enzymem dihydrobenzofenanthridinoxidasou (DHBO) na SA (Kutchan, 1996). Biosyntéza SA je shrnuta v následujícím obrázku (Obr. 11).

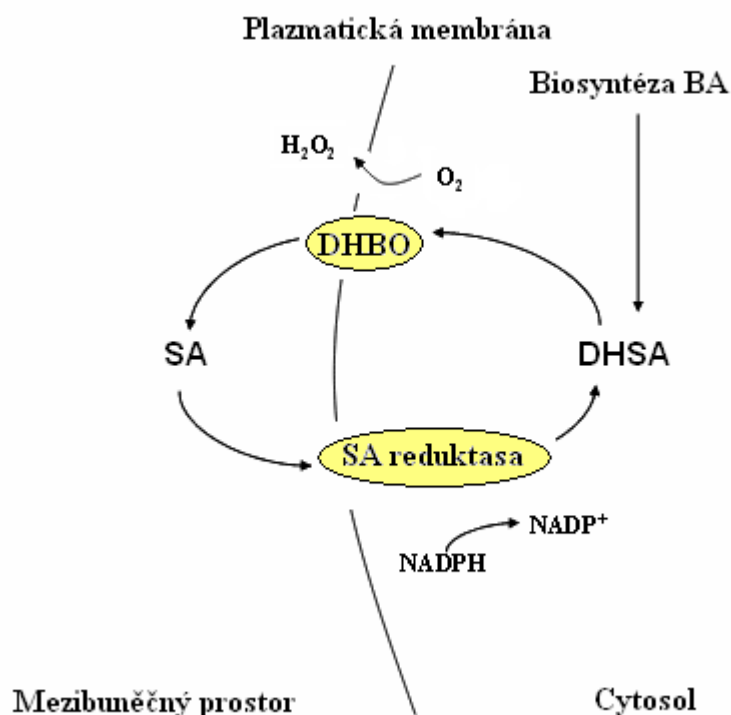


Obr. 11: Biosyntetická dráha vzniku sanguinarinu (upraveno dle Kutchan 1996).

Biosyntéza SA probíhá v cytosolu buněk celé rostliny a to až do vzniku netoxického DHSA. K přeměně DHSA na SA dochází pouze v přítomnosti elicitorů (Facchini *et al.* 1996), které se tvoří na základě biotického (patogenní organismy, herbivoři, parazitické rostliny) či abiotického stresu (mechanické poškození, nízká či

vysoká teplota, vodní deficit). Elicitory jsou látky stimulující obrannou reakci rostlin před lokálním poškozením patogenem (Blée, 1998). Jakmile je rostlinná buňka napadena patogenem, elicitory indukují expresi genů, které spouští syntézu obranných molekul tzv. fytoalexinů, jež znesnadňují pronikání patogenu do rostliny. Mezi účinné fytoalexiny patří i SA, a to především díky své silné antimikrobiální aktivitě, schopnosti interkalovat do DNA a schopnosti vázat se na proteiny, které obsahují SH-skupiny (Liu *et al.* 2009)

Poslední krok syntézy SA katalyzuje enzym DHBO, který působí na DHSA za současné redukce molekuly kyslíku na peroxid vodíku (Obr. 12), který je pro svou toxicitu vůči patogenům rovněž využit v obrané reakci rostlin (Neill *et al.* 2002). DHBO je indukován již zmíněnými elicitory. Vzniklý SA je rostlinnými buňkami vylučován do mezibuněčného prostoru, čímž se rostlina chrání před vlastním poškozením toxickým SA a zároveň je tímto způsobem chráněna před působením vnějších škůdců (Arakava *et al.* 1992).



Obr. 12: Schéma posledního kroku syntézy sanguinarinu a jeho zpětná konverze na dihydrosanguinarin (upraveno dle Weiss *et al.* 2006).

Zpětnou redukcí je většina SA převedena na DHSA (Obr. 12). Tato reakce je katalyzována cytoplazmatickým enzymem sanguinarinreduktasou (SA reduktasa), kdy donorem vodíku je NADPH. Reakce není vratná zvyšující se koncentrací produktu, a to ani při stonásobném přebytku NADP⁺. Dosud nebyly přesně objasněny mechanismy transportu BA přes buněčnou membránu (Weiss *et al.* 2006).

2.5.1.2. Biologické vlastnosti sanguinarinu

Rostliny obsahující SA měly dlouhou dobu významné postavení v tradiční medicíně, avšak i dnes jsou pro své široké spektrum biologických vlastností tohoto alkaloidu stále používány. K neznámějším vlastnostem SA patří jeho protizánětlivé, antimikrobiální, antimykotické, antiparazitické, antiplakové, a analgetické účinky (Dvořák *et al.* 2007).

Cytotoxické účinky SA jsou závislé na jeho koncentraci a době expozice. Rozdílné koncentrace SA navozují odlišné typy buněčné smrti (Ding *et al.* 2002). Nižší koncentrace SA vedou k apoptóze, což je nejběžnější typ programované buněčné smrti. Vyšší koncentrace SA způsobují onkózu, projevující se otokem a tvorbou puchýřů (Kopřiva, 2005).

Protinádorové účinky SA jsou připisovány jeho schopnosti interkalovat do DNA a ovlivnit dělení buňky. SA ovlivňuje aktivaci kaspasy-3 a může tak v buňkách nádoru vyvolat apoptotické děje (Mackraj, 2008). Dihydroderivát tohoto alkaloidu je na rozdíl od své oxidované formy jen málo biologicky účinný (Janovska *et al.* 2010). Bylo prokázáno, že SA rovněž potlačuje angiogenezi (Eun *et al.* 2004) a u myši inhibuje gen survivin, čímž potlačuje růst buněk nádoru prostaty (Sun *et al.* 2010).

Protizánětlivý účinek SA je založen na jeho schopnosti inhibovat aktivaci jaderného transkripčního faktoru κ B, který se za normálních okolností v buňce podílí na řízení genů zapojených do zánětlivé reakce. Tato aktivace je nejčastěji vyvolána tumor nekrotizujícím faktorem α (Duvoix *et al.* 2004), ale také interleukinem-1 či kyselinou okadaovou (Chaturvedi *et al.* 1997).

Toxický potenciál SA vyvolává v organismu dva druhy poškození. SA interkaluje do DNA a způsobuje inhibici transkripce a replikace DNA (Bajaj *et al.* 1990). Ovlivňuje také funkci řady SH-enzymů, příkladem může být inhibice Na⁺/K⁺ ATPasy. DHSA funkci enzymů s SH-skupinami neovlivňuje (Janovska *et al.* 2010).

Jednou z vlastností, která byla prokázána u SA i DHSA, je antimikrobiální a

antimykotická aktivita. U SA byly zjištěny bakteriostatické i baktericidní účinky vůči bakteriím, kvasinkám i plísním (Zdařilová *et al.* 2006). Antibakteriální aktivita DHSA byla zjištěna vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a houbě *Candida albicans* (Navarro *et al.* 1999).

2.5.1.3. Praktické využití sanguinarinu

Sanguinarin je, díky svým účinkům, součástí mnoha komerčně dostupných přípravků. Asi nejznámějším výrobkem obsahujícím SA je „černá mast“ (Black salve, tzv. rakovinová mast). Základní složkou této masti je vedle *Sanguinaria canadensis* i chlorid zinečnatý. Tyto látky mají deskvamační účinek a vyvolávají nekrózu tkáně. Přestože má černá mast ohromné využití a účinně působí na rakovinové buňky, je prokázáno, že způsobuje i poškození nedotčené zdravé tkáně (Saltzberg *et al.* 2009). SA je rovněž aktivní složkou výrobku Di-Sancor, který se používá k léčbě virových onemocnění jako je například chřipka či hepatitida. Další uplatnění našel SA jako komponenta v přípravku ústní hygieny řady Santoin, která je doporučována pacientům s paradontózou (Walterova *et al.* 1995). SA se rovněž používá také v živočišné výrobě jako aditivum do krmiv, které je na trhu nabízené pod obchodním názvem jako Sangrovit. Tento přípravek podporuje růst zvířat a nahrazuje používání antibiotik (Psotová *et al.* 2006). Extrakt z rostliny *Macleaya cordata*, známý jako Sanguiritrin, má široké spektrum účinků. Působí proti bakteriím, patogenním houbám i parazitickým prvokům (Vichkanova *et al.* 1982). Sanguiritrin je přidáván do krémů používaných k léčbě infekčních zánětů kůže, hnisajících ran, vředů a dermatomykóz (Semkina *et al.* 2005).

3. CÍLE PRÁCE

1. Posouzení fototoxických účinků sanguinarinu a dihydrosanguinarinu na primárních kulturách lidských kožních fibroblastů ozářených netoxickou dávkou UVA záření.
2. Studium vlivu sanguinarinu a dihydrosanguinarinu v kombinaci s netoxickou dávkou UVA záření na aktivitu kaspasy-3.
3. Sledování účinku sanguinarinu a dihydrosanguinarinu v kombinaci s netoxickou dávkou UVA záření na hladinu glutathionu.
4. Ovlivnění dějů vyvolaných sanguinarinem a dihydrosanguinarinem v kombinaci s netoxickou dávkou UVA záření v kožních fibroblastech nízkomolekulárními antioxidanty.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Biologický materiál

4.1.1. Kůže

Kůže byla získána od dobrovolných dárců, kteří podstoupili chirurgickou operaci na Oddělení plastické a estetické chirurgie Fakultní nemocnice v Olomouci. Dárci podepsali informovaný souhlas a odběr kůže byl proveden s povolením Etické komise FN Olomouc v souladu s českou legislativou. Kůže byla získána od žen z oblasti prsou a břicha. Po operaci byla kůže vložena do transportního roztoku obsahujícího antibiotika a následně využita pro izolaci fibroblastů.

4.1.2. Buňky

Pro pokusy uvedené v této diplomové práci byly použity primární kultury lidských kožních fibroblastů. Tyto kožní buňky byly izolovány z nadbytečné kůže (Kultivace lidských fibroblastů 4.4.1.).

4.1.3. Alkaloidy

Alkaloid SA byl izolován z nadzemní části rostliny *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. (okecek srdčitý). DHSA byl připraven redukcí SA pomocí NaBH_4 v methanolu a separován pomocí flash chromatografie na koloně se silikagelovou stacionární fází. Byl připraven v 99% čistotě a k eluci DHSA byl použit chloroform (Vičar *et al.* 2010).

4.2. Chemikálie a roztoky

4.2.1. Chemikálie

Adenin, amfotericin B, Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,01%), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), dihydrogenfosforečnan sodný

(NaH_2PO_4), dimethylsulfoxid (DMSO), 2,2'-dinitro-5,5'-dithiobenzoová kyselina (DTNB), disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), disodná sůl redukovaného β -nikotinamidadenindinukleotidu (NADH), dithiotreitol (DTT), dodekahydrát fosforečnanu disodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$), ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), fetální bovinní sérum (FBS), Folin-Ciocalteu Phenol reagens, formaldehyd, hovězí sérový albumin (BSA), hydrokortison, hydroxid sodný (NaOH), [4-(2-hydroxyethyl)-piperazin]-ethan sulfonová kyselina (HEPES), chlorid draselný (KCl), chlorid sodný (NaCl), chlorid vápenatý (CaCl_2), insulin, kyselina fosforečná (H_3PO_4), kyselina chloristá (HClO_4), kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina octová (CH_3COOH), methanol (CH_3OH), N-acetylcystein (NAC), neutrální červeň, penicilin, pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$), pyruvát sodný, streptomycin, 3,3',5-trijod-L-tyronin, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Triton X-100, uhličitan sodný (Na_2CO_3), trypanová modř, trypsin a vinan sodnodraselný byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bylo zakoupeno od firmy Invitrogen/Gibco. Inhibitor proteas Complete™ byl zakoupen od firmy Roche Diagnostic GmbH (Německo). Substrát acetyl-Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) a inhibitor acetyl-Asp-Glu-Val-Asp aldehyd (Ac-DEVD-CHO) pro fluorescenční stanovení kaspasy-3 byly zakoupeny od firmy Bachem (Švýcarsko).

4.2.2. Roztoky

Fosfátový pufr (PBS):

Zásobní roztok PBS: NaCl (137 mmol/l), KCl (2,68 mmol/l), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ (90 mmol/l), KH_2PO_4 (15 mmol/l), pH = 7,4, před použitím byl zásobní roztok 10x naředěn deionizovanou vodou.

Roztok pro měření aktivity LDH v médiu:

Hydrogenfosforečnan sodný (50 mmol/l), pyruvát sodný (1,22 mmol/l), NADH (0,4 mmol/l), pH = 7,5.

Roztoky pro kultivaci fibroblastů:

Médium se sérem: DMEM, fetální bovinní sérum (FBS, 10 %), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml).

Médium bez séra: DMEM, penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml).

Roztok trypsinu: PBS, trypsin (0,25 % v/v).

Roztok pro transport kůže:

PBS, amphotericin B (1,25 µg/ml), penicilin (500 U/ml), streptomycin (500 mg/ml).

Roztok pro kultivaci kůže:

Směsi médií (DMEM a Ham F12, 1:3) obohacené o fetální hovězí sérum (FBS, 10%), penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 U/ml), amphotericin B (0,125 mg/ml), hydrokortison (0,8 µg/ml), adenin (24 µg/ml), insulin (0,12 U/ml), epidermální růstový faktor (1 ng/ml) 3,3',5-trijod-L-tyronin (0,136 µg/ml).

Roztoky pro měření životnosti buněk pomocí neutrální červeně:

Extrakční roztok: CH₃COOH (1 % v/v) v methanolu.

Roztok k fixaci buněk: CaCl₂ (0,5 % v/v), formaldehyd (0,25 % v/v).

Roztok neutrální červeně: neutrální červeně (0,1 % v/v) v CH₃COOH, před použitím roztok naředěn PBS 1:10.

Roztoky pro stanovení aktivity kaspasy-3:

Lyzační pufr: HEPES (50 mM), pH 7,4, Triton X-100 (0,5 % v/v), inhibitor proteas Complete™ (1 tableta v 50 ml), 5 mM DTT.

Reakční pufr: HEPES (20 mM), pH 7,1, EDTA (2 mM), inhibitor proteas Complete™ (1 tableta v 50 ml), 5 mM DTT.

Zásobní roztok substrátu pro kaspasu-3: Ac-DEVD-AMC v DMSO (10 mM).

Zásobní roztok inhibitoru pro kaspasu-3: Ac-DEVD-CHO v DMSO (2 mM).

Reakční směs se substrátem: reakční pufr se substrátem Ac-DEVD-AMC (0,05 mmol·l⁻¹).

Reakční směs se substrátem a inhibitorem: reakčního pufr se substrátem Ac-DEVD-AMC (0,05 mmol·l⁻¹), inhibitor Ac-DEVD-CHO (0,001 mmol·l⁻¹).

Roztoky pro stanovení bílkovin metodou Bradfordové:

Roztok Coomassie Brilliant Blue G-250: 100 mg Coomasie Brilliant Blue G-250 rozpuštěno v 50 ml 95% ethanolu, přidáno 100 ml 85% kyseliny fosforečné a doplněno vodou do 1000 ml.

Roztoky pro stanovení bílkovin metodou podle Lowryho:

Biuretovo činidlo: 0,5% CuSO₄ · 5 H₂O, 1% vinan sodnodraselný. Před použitím roztok smíchan s 2% Na₂CO₃ v 0,1 N NaOH v poměru 1:50.

Folin-Ciocalteuovo činidlo: Folin-Ciocalteu Phenol reagens před použitím naředěno vodou 1:1.

Roztoky pro stanovení hladiny redukováného glutathionu:

GSH pufr: TRIS/HCl (0,8 M), EDTANa₂ (20 mM), pH 8,9.

Reakční směs: DTNB (0,01 M) v GSH puftru.

Roztok 10% HClO₄: 14,28 ml 70% HClO₄ doplněno deionizovanou vodou do 100 ml, před použitím roztok naředěn na 1%.

4.3. Laboratorní přístroje a ostatní materiál

4.3.1. Laboratorní přístroje

Chlazená centrifuga *Mikro 22R* (Hettlich Zentrifugen, Německo)

Elektromagnetická míchačka *RH BASIC KT/C* (IKA[®] - Werke, Německo)

Fotometr pro měření absorbance *Infinite M200 Pro* (Tecan, Rakousko)

Homogenizátor *Ultra Turax T25 Basic* (Ika[®] - Werke, Německo)

Inkubátor *MCO – 17AIC* (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

Laminární box *CLF* (Schoeller Instruments, ČR)

Mikroskop (Olympus, USA)

pH metr *inoLab Level 1* (Schoeller Instruments, ČR) s elektrodou *Sen Tix41* (WTW, Německo)

Sonikátor *UP 200 s* (Dr. Hielscher, Německo)

Solární simulátor *SOL-500* (Dr. Hönle UV technology, Německo)

Termomixer *Comfort* (Eppendorf, Německo)

Ultrazvuková termostatová vodní lázeň *UCC4* (Powersonic, Slovensko)

UVA-metr (Dr. Hönle UV technology, Německo)

Váhy *AX105 DeltaRange* (Mettler Toledo, Švýcarsko)

4.3.2. Ostatní materiál

Chladící destičky

Plastové injekční stříkačky

Plastové mikrozskumavky (0,5; 1,5; 2 ml)

Sterilní filtry

Sterilní kultivační 6, 48, 96 - jamkové desky

Sterilní kultivační lahve (75 cm²)

Sterilní Petriho misky

Sterilní plastové zkumavky (10 ml)

4.4. Použité metody

4.4.1. Kultivace lidských fibroblastů

Kožní tkáň určená pro experimentální účely byla nejprve očištěna od tuku a opláchnuta sterilním roztokem PBS a následně rozřezána na kousky o velikosti asi 1 cm². Tři-čtyři kousky kůže byly položeny na dno Petriho misek a zality kultivačním médiem tak, aby nebyly převrstveny. Připravené Petriho misky byly uloženy do inkubátoru při teplotě 37 °C a atmosféře obsahující 5% CO₂. Médium bylo vyměňováno podle potřeby, obvykle po 2 až 3 dnech. Po pokrytí dna Petriho misek fibroblasty byly kousky kožní tkáně odstraněny a přeneseny na dno nové Petriho misky, kde byl celý postup opakován. Kultivační médium bylo odsáto a vytvořená vrstva buněk byla opláchnuta PBS. Buňky byly následně uvolněny trypsinem. K buňkám bylo přidáno kultivační médium se sérem, následovala centrifugace při 328 × g po dobu 10 minut a vytvořený pelet byl rozsuspendován ve 20 ml kultivačního média se sérem. Vzniklá směs byla přenesena do kultivační lahve s plochou 75 cm² a umístěna do inkubátoru při teplotě 37 °C.

4.4.2. Příprava fibroblastů pro experimenty

Pro další experimenty bylo nutno buňky rozkultivovat a rozdělit do více lahví. Podle potřeby byla provedena výměna média, obvykle 1-2 týdně. Jakmile bylo dno kultivační lahve pokryto monovrstvou buněk, byla provedena pasáž. Buňky byly opláchnuty PBS a k jejich uvolnění byl přidán 1 ml trypsinu. Buňky byly vloženy do inkubátoru. Po 10 minutách bylo zkontrolováno uvolnění buněk, případně byla doba inkubace prodloužena. Následně bylo k buňkám aplikováno 10 ml kultivačního média se sérem, aby došlo k deaktivaci trypsinu. Vzniklá směs byla přenesena do plastové zkumavky k centrifugaci při 328 × g po dobu 10 minut. Médium bylo odstraněno a buňky resuspendovány v 10 ml kultivačního média se sérem. K stanovení počtu buněk byla použita Bürkerova komůrka. Suspenze buněk (10 μl) byla smíchána s roztokem trypanové modři (10 μl) a napipetována pod sklíčko Bürkerovy komůrky. Následně bylo sklíčko vloženo do mikroskopu a spočítáno bylo 6 čtverců ohraničených třemi čarami. Vypočítán byl průměrný počet buněk v jednom čtverci. Po vypočítání počtu buněk byla jejich suspenze naředěna kultivačním

médiem se sérem tak, aby po vysetí na příslušnou kultivační desku byla jejich koncentrace $1 \cdot 10^5$ buněk/cm². Níže uvedená tabulka (Tab.1) uvádí potřebné objemy a koncentrace buněčné suspenze aplikované pro dosažení koncentrace 10^5 buněk/cm² na jednotlivých kultivačních deskách. Po vysetí buněk následovala inkubace v inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Tab.1: Objemy a koncentrace buněk pro jednotlivé kultivační desky.

Typ desky	Koncentrace buněk/cm ²	Objem suspenze (ml)	Koncentrace buněk/ml
6-jamek	$1 \cdot 10^5$	1,5	$6,3 \cdot 10^5$
48-jamek	$1 \cdot 10^5$	0,25	$3,8 \cdot 10^5$
96-jamek	$1 \cdot 10^5$	0,2	$1,6 \cdot 10^5$

4.4.3. Aplikace alkaloidů na buňky

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky studovaných alkaloidů (SA: 1,005 mM, DHSA: 10,05 mM v DMSO), které byly ředěny geometrickou řadou přidávkem DMSO na koncentrace v rozmezí 0,0039 - 1,005 mM pro SA a 0,039 - 10,05 mM pro DHSA. Použité koncentrační rozsahy obou alkaloidů vycházely z diplomové práce Novotné (Novotná, 2013). Připravené roztoky v DMSO byly smíchány s médiem v poměru 1 : 200 ve sterilních plastových zkumavkách. Pokud byl testován vliv nízkomolekulárních antioxidantů na studované parametry, byl do média přidán N-acetylcystein (NAC) v koncentraci 5 mmol/l nebo dithiotreitol (DTT) v koncentraci 0,1 mmol/l. Z kultivačních desek, jejichž dna byla pokryta narostlými buňkami, bylo odstraněno kultivační médium se sérem a nahrazeno médiem bez séra s testovanými látkami o požadovaných koncentracích SA a DHSA (výsledné koncentrace SA se pohybovaly v rozmezí 0,0195 - 5 μ M a DHSA v rozmezí 0,195 - 50 μ M), případně byly alkaloidy naředěny v médiu bez séra s nízkomolekulárními antioxidanty. Kontrola obsahovala stejný alikvot DMSO. Následovala hodinová inkubace buněk s alkaloidy v inkubátoru při teplotě 37 °C.

4.4.4. Ozáření buněk

Inkubace buněk s alkaloidy byla po hodině ukončena a médium bylo

odstraněno. Buňky byly 3 krát opláchnuty PBS. Následně byl na buňky aplikován roztok PBS s glukosou (1 mg/ml). Použitím solárního simulátoru SOL-500 byly buňky ozářeny dávkou UVA záření o hodnotě 2,5 J/cm². Doba ozáření závisela na intenzitě záření a byla vypočítána podle vzorce (1). Doba ozáření buněk UVA složkou záření při průměrné intenzitě 4,6 J/cm² byla 9 minut 12 sekund. Desky s buňkami byly během ozařování chlazeny, aby se zabránilo přehřátí buněk.

$$\text{Doba ozáření (min.)} = \frac{\text{dávka (J/cm}^2\text{)} * 1000}{\text{naměřená intenzita (J/cm}^2\text{)} * 60} \quad (1)$$

Současně byl prováděn experiment s buňkami, které nebyly ozařovány UVA zářením. V době ozařování byly buňky inkubovány v PBS a uloženy na stejnou dobu do inkubátoru při 37 °C. Další postup byl již shodný pro buňky neozářené i ozářené. Roztok PBS byl odstraněn a buňky byly inkubovány v médiu bez séra po dobu 4 hodin. Následně bylo médium využito pro stanovení aktivity laktátdehydrogenasy (LDH) a na buňkách bylo provedeno měření příslušných parametrů (životnost buněk pomocí testu s neutrální červení, stanovení aktivity kaspasy-3, stanovení hladiny redukovaného glutathionu).

4.4.5. Metody stanovení cytotoxicity alkaloidů

Inkubace buněk byla ukončena po 4 hodinách. Kultivační médium bylo odebráno a použito pro měření cytotoxicity alkaloidů stanovením aktivity LDH v médiu. Životnost buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Cytotoxicitu SA a DHSa bylo nutno stanovit pro další experimenty.

4.4.5.1. Stanovení aktivity LDH v médiu

LDH je buněčný enzym, vyskytující se v cytoplazmě všech buněk. Při poškození buňky dojde ke změnám v její cytoplazmatické membráně a tento enzym je uvolněn z buňky ven. Stanovení aktivity LDH v médiu je tedy jednoduchou, rychlou a levnou metodou, jíž lze měřit cytotoxicitu buněk inkubovaných s toxickými látkami (Novotná, 2013).

Do 96-jamkové desky bylo aplikováno po 100 μ l vzorku média. Každý vzorek byl pipetován třikrát. Pro měření aktivita LDH bylo přidáno po 150 μ l pufru s NADH. Změna absorbance byla měřena při 340 nm po dobu 1 minuty.

4.4.5.2 Stanovení životnosti buněk pomocí neutrální červeně

Podstatou stanovení životnosti buněk pomocí testu s neutrální červení je schopnost živých buněk absorbovat barvivo neutrální červeně do svých lysozomů. Mrtvé a poškozené buňky mají tuto schopnost značně sníženou, a proto je množství inkorporovaného barviva přímo úměrné počtu živých buněk v buněčné kultuře.

Před použitím byl roztok 0,1% neutrální červeně naředěn PBS v poměru 1:10. Po odstranění média bylo na buňky aplikováno 40 μ l naředěného roztoku neutrální červeně. Buňky byly inkubovány 1 hodinu v inkubátoru při 37 °C. Po skončení této inkubační doby bylo barvivo odstraněno a buňky omyty 200 μ l roztoku pro fixaci. Následně byl fixační roztok odsát a na buňky bylo aplikováno po 200 μ l extrakčního roztoku. Po 20 minutovém třepání byla změřena absorbance při 540 nm a životnost buněk byla vypočítána podle vzorce (2). Stanovena byla také hodnota IC₅₀, odpovídající koncentraci testované látky, při které přežívá 50 % buněk.

$$\text{Životnost (\%)} = \frac{A_v}{A_s} * 100 \quad (2)$$

A_v...absorbance vzorku

A_s...absorbance kontroly

4.4.6. Stanovení aktivity kaspasy-3

Proteolytický enzym kaspasa se účastní procesu apoptózy, tedy programované buněčné smrti. V buňkách se tento enzym vyskytuje jako inaktivní prekursor zvaný prokaspasa. Principem stanovení aktivity tohoto enzymu je schopnost aktivní kaspasy štěpit fluorochromy, kterými je značen peptid (Asp-Glu-Val-Asp, DEVD). Množství odštěpeného fluorochromu je měřeno fluorescenčně (Ochu *et al.* 1998).

Po experimentu byly buňky seškrabány z 6 – jamkové kultivační desky do PBS a následně centrifugovány při 490 \times g a 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant byl

odsát a sediment rozpuštěn v lyzačním roztoku. Následná inkubace probíhala na ledu po dobu 10 minut za občasného protřepání. Po skončení inkubační doby byly vzorky opět centrifugovány při $20\,780 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Buněčný lyzát byl přenesen do čistých plastových mikrozkuvek a použit pro stanovení aktivity kaspasy-3 a později také k stanovení proteinů Bradfordovým činidlem.

Samotné měření aktivity enzymu bylo provedeno následujícím způsobem. Na 96-jamkovou desku bylo aplikováno po $8\ \mu\text{l}$ buněčného lyzátu a $80\ \mu\text{l}$ reakční směsi se substrátem. Každý vzorek byl aplikován ve dvou opakování. Současně bylo na tutéž 96-jamkovou desku nanášeno po $8\ \mu\text{l}$ buněčného lyzátu a $80\ \mu\text{l}$ reakční směsi se substrátem a inhibítorem, rovněž ve dvou opakování. Následná inkubace probíhala při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny ve tmě. Po skončení inkubační doby byla změřena fluorescence (excitace při $380\ \text{nm}$ a emise při $450\ \text{nm}$). Aktivita kaspasy-3 byla vyhodnocena podle následujícího vztahu (3).

$$\text{Aktivita kaspasy-3 (FU}\cdot\text{g}^{-2}) = \left(\frac{F_{v+s} - F_{v+i}}{F_{k+s} - F_{k+i}} / c \right) * 100 \quad (3)$$

F_{v+s} ...fluorescence vzorku se substrátem

F_{v+i} ...fluorescence vzorku se substrátem a inhibítorem

F_{k+s} ...fluorescence kontroly se substrátem (buňky inkubované s DMSO)

F_{k+i} ...fluorescence kontroly se substrátem a inhibítorem (buňky inkubované s DMSO)

ckoncentrace proteinu ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

4.4.7. Stanovení hladiny redukováného glutathionu (GSH)

Glutathion je intracelulární peptid se silně tlumícími účinky volných radikálů a bývá využíván jako marker oxidačního stresu. Za fyziologického stavu je intracelulárně lokalizováno více než 99 % obsahu GSH v redukované formě. Při zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů nebo zátěži organismu toxickými látkami dochází k poklesu množství GSH v buňkách. Množství GSH je stanoveno jeho reakcí s DTNB v alkalickém prostředí, za vzniku žlutého 5-thio-2-nitrobenzoátu, jehož absorbance je měřena při $412\ \text{nm}$ (Carlberg *et al.* 1985).

Po experimentu byly buňky 2krát opláchnuty ledovým PBS a následně

seškrabány do 0,4 ml ledové 1% HClO₄. Pokud nebyly vzorky okamžitě zpracovány, byly zamrazeny na -80 °C. Buněčný lyzát byl sonifikován 10 impulsy na ledu a následně centrifugován při 12 290 × g a 4 °C. Vzniklý supernatant byl použit pro stanovení GSH a stanovení bílkovin metodou dle Lowryho.

Na 96-jamkovou desku bylo nanášeno 50 µl supernatantu a to ve třech opakování pro každý vzorek. Pro slepý vzorek bylo použito stejné množství 1% HClO₄. Následně bylo ke všem vzorkům aplikováno 200 µl pufru. Nakonec bylo nanášeno 10 µl roztoku DTNB ve dvou opakováních a 1krát bylo aplikováno 10 µl pufru (vlastní kontrola). Absorbance byla změřena po 4 minutách při 412 nm. Množství redukovaného glutathionu bylo vypočítáno podle následujícího vzorce (4).

$$\text{Hladina GSH (mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} = \frac{(Aa - Ab)}{\epsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění} \quad (4)$$

Aa...absorbance vzorku

Ab...absorbance slepého vzorku

ε...molární absorpční koeficient (mol⁻¹·l·cm⁻¹)

L...délka optické dráhy (cm)

c....koncentrace proteinu (g·l⁻¹)

4.4.8. Stanovení bílkovin

4.4.8.1. Stanovení bílkovin metodou Bradfordové

Metoda stanovení bílkovin podle Bradfordové je založena na kolorimetrické reakci, která proběhne po smíchání Bradfordova činidla s roztokem obsahujícím proteiny. Bradfordovo činidlo obsahuje barvivo Coomassie Brilliant blue G-250, které se váže na bazické a aromatické aminokyselinové zbytky v proteinech. Po vazbě barviva na proteiny dochází k barevné změně, která je úměrná množství proteinu (Frébort *et al.* 1992).

Pro stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové byly buněčné lyzáty nejprve 11krát zředěny pomocí PBS. Na 96-jamkovou desku bylo aplikováno 10 µl biologického materiálu nebo standardu a to ve dvou opakováních. Přidáno bylo 200 µl barviva Coomassie Brilliant Blue G-250. Po promíchání byla změřena

absorbance při 595 nm. Pro vyhodnocení byla připravena kalibrační křivka závislosti absorbance na vzrůstající koncentraci sérového hovězího albuminu (do 0,2 mg/ml). Závislost není lineární při vyšších koncentracích bílkovin. Kalibrační závislost byla provedena při měření každé sady vzorků.

4.4.8.2. Stanovení bílkovin metodou dle Lowryho

Stanovení proteinů metodou podle Lowryho je založeno na použití dvousložkového činidla. První složkou je biuretové činidlo, vhodné pro stanovení vyšších koncentrací proteinů. Druhou složkou je Folin-Ciocalteuovo činidlo na fenoly. Jedná se o polykyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky v proteinu za vzniku modrého zbarvení. Stanovení je tedy kolorimetrické s absorpčním maximem redukovaného činidla při 750 nm. Kombinace obou činidel v postupu podle Lowryho umožňuje pokrýt oblast nízkých koncentrací proteinů (Frébort *et al.* 1992).

Na 96-jamkovou desku bylo nanášeno 20 μ l třikrát pro každý vzorek nebo standard. Biuretovo činidlo bylo v objemu 100 μ l aplikováno ke všem vzorkům. Po dobu 10 minut byly vzorky inkubovány při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 10 μ l Folin-Ciocalteuova činidla, které bylo před použitím ředěno vodou v poměru 1:1. Vzorky byly umístěny na 30 minut do tmy při pokojové teplotě. Po skončení inkubační doby byla změřena absorbance při 680 nm.

4.4.9. Statistická analýza

Všechny experimenty byly provedeny nejméně v tripletech ve třech nezávislých opakováních. Výsledky byly vyhodnoceny v programu MS Excel 2007 a jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí Studentova t-testu.

5. VÝSLEDKY

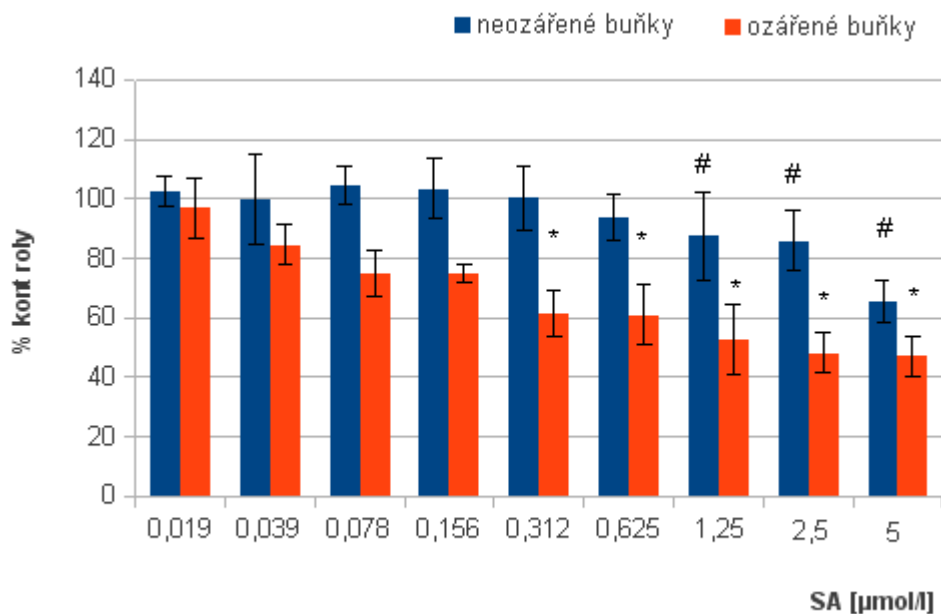
5.1. Toxicita a fototoxicita SA a DHSA na kožních fibroblastech měřená inkorporací neutrální červeně

Měřením inkorporace neutrální červeně je možné sledovat míru poškození buněk. Barvivo neutrální červeně je absorbováno pouze do lysozomů živých buněk, zatímco mrtvé a poškozené buňky mají tuto schopnost značně sníženou.

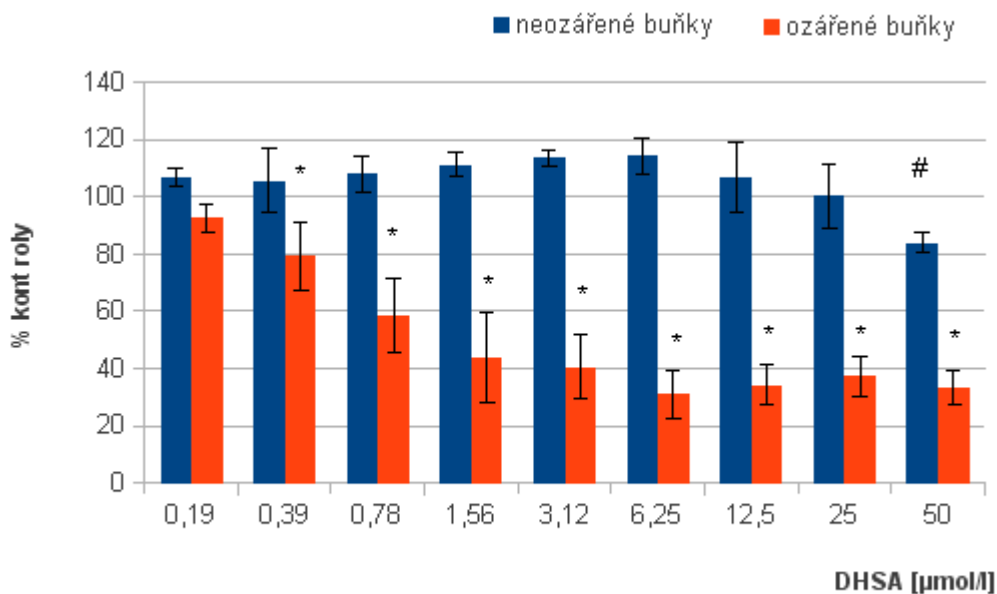
Po hodinové inkubaci lidských kožních fibroblastů se SA (0-5 $\mu\text{mol/l}$) či DHSA (0-50 $\mu\text{mol/l}$) byla jedna sada buněk ozářena netoxickými dávkami UVA záření (2,5 J/cm^2) a po 4 hodinové inkubaci při 37 °C byla sledována viabilita buněk měřením inkorporace neutrální červeně do buněk. Neozářené i ozářené buňky bez studovaných alkaloidů byly použity jako kontroly životnosti buněk a netoxické dávky příslušného UV záření. Byla pozorována toxicita alkaloidů.

Vlivem UVA záření došlo k prohloubení toxicity SA (Obr. 13). Hodnotu IC_{50} samotného SA nebylo možné zjistit ($> 5 \mu\text{mol/l}$), působením UVA záření o dávce 2,5 J/cm^2 hodnota IC_{50} klesla na 1,4 $\mu\text{mol/l}$, dochází tedy minimálně k 3,5x vyššímu nárůstu toxicity. Jelikož nebylo možné přesně stanovit IC_{50} samotného SA, byla stanovena IC_{75} , která měla hodnotu 3,52 $\mu\text{mol/l}$. Působením UVA záření o dávce 2,5 J/cm^2 hodnota IC_{75} klesla na 0,078 $\mu\text{mol/l}$. Dochází tedy k 45x vyššímu nárůstu toxicity.

Mírný toxický účinek DHSA byl zaznamenán až při dávce 50 $\mu\text{mol/l}$. Působením UVA záření došlo k výraznému nárůstu toxicity DHSA (Obr. 14). Hodnotu IC_{50} a IC_{75} samotného DHSA nebylo možné stanovit ($> 50 \mu\text{mol/l}$). Působením UVA záření o dávce 2,5 J/cm^2 klesla hodnota IC_{50} na 1,42 $\mu\text{mol/l}$ a dochází tedy k 35x vyššímu nárůstu toxicity DHSA. Hodnota IC_{75} klesla na 0,43 $\mu\text{mol/l}$ a toxicita DHSA se působením UVA záření zvýšila 115x. DHSA je tedy možné považovat za látku s fototoxickým účinkem.



Obr. 13: Poškození fibroblastů působením SA a v kombinaci s UVA zářením o dávce 2,5 J/cm² sledované inkorporací neutrální červeně. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. * Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly (p < 0,05). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly (p < 0,05).



Obr. 14: Poškození fibroblastů působením DHSA a v kombinaci s UVA zářením o dávce 2,5 J/cm² sledované inkorporací neutrální červeně. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. * Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly (p < 0,05). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly (p < 0,05).

5.2. Vliv nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu alkaloidů SA a DHSA studovaný na kožních fibroblastech

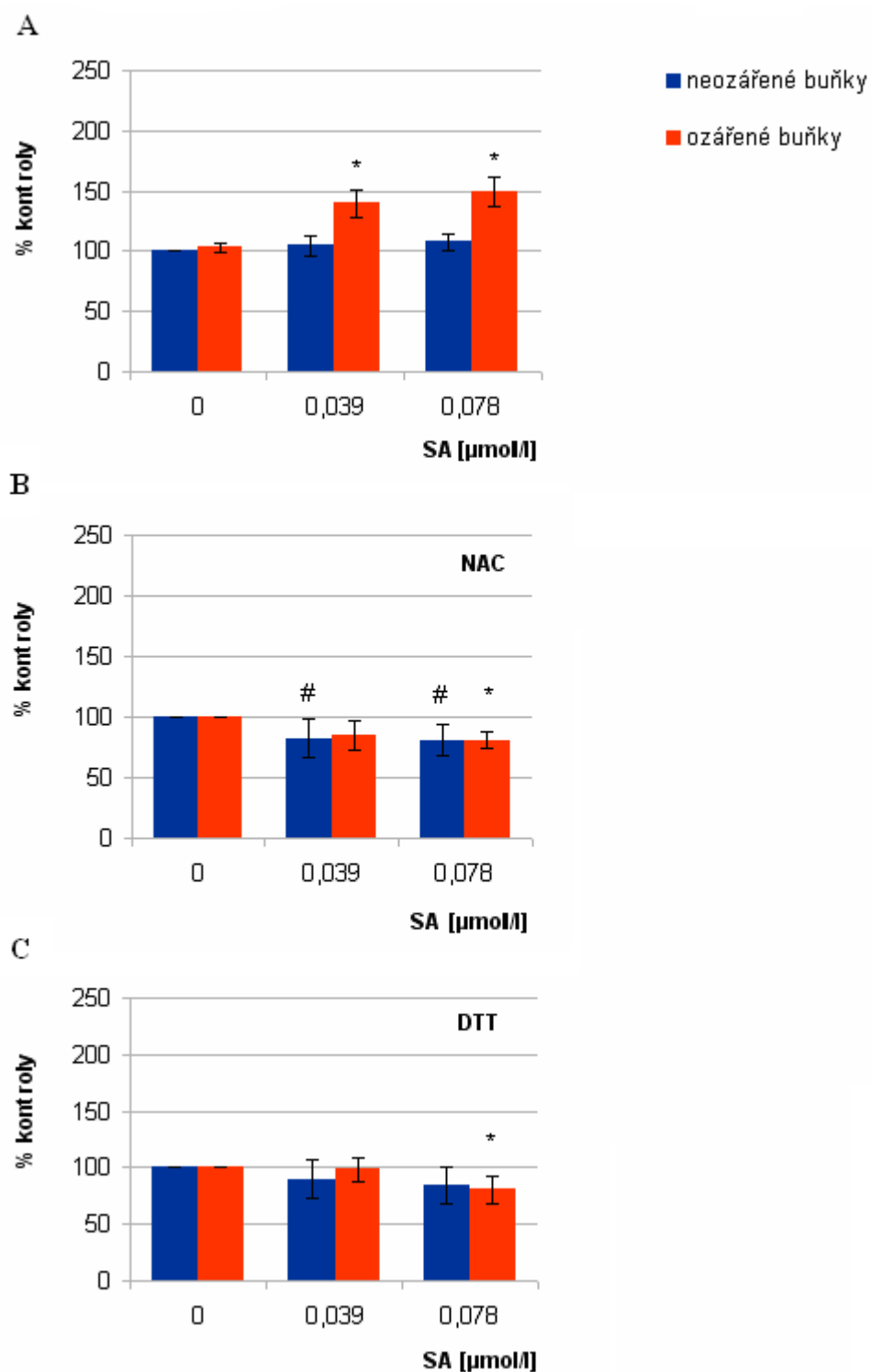
Na základě experimentů byly vybrány dvě koncentrace SA a DHSA pro studium vlivu nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu těchto alkaloidů. Testovány byly dva nízkomolekulární antioxidanty N-acetylcystein (NAC) v koncentraci 5 mmol/l a dithiotreitol (DTT) v koncentraci 0,1 mmol/l. Ovlivnění toxicity a fototoxicity SA a DHSA těmito nízkomolekulárními antioxidanty bylo měřeno změnou aktivity LDH v médiu, aktivity kaspasy-3 a hladiny redukovaného glutathionu.

5.2.1. Vliv nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu alkaloidů sledovaný změnou aktivity LDH v médiu

V přítomnosti některých látek s toxickým účinkem dochází k narušení buněčných membrán a uvolnění vnitrobuněčného enzymu LDH do extracelulárního prostoru (médiu).

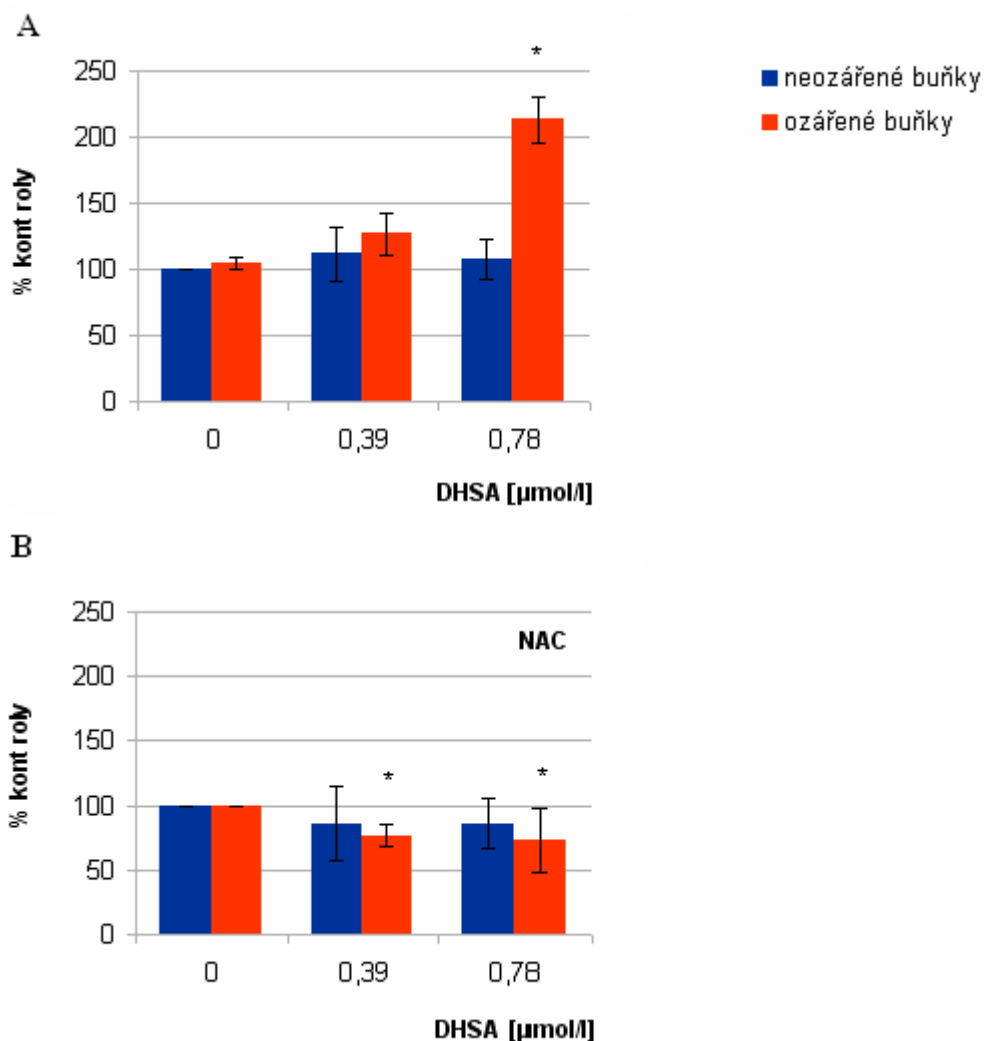
Po hodinové inkubaci buněk s různými koncentracemi testovaných látek, SA (0,039 – 0,078 $\mu\text{mol/l}$) či DHSA (0,39 – 0,78 $\mu\text{mol/l}$), byly buňky ozářeny netoxickými dávkami UVA záření (2,5 J/cm^2) a po 4 hodinové inkubaci při 37 °C byla sledována aktivita LDH uvolněné do kultivačního média. Změna aktivity LDH byla měřena jako pokles absorbance $\Delta A_{340}/\text{min}$, který byl způsoben oxidací NADH. Testováno bylo rovněž ovlivnění poškození membrány buněk nízkomolekulárními antioxidanty (NAC, DTT), které byly aplikovány současně s alkaloidy.

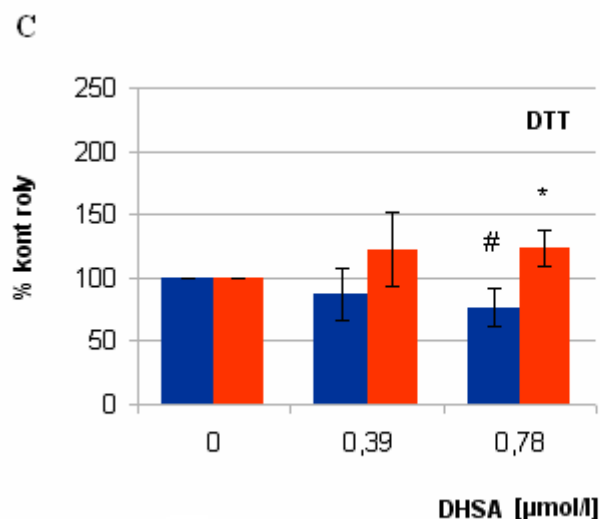
Zvolená dávka UVA záření (2,5 J/cm^2) nepoškozuje samotné buňky nebo vyvolává jen minimální poškození. Nárůst aktivity LDH v médiu byl pozorován u SA v koncentraci 0,039 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s UVA zářením (140 % kontroly), k vyššímu nárůstu došlo u koncentrace 0,078 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s UVA zářením (150 % kontroly) (Obr. 15, A). Nízkomolekulární antioxidanty snížily aktivitu LDH v médiu, a to především u SA v koncentraci 0,078 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s UVA zářením, NAC na 81 % kontroly a DTT na 80 % kontroly (Obr. 15, B, C). Oba použité nízkomolekulární antioxidanty měly obdobný účinek.



Obr. 15: Vliv různých koncentrací SA a v kombinaci s UVA zářením o dávce 2,5 J/cm² na aktivitu LDH v kultivačním médiu. (A) bez ovlivnění nízkomolekulárními antioxidanty; (B) s přidavkem N-acetylcysteinu (NAC); (C) s přidavkem dithiotreitolu (DTT). Data jsou vyjádřena v procentech vztažených k neozářeným buňkám, které sloužily jako kontrola. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. * Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ($p < 0,05$). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly ($p < 0,05$).

U buněk inkubovaných s DHSA v koncentraci 0,78 $\mu\text{mol/l}$ a ozářených netoxickou dávkou UVA byl pozorován výrazný nárůst aktivity LDH v médiu (213 % kontroly) (Obr. 16, A). Nízkomolekulární antioxidanty snížily poškození membrány poklesem aktivity LDH (Obr. 16. B, C), DTT snížil aktivitu LDH v médiu na 124 % kontroly a NAC na 72 % kontroly. NAC snížil poškození buněk (aktivitu LDH v médiu) účinněji než DTT.





Obr. 16: Vliv různých koncentrací DHSA a v kombinaci s UVA zářením o dávce 2,5 J/cm² na aktivitu LDH v kultivačním médiu. (A) bez ovlivnění nízkomolekulárními antioxidanty; (B) s přidavkem N-acetylcysteinu (NAC); (C) s přidavkem dithiotreitolu (DTT). Data jsou vyjádřena v procentech vztahených k neozářeným buňkám, které sloužily jako kontrola. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. * Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly (p < 0,05). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly (p < 0,05).

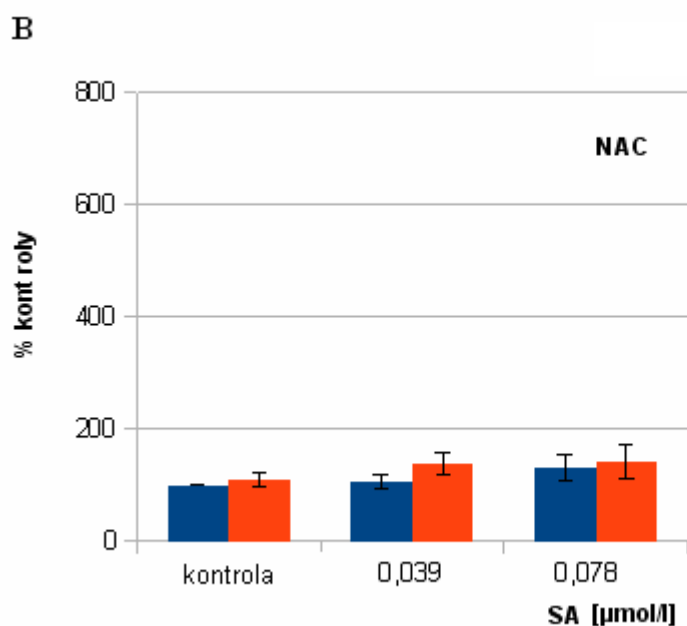
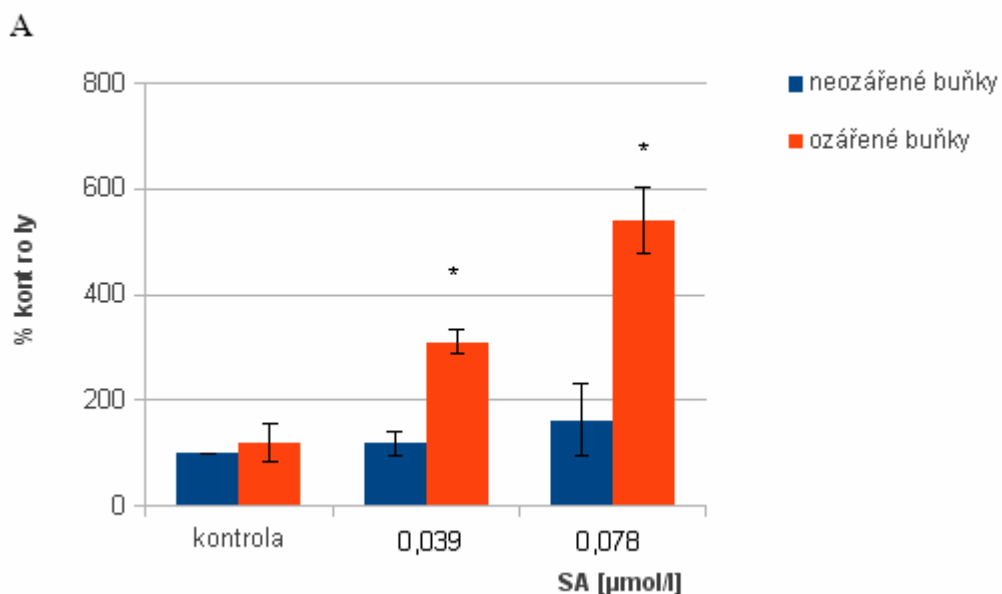
5.2.2. Vliv nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu alkaloidů sledovaný změnou aktivity kaspasy-3

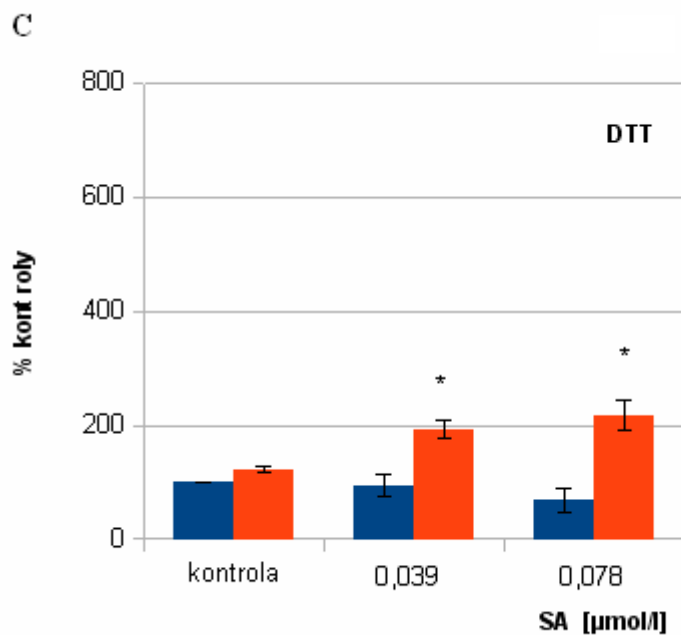
Kaspasa-3 je proteolytický enzym účastnící se procesu apoptózy. Ovlivnění apoptózy SA a DHSA v kombinaci s netoxickou dávkou UVA záření byla studována stanovením aktivity tohoto enzymu.

Lidské kožní fibroblasty byly inkubovány s vybranými koncentracemi SA (0,039 – 0,078 μmol/l) či DHSA (0,39 – 0,78 μmol/l) po dobu jedné hodiny a po ozáření buněk netoxickou dávkou UVA záření (2,5 J/cm²) byly buňky další 4 hodiny inkubovány při 37 °C. Současně byly provedeny experimenty zaměřené na ovlivnění aktivace kaspasy-3 nízkomolekulárními antioxidanty (NAC, DTT).

U buněk inkubovaných se zvolenými koncentracemi SA bylo pozorováno mírné zvýšení aktivity kaspasy-3 (Obr. 17, A). Ozářením buněk inkubovaných se SA netoxickou dávkou UVA záření (2,5 J/cm²) došlo ke koncentračně závislému zvýšení aktivity kaspasy-3 (Obr. 17, A). Aktivita kaspasy-3 vzrostla u buněk inkubovaných se SA v koncentraci 0,039 μmol/l a ozářených netoxickou dávkou UVA na 311 %

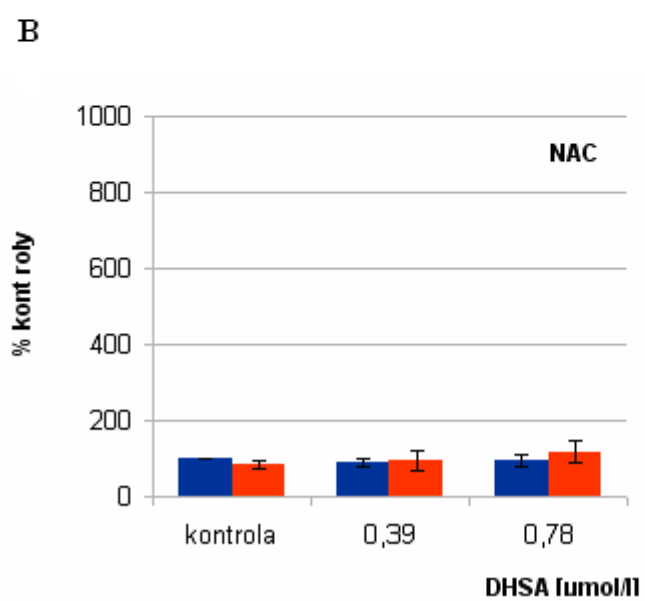
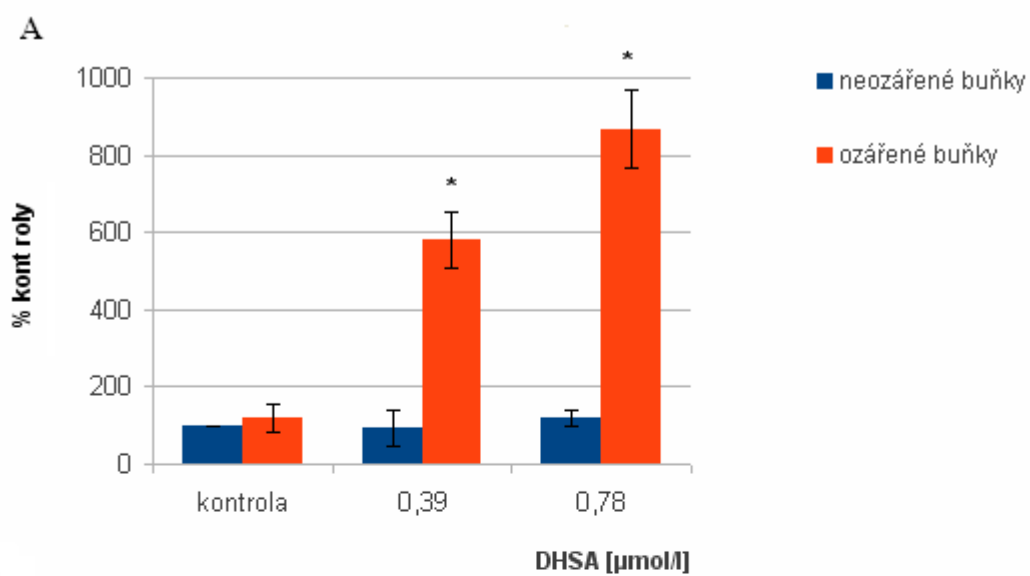
kontroly, v případě vyšší použité koncentrace SA až na 542 % kontroly (Obr. 17, A). Nízkomolekulární antioxidanty výrazně snížily aktivaci kaspasy-3, která byla vyvolána působením SA v kombinaci s UVA zářením (Obr. 17, B, C). DTT snížil aktivitu kaspasy-3 u buněk inkubovaných se SA v koncentraci 0,078 $\mu\text{mol/l}$ na 217 % kontroly. NAC byl v tomto ohledu účinnější a snížil aktivitu kaspasy-3 až na 142 % kontroly (Obr. 17, B, C).

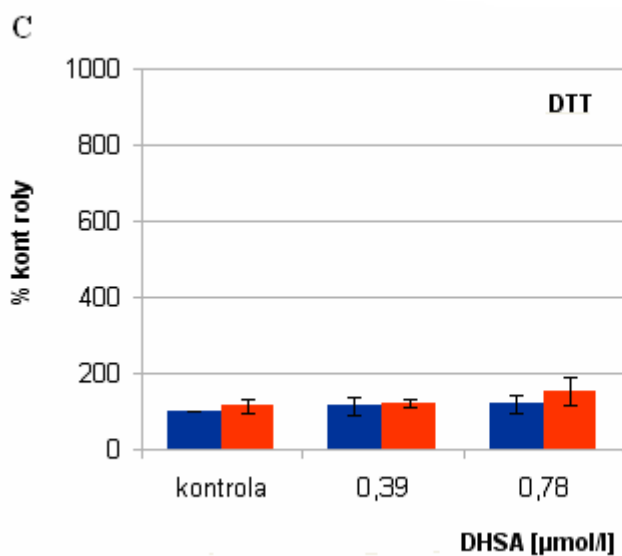




Obr. 17: Vliv různých koncentrací SA a v kombinaci s UVA zářením o dávce $2,5 \text{ J/cm}^2$ na aktivitu kaspasy-3. (A) bez ovlivnění nízkomolekulárními antioxidanty; (B) s přidavkem N-acetylcysteinu (NAC); (C) s přidavkem dithiotreitolu (DTT). Data jsou vyjádřena v procentech vztažených k neozářeným buňkám, které sloužily jako kontrola. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. * Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ($p < 0,05$).

DHSA ve zvolených koncentracích nevyvolal aktivaci kaspasy-3 (Obr. 18, A). Ozářením buněk inkubovaných s DHSA netoxickou dávkou UVA záření ($2,5 \text{ J/cm}^2$) došlo k výraznému zvýšení aktivity kaspasy-3 (Obr. 18, A). Aktivita kaspasy-3 vzrostla u buněk inkubovaných s DHSA v koncentraci $0,39 \text{ µmol/l}$ a ozářených netoxickou dávkou UVA na 580 % kontroly, v případě vyšší použité koncentrace DHSA až na 867 % kontroly (Obr. 18, A). Oba použité nízkomolekulární antioxidanty výrazně snížily aktivaci kaspasy-3, která byla vyvolána působením DHSA v kombinaci s UVA zářením (Obr. 18, B, C).





Obr. 18: Vliv různých koncentrací DHSA a v kombinaci s UVA zářením o dávce $2,5 \text{ J/cm}^2$ na aktivitu kaspasy-3. (A) bez ovlivnění nízkomolekulárními antioxidanty; (B) s přidavkem N-acetylcysteinu (NAC); (C) s přidavkem dithiotreitolu (DTT). Data jsou vyjádřena v procentech vztahených k neozařeným buňkám, které sloužily jako kontrola. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. * Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ($p < 0,05$).

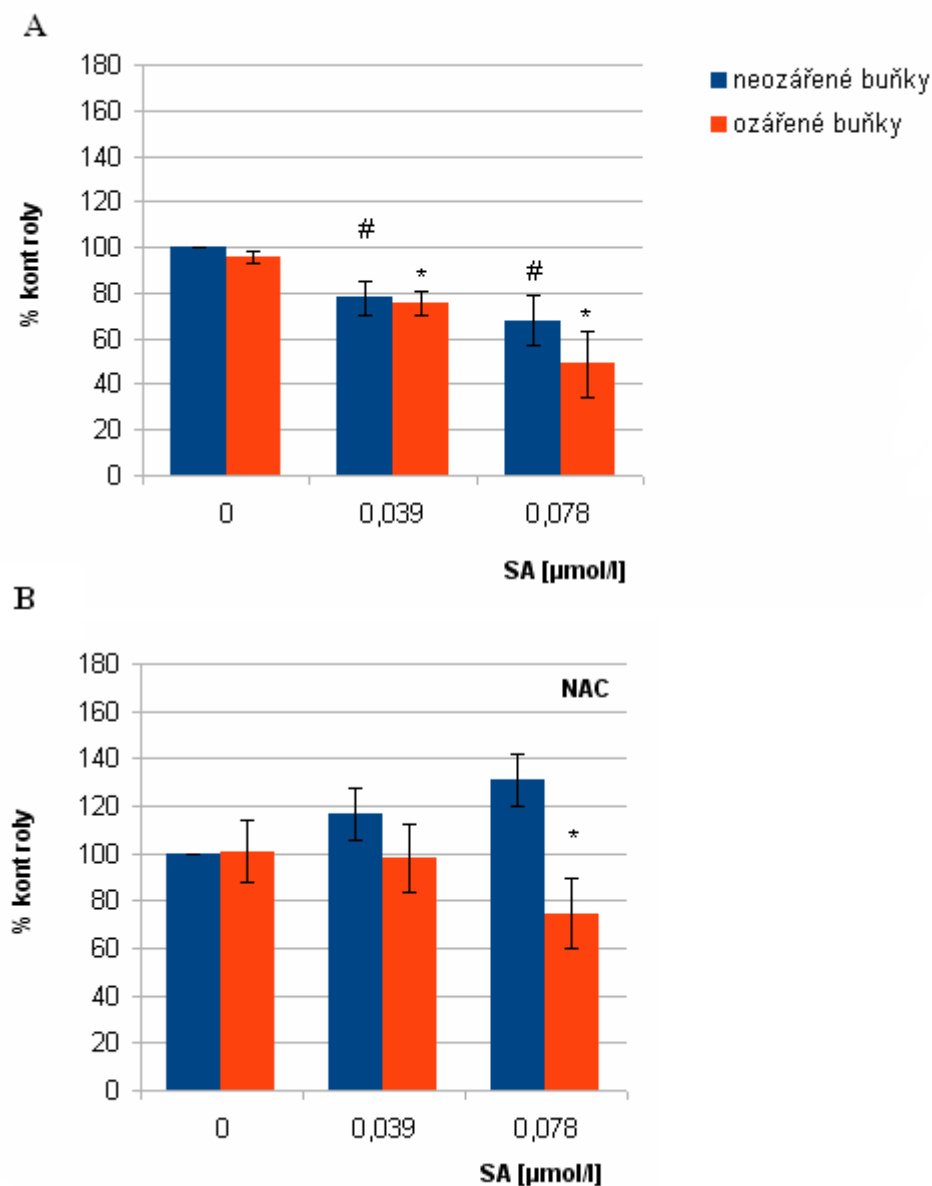
5.2.3. Vliv nízkomolekulárních antioxidantů na toxicitu a fototoxicitu alkaloidů sledovaný intracelulárním obsahem redukovaného glutathionu

Glutathion (GSH) je intracelulární tripeptid, který reaguje s ROS, a tak zajišťuje oxidoredukční rovnováhu v buňce. Také při zátěži organismu toxickými látkami dochází k poklesu hladiny redukovaného GSH v buňkách, který je spotřebováván na jejich eliminaci z těla.

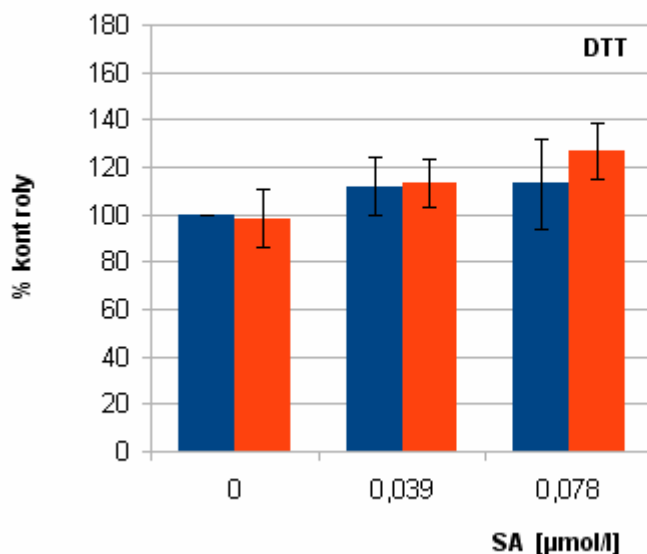
Buňky byly po hodinové inkubaci se SA (0,039 – 0,078 $\mu\text{mol/l}$) nebo DHSA (0,39 – 0,78 $\mu\text{mol/l}$), ozářeny netoxickými dávkami UVA záření ($2,5 \text{ J/cm}^2$) a poté 4 hodiny inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Množství GSH bylo stanoveno nárůstem absorbance DTNB měřené při 412 nm. Současně byl studován vliv nízkomolekulárních antioxidantů na změny vyvolané alkaloidy a UVA zářením.

U buněk inkubovaných se SA byl pozorován koncentračně závislý pokles hladiny redukovaného GSH, který se ozářením buněk netoxickou dávkou UVA záření ($2,5 \text{ J/cm}^2$) ještě prohloubil (Obr. 19, A). Hladina GSH klesla u neozařených

buněk inkubovaných se SA (0,078 $\mu\text{mol/l}$) na 68 % kontroly, u ozářených buněk až na 49 % kontroly (Obr. 19, A). Nízkomolekulární antioxidanty zvýšily hladinu GSH u ozářených i neozářených buněk inkubovaných se zvolenými koncentracemi SA (Obr. 19, B, C). DTT byl v tomto ohledu účinnější než NAC. NAC ale výrazněji ovlivnil obsah GSH v buňkách inkubovaných pouze s alkaloidy.

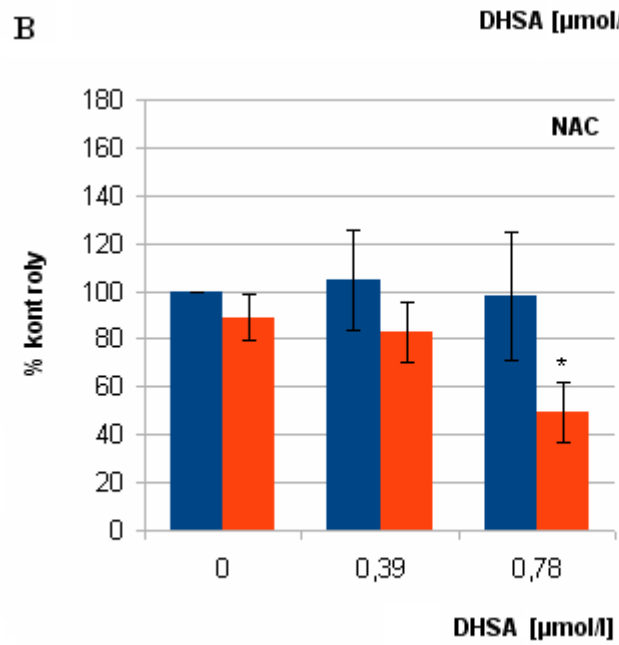
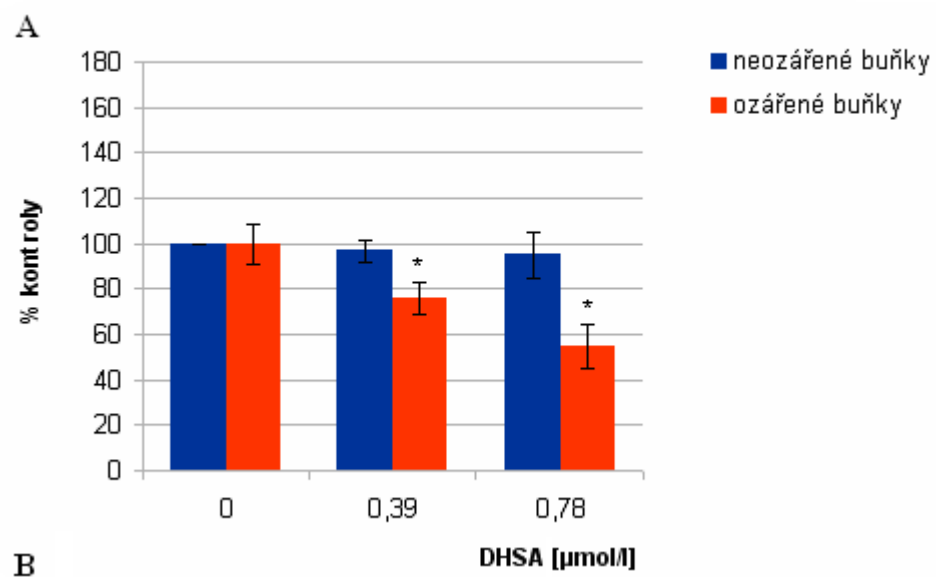


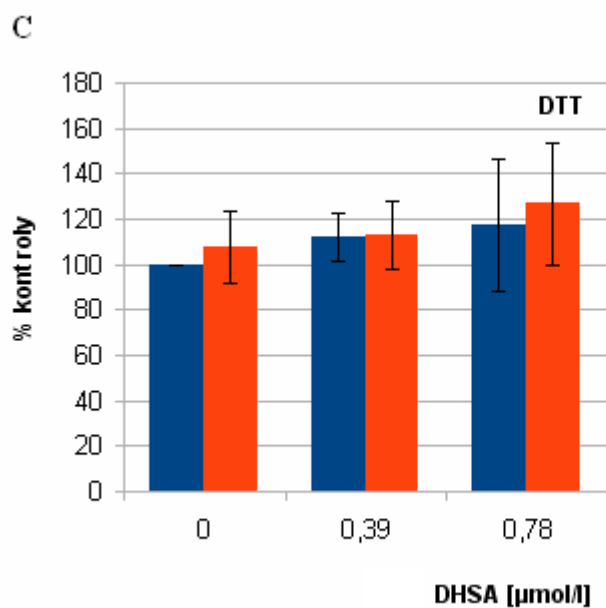
C



Obr. 19: Účinek různých koncentrací SA a v kombinaci s UVA zářením o dávce 2,5 J/cm² na hladinu redukovaného glutathionu. (A) bez ovlivnění nízkomolekulárními antioxidanty; (B) s přidavkem N-acetylcysteinu (NAC); (C) s přidavkem dithiotreitolu (DTT). Data jsou vyjádřena v procentech vztažených k neozářeným buňkám, které sloužily jako kontrola. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. * Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ($p < 0,05$). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly ($p < 0,05$).

DHSA ve zvolených koncentracích neměl výrazný vliv na hladinu redukovaného GSH v kožních buňkách (Obr. 20, A). Ozářením buněk netoxickou dávkou UVA záření (2,5 J/cm²) došlo k poklesu hladiny redukovaného GSH, a to při nižší zvolené koncentraci DHSA (0,39 μmol/l) na 76 % kontroly a při vyšší zvolené koncentraci DHSA (0,78 μmol/l) až na 55 % kontroly (Obr. 20, A). Nízkomolekulární antioxidanty ovlivnily mírně hladinu redukovaného GSH u ozářených buněk (Obr. 20, B, C). Aplikací NAC došlo ke koncentračně závislému poklesu hladiny GSH až na 50 % kontroly. NAC nebyl schopen eliminovat pokles hladiny GSH u buněk ovlivněných DHSA a ozářených netoxickou dávkou UVA záření. DTT zvýšil hladinu GSH na 127 % kontroly (Obr. 20, B, C).





Obr. 20: Účinek různých koncentrací DHSA a v kombinaci s UVA zářením o dávce $2,5 \text{ J/cm}^2$ na hladinu redukovaného glutathionu. (A) bez ovlivnění nízkomolekulárními antioxidanty; (B) s přidavkem N-acetylcysteinu (NAC); (C) s přidavkem dithiotreitolu (DTT). Data jsou vyjádřena v procentech vztažených k neozářeným buňkám, které sloužily jako kontrola. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. * Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ($p < 0,05$).

6. DISKUSE

Přírodní látky rostlinného původu jsou používány lidmi již po několik tisíciletí a staly se nedílnou součástí každodenního lidského života. Zejména léčivé rostliny jsou zdrojem širokého spektra látek, které mají nezastupitelnou roli v tradiční medicíně a využívány jsou i dnes. Kromě léčivých účinků jsou přírodní látky používány i v prevenci a ochraně lidského zdraví např. v kosmetických a hygienických přípravcích. Lidé zjistili, že díky resorpční vlastnosti kůže je možné některé léčivé látky podávat v podobě mastí. Hlavní výhodou této aplikace je lokální působení účinné látky na postižené místo, čímž nedochází k zatížení gastrointestinálního traktu (Hrabálek *et al.* 1999). Bohužel, ne vždy je známa bezpečnost použití těchto přírodních látek a některé z nich mohou v kombinaci se slunečním zářením na kůži vyvolávat fototoxické reakce (Spielmann *et al.* 1994).

Předmětem studia této diplomové práce byla fototoxicita alkaloidu SA, který je metabolizován především na DHSA (Vrublová, 2010), a proto byly do experimentů zahrnuty obě tyto látky. SA je známý pro své protizánětlivé, antibakteriální, antimykotické a v poslední době i protinádorové účinky (Mackraj, 2008). Díky těmto vlastnostem je součástí mnoha komerčně dostupných přípravků jako jsou např. přípravky ústní hygieny řady Santoin, černá mast (black salve) nebo rostlinný extrakt Sanguiritrin. Topická aplikace SA však může být spojena s již zmíněnou fototoxickou reakcí, která může poškodit i zdravou tkáň. Toxicita tohoto alkaloidu je tak stále předmětem diskuse (Cienki a Zaret, 2010). Bezpečností použití a fototoxickou reakcí SA se zabývala také Novotná (2013) ve své diplomové práci, na jejíž výsledky navazuje i tato práce. Novotná ve svých experimentech prokázala, že SA je kožními fibroblasty přeměňován na DHSA, který je působením UVA záření přeměňován zpět na SA. Tato konverze netoxického DHSA na výrazně toxičtější SA je spojena s produkcí ROS (Novotná, 2013). Cílem této práce bylo sledovat, zda vzniklé ROS aktivují kaspasu-3 a zda ovlivní hladinu redukováného GSH v buňkách. Aplikací nízkomolekulárních antioxidantů (NAC, DTT) jsme se pokusili ovlivnit tyto studované parametry a potlačit oxidační stres při konverzi netoxického DHSA na SA působením UVA.

Metodou inkorporace neutrální červeně do lidských kožních fibroblastů jsme studovali toxický a fototoxický účinek obou alkaloidů, SA a jeho hlavního metabolitu DHSA. Z literatury je známo, že SA je více toxický k buňkám než DHSA. V našich experimentech nebylo možné přesně stanovit hodnotu IC₅₀ pro SA (> 5 μmol/l), avšak působením UVA záření o dávce 2,5 J/cm² hodnota IC₅₀ klesla na 1,4 μmol/l (Obr. 13, Tab. 2). Toxicita SA se tak v kombinaci s UVA zářením prohloubila pouze 3,5x, což koreluje s publikovanými výsledky Novotné (2013). Ta ve své práci provedla obdobný experiment a dospěla k závěru, že toxicita SA se v kombinaci s UVA zářením prohlubuje 2,25x (Novotná, 2013). Ačkoliv ve své práci použila 24 hodinovou inkubaci buněk s testovanými látkami a v naší práci byla inkubace pouze hodinová, nárůst toxicity SA je přibližně stejný. Jak vyplývá z její práce, SA je kožními fibroblasty přeměňován na DHSA velmi rychle. Již po 1 hodinové inkubaci dochází k této konverzi SA na DHSA. Následná aplikace netoxické dávky UVA tak může prohloubit toxicitu SA, protože dochází i ke konverzi vzniklého DHSA na SA, která je spojena s produkcí ROS, které poškozují buňky (Novotná 2013).

DHSA se ukázal jako látka netoxická pro kožní fibroblasty. Mírný toxický účinek tohoto alkaloidu byl zaznamenán až při nejvyšší použité koncentraci 50 μmol/l (Obr. 14). Hodnotu IC₅₀ pro DHSA rovněž nebylo možné stanovit (> 50 μmol/l). Ozářením buněk netoxickou dávkou UVA záření (2,5 J/cm²) se toxicita DHSA výrazně zvýšila a hodnota IC₅₀ klesla na 1,42 μmol/l (Obr. 14, Tab. 2). Jelikož má UVA záření rozsah vlnových délek, které jsou DHSA snadno absorbovatelné, je tento alkaloid lepším chromoforem v porovnání se SA. DHSA je tedy možné považovat za látku s fototoxickým účinkem, což potvrzují i naše experimenty, kdy aplikací UVA záření se toxicita DHSA zvýšila minimálně 35x.

Tab.2: IC₅₀ pro SA a DHSA u lidských fibroblastů.

	IC ₅₀ (μmol/l)	
		+UVA (2,5 J/cm ²)
SA	> 5	1,40
DHSA	> 50	1,42

Na základě zjištěné toxicity obou alkaloidů, byly pro další experimenty vybrány pouze dvě koncentrace SA (0,039 - 0,078 μmol/l) a DHSA (0,39 - 0,78 μmol/l), které se ukázaly jako minimálně toxické pro kožní fibroblasty, avšak po

expozici UVA záření se jejich toxicita výrazně zvýšila. Jelikož je DHSA látkou netoxickou byla zvolena jeho koncentrace 10x vyšší než tomu bylo u SA.

Jak je známo z literatury, SA je vzhledem k přítomnosti iminové vazby reaktivní molekula interagující s SH-skupinami peptidů a proteinů, čímž dochází k ovlivnění řady dějů a signálních drah, včetně apoptózy (Janovská *et al.* 2010). Protože Novotná (2013) prokázala, že konverze DHSA na SA působením UVA záření je provázána produkcí ROS, zaměřili jsme se také na změny hladiny intracelulárního antioxidantu GSH a aktivaci apoptózy, která může být vyvolána oxidačním stresem. Tato práce byla rovněž zaměřena na ovlivnění těchto dějů nízkomolekulárními antioxidanty NAC a DTT. Výsledky experimentů ukázaly, že DHSA v 10x vyšších koncentracích, v porovnání se SA, neaktivoval proces apoptózy prostřednictvím kaspasy-3 (Obr. 18, A). Naopak SA indukoval aktivaci kaspasy-3 (Obr. 17, A), což odpovídá i literárním údajům (Debiton *et al.* 2003). Ozářením buněk inkubovaných se zvolenými koncentracemi alkaloidů netoxickou dávkou UVA záření ($2,5 \text{ J/cm}^2$) došlo k výraznému zvýšení aktivity kaspasy-3 (Obr. 17, A; 18, A). Záření UVA tak vyvolalo zpětnou konverzi intracelulárního DHSA na SA, která je spojena s produkcí ROS. Tento jev je podobný obranné reakci rostlin, v nichž DHSA, který je uložen v zásobních organelách, je v přítomnosti elicitorů biotického či abiotického původu přeměňován na SA a ten je zpětně přeměňován reduktasou na méně toxický DHSA. Z dosažených výsledků vyplývá, že vzniklé ROS vyvolaly aktivaci kaspasy-3, která byla aplikací nízkomolekulárních antioxidantů eliminována (Obr. 17, B, C; 18, B, C). Oxidační stres vyvolaný konverzí netoxického DHSA na SA působením UVA byl aplikací NAC i DTT potlačen. Navíc vznikající SA z DHSA působením UVA tak sám může aktivovat kaspasu-3 interakcí s jejími SH-skupinami.

Z literatury je známo, že GSH reaguje na přítomnost ROS, které neutralizuje (Vrba *et al.* 2009). Při nadbytku ROS se GSH nestačí regenerovat a jeho hladina klesá, což bylo potvrzeno i v našich experimentech, kde u buněk inkubovaných se SA byl pozorován koncentračně závislý pokles hladiny GSH (Obr. 19, A), zatímco DHSA ve zvolených koncentracích neměl na hladinu redukováného GSH v kožních buňkách výrazný vliv (Obr. 20, A). Ozářením buněk inkubovaných s DHSA netoxickou dávkou UVA záření ($2,5 \text{ J/cm}^2$) však došlo ke koncentračně závislému poklesu hladiny redukováného GSH až na 55 % kontroly (Obr. 20, A). UVA záření vyvolalo konverzi DHSA na SA, která je spojena s produkcí ROS a s poklesem GSH.

Buňky se účinně chránily pomocí antioxidantu DTT, což se projevilo vzestupem hladiny GSH (Obr. 19, C; 20, C). NAC nebyl schopen eliminovat pokles hladiny GSH u buněk ovlivněných DHSA a ozářených netoxickou dávkou UVA záření (Obr. 20, B). DTT byl v tomto ohledu účinnější než NAC.

Z dosavadních výsledků můžeme říci, že UVA záření (2,5 J/ cm²), které samo nevyvolává toxicitu, zvyšuje toxicitu SA a výrazně zvyšuje toxicitu DHSA. S přípravky pro topickou aplikaci obsahující tyto alkaloidy by se tak mělo nakládat velmi obezřetně. Jejich aplikací v kombinaci se slunečním zářením může docházet k fototoxické reakci, která je nežádoucí. Díky produkci ROS dochází k aktivaci apoptózy a k poklesu hladiny GSH. Na druhou stranu pokud budeme uvažovat o těchto látkách jako o protinádorových léčivech, potom právě produkce ROS a pokles GSH aktivují apoptózu a tím i vyvolávají poškození a odstraňování nádorových buněk. Fototoxického jevu tak může být cíleně využito např. v terapii kožních nádorů, kdy je však nebezpečí, že může být poškozena i zdravá tkáň. Vzhledem k tomu, že BA jsou součástí mnoha kosmetických přípravků s topickou aplikací, měla by být dále detailně zkoumána jejich toxicita, stejně jako i jejich absorpce do vnitřního prostředí, distribuce a vliv na metabolické dráhy.

7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zkoumat vliv SA a jeho metabolitu DHSA na vybrané parametry v primárních kulturách lidských kožních fibroblastů ozářených netoxickou dávkou UVA záření, a dále studovat ovlivnění těchto parametrů nízkomolekulárními antioxidanty. Ze získaných výsledků lze vyvodit následující závěry:

- Cytotoxicita SA na lidských kožních fibroblastech je výrazně vyšší v porovnání s DHSA. SA byl ve vyšších koncentracích pro kožní fibroblasty toxický (měřením životnosti použitím neutrální červeně), zatímco u DHSA nebyl zaznamenán toxický účinek do koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$.
- UVA záření (2,5 J/cm^2), které samo nevyvolává toxicitu (měřením životnosti použitím neutrální červeně), zvyšuje toxicitu SA. Hodnota IC_{50} SA v kombinaci s UVA klesla na 1,4 $\mu\text{mol/l}$. UVA záření (2,5 J/cm^2) výrazně zvyšuje toxicitu DHSA. Hodnota IC_{50} DHSA při aplikaci UVA záření klesla na 1,42 $\mu\text{mol/l}$. DHSA má výraznou fototoxicitu.
- SA (0,039 – 0,078 $\mu\text{mol/l}$) vykazoval koncentračně závislou toxicitu na lidské kožní fibroblasty a vyvolával apoptózu. Ozářením buněk UVA zářením (2,5 J/cm^2) se toxicita tohoto alkaloidu prohloubila.
- DHSA (0,39 – 0,78 $\mu\text{mol/l}$) neměl vliv na aktivaci kaspasy-3. Ozářením buněk UVA zářením (2,5 J/cm^2) se toxicita DHSA výrazně prohloubila.
- Nízkomolekulární antioxidanty (NAC, DTT) vyvolaly snížení aktivace kaspasy-3 u buněk inkubovaných se SA i DHSA v kombinaci s UVA zářením (2,5 J/cm^2), přičemž u buněk inkubovaných s DHSA v kombinaci s UVA zářením byla účinnost antioxidantů vyšší než u buněk inkubovaných se SA v kombinaci s UVA zářením. NAC byl v tomto ohledu účinnější než DTT.
- SA (0,039 – 0,078 $\mu\text{mol/l}$) vyvolal pokles hladiny redukovaného GSH v kožních fibroblastech, zatímco DHSA (0,39 – 0,78 $\mu\text{mol/l}$) hladinu GSH neovlivnil. SA i DHSA v kombinaci s UVA zářením (2,5 J/cm^2) vyvolávají pokles hladiny redukovaného GSH.
- Hladina redukovaného GSH u buněk inkubovaných se SA i DHSA v kombinaci s UVA zářením (2,5 J/cm^2) se aplikací nízkomolekulárních antioxidantů zvýšila. DTT byl v tomto ohledu účinnější než NAC.

8. LITERATURA

Arakawa H., Clark W. G., Psenak M., Coscia C. J. (1992) Purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from elicited *Sanguinaria canadensis* cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 229, pp. 1 – 7.

Averbeck D., Averbeck S., Dubertret L., Young A. R., Morlière P. (1990) Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Photochem Photobiol* 7, pp. 29 - 209.

Bajaj N. P., McLean M. J., Waring M. J., Smekal E. (1990) Sequence-selective, pH-dependent binding to DNA of benzophenanthridine alkaloids. *J. Mol. Rec.* 3, pp. 48 – 54.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, pp. 446 – 475.

Bernerd F., Asselineau D. (1998) UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. *Cell death and differentiation* 5, pp. 792 – 802.

Blée E. (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.* 37, pp. 33 – 72.

Boh E. E. (1996) Role of reactive oxygen species in dermatologic diseases. *Clin. Dermatol.* 14, pp. 343 – 352.

Brychtová S., Bezděková M., Brychta T. (2010) Fibroblasty – Buňky známé či neznámé? *Česko-slovenská patologie* 46, pp. 29 – 32.

Burgenos R. E., Christiano A. M. (1997) The dermal – epidermal junction. *Cell Biol.* 9, pp. 651 - 658.

Carlberg I., Mannervick B., (1985) Glutathione reductase. *In Methods in Enzymology 113*. Meister A., Academic Press, London, pp. 484 – 490.

Cienki J. J., Zaret L. (2010) An Internet Misadventure: Bloodroot Salve Toxicity. *J. Altern. Complement. Med.* 16, pp. 1125 – 1127.

Crowson A. N., Brown T. J., Magro C. M. (2003) Progress in the understanding of the pathology and pathogenesis of cutaneous drug eruptions: Implication for management. *Am. J. Clin. Dermatol.* 4, pp. 407 – 428.

Damian D., Barnetson R., Holliday G. (1999) Low-dose UVA and UVB have different time courses for suppression of contact hypersensitivity to a recall antigen in humans. *J. Invest Dermatol* 112, pp. 939 – 944.

Debiton E., Madelmont J. C., Legault J., Barthomeuf J. (2003) Sanguinaire – induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chemother Pharmacol* 51, pp. 474 – 482.

Ding Z., Tang S. C., Weerasinghe P., Yang X., Pater A., Liepins A. (2002) The alkaloid sanguinarine is effective against multidrug resistance in human cervical cells via bimodal cell death. *Biochem. Pharmacol.* 63, pp. 1415.

Ditrichová D. (2008) Fotosenzitivní potenciál léčiv pro zevní i celkové použití. *Medicína pro praxi* 5/10, pp. 385 - 387.

Dostál J., Slavík J. (2000) Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech. *Chem. Listy* 94, pp. 15 - 20.

Dubakiene, R., Kupriene M. (2006) Scientific problems of photosensitivity. *Medicina* 42, pp. 619 - 624.

Duvoix A., Delhalle S., Blasius R., Schnekenburger M., Morceau F. (2004). Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. *Biochemical Pharmacology* 68, pp. 1101 – 1111.

- Dvořák Z., Šimánek V. (2007) *Current Drug Metabolism* 8, pp. 173 – 176.
- Dylevský I. (2009) *Funkční anatomie. GRADA Publishing, Praha*, pp. 507 - 509.
- Elišková M., Naňka O. (2006) *Přehled anatomie, Karolinum, Praha*, pp. 304 - 306.
- Ettler K. (2007) Účinky UV záření na kůži a fotoprotekce. *Med. Pro Praxi* 6, pp. 273 - 275.
- Eun J. P., Koch G. Y. (2004) Suppression of angiogenesis by the plant alkaloid, sanguinarine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, pp. 618 – 624.
- Facchini P. J., Johnson A. G., Poupart J., De Luca V. (1996) Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiology* 111, pp. 689 – 697.
- Frébort I., Haviger A., Peč P. (1992) *Experimentální metody biochemie. ISBN, Olomouc, Česká republika*, pp. 23 – 29.
- Giacomoni P. U. (2007) *Biophysical and physiological effects of solar radiation on human skin. The Royal Society of Chemistry, Cambridge*.
- Gilchrest B. A., Park H. Y., Eller M. S. (1996) Mechanism of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem. Photobiol.* 63, pp. 1 - 10.
- Grether-Beck S., Marini A., Jaenicke T., Krutmann J. (2014) Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. *Photodermatol Photoimmunol and Photomed* 30, pp. 167 – 174.
- Gruber F., Zamolo G., Kastelan M., Prpic Massari L., Cabrijan L., Peharda V., Batinac T. (2007) Photocarcinogenesis-molecular mechanisms. *Collegium Antropol.* 31, pp. 101 – 106.

Hrabálek A., Doležal P., Šklubalová Z., Farsa O., Krebs A. (1999) Akceleranty transdermální penetrace. *Chem. Listy* 93, pp. 107 – 119.

Chaturvedi M. M., Kumar A., Darnay B. G., Chainy G. B., Aqarwal S., Aqarwal B. B. (1997) Sanguinarine (pseudochelerythrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation. *J. Bio. Chem.* 272, pp. 30129 – 30134.

Cho S., Lee M. J., Kimm M. S. (2008) Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo. *J. Dermatol Sci* 50, pp. 123 – 133.

Janovska M., Kubala M., Simanek V., Ulrichová J. (2010) Interaction of sanguinarine and its dihydroderivate with the Na(+)/K(+)-ATPase. Complex view on the old problem. *Toxicology Letters* 196, pp. 56 – 59.

Jantschitsch C., Weichenthal M., Maeda A., Proksch E., Schwarz T., Schwarz A. (2011) Infrared radiation does not enhance the frequency of ultraviolet radiation-induced skin tumors, but their growth behaviour in mice. *Exp Dermatol* 20, pp. 346 – 350.

Kaddu S., Kerl H., Wolf P. (2001) Accidental bullous phototoxic reactions to bergamot aromatherapy oil. *Journal of American Academy of Dermatology* 45, pp. 458 – 461.

Kavli G., Volden G. (1984) Phytophotodermatitis. *Photodermatology* 1, pp. 65 - 75.

Kerr A. C., Ferguson J., Ibbotson S. H. (2007) Acute phototoxicity with urticarial features during topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Clin. Exp. Dermatol* 32, pp. 201 – 202.

Kimm H. H., Lee M. J., Lee S. R. (2005) Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hair less mice. *Mech Ageing Dev* 126, pp. 1170 -

1177.

Kopřiva F. (2005) Studium apoptózy a nové terapeutické děje. *Medical Tribune* 11, pp. 14.

Krutmann J., Morita A., Chung J. H. (2012) Sun exposure: when molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *J. Invest Dermatol* 132, pp. 976 – 984.

Kutchan T. M. (1996) Heterologous expression of alkaloid biosynthetic genes – a review. *Gene* 179, pp. 73 – 81.

Lavker R. M., Gerberick G. F., Veres D. A., Irwin C. J., Kaidbey K. H. (1995) Cumulative effects from repetitive exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J. Am Acad Dermatol* 32, pp. 53 – 62.

Lichnovský V., Černochová D., Dosoudilová M., Pospíšilová E. (2002) Základy histologie pro bakaláře, ISBN, Olomouc, Česká republika, pp. 70 – 72.

Liu H., Wang J., Zhao J., Lu S., Wang J. (2009) Isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* active against plant microbial pathogens. *Natural Product Communications* 4, pp. 1557 – 1560.

Ljunggren B. (1990) Severe phototoxic burn following celery ingestion. *Archives of Dermatology* 126, pp. 1334 - 1336.

Loveday K.S. (1996) Interrelationship of photocarcinogenicity, photomutagenicity and phototoxicity. *Photochemistry and Photobiology* 63, pp. 369 – 372.

Mackraj I., Govender T., Gathiram P. (2008) Sanguinarine. *Cardiovasc. Ther.* 26, pp. 75 – 83.

Marzulli, F. N., Maibach, H. J. (1987) Phototoxicity (photoirritation) of topical and systemic agents. In: *Dermatotoxicology* (Eds. Marzulli, F. N., Maibach, H. I.). Hemisphere, Washington, DC., USA, pp. 431 - 440.

Marzulli, F. N., Maibach, H. I. (2004) Photoirritation (Phototoxicity, Phototoxic Dermatitis). In: *Dermatotoxicology*, 6th Edition (Eds. Zhai, H., Maibach H. I.). CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 341 - 353.

Morlière P., Hüppe G., Averbeck D., Young A. R., Santus R., Dubertret L. (1990) In vitro photostability and photosensitizing properties of bergamot oil. Effects of a cinnamate sunscreen. *J. Photochem Photobiol* 7, pp. 199 - 208.

Müller L., Kasper P., Kersten B., Zhang J. (1998) Photochemical genotoxicity and photochemical carcinogenesis: Two sides of a Coin? *Toxicology Letters* 102/103, pp. 383 - 387.

Navarro V., Delgado D. (1999) Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *J. Ethnopharmacol.* 66, pp. 223 – 226.

Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, pp. 1237 – 1247.

Novotná L. (2013) Transdermální transport a bezpečnost přírodních látek. Diplomová práce.

Ochu E. E., Rothwell N. J., Waters C. M. (1998) Caspases mediate 6-hydroxydopamine induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 70, pp. 2637 – 2640.

Ouhtit A., Ananthaswamy H. N. (2001) A model for UV-induction of skin cancer. *J. Biomed. Biotechnol* 1, pp. 5 – 6.

Pathak M. A. (1986) Phytophotodermatitis. *Clinics in Dermatology* 4/2, pp. 102 - 121.

Paulsen F. (2004) Histologie a buněčná biologie, *H&H, Jinočany*, pp. 272-277.

Robert C., Dubertret L. (1995) Cancers de la peau. Leur lien avec les rayons ultraviolets. *Press Med.* 24, pp. 1610 – 1616.

Rokyta R., Marešová D., Turková Z. (2002) Somatologie I, *Eurolex Bohemia, Praha*, pp. 113-119.

Rosentein B., Phelps R., Weistock M. (1999) p53 mutations in basal cell carcinomas arising in routine users of sunscreens. *Photochem. Photobiol.* 70, pp. 798 – 806.

Saltzberg F., Barron G., Fenske N. (2009) Deforming Self-Treatment with Herbal „Black salve“. *Dermatol. surg.* 35, pp. 1152 - 1154.

Saraf S., Gupta A., Kaur Ch. D., Jangde M. Saraf S. (2014) Dermatological consequences of photosensitization with an approach to treat them naturally. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17 (2), pp. 167 – 172.

Sarasin A. (1999) The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mut. Res.* 428, pp. 5 – 10.

Sayre R. M., Dowdy J. C. (2008) The increase in melanoma: Are dietary furocoumarins responsible? *Medical Hypotheses* 70/4, pp. 855 - 859.

Semkina O. A. (2005) Ointments, gels, liniments, and creams containing phytopreparations. *Pharm. Chem. J.* 39, pp. 369 – 374.

Slominski A., Pawelek J. (1998) Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin. Dermatol.* 16, pp. 503 – 515.

Spielmann H., Lovell W. W., Hölzle E., Johnson B. E., Maurer T., Miranda M. A., Pape W. J. W., Saporá O., Sladowski D. (1994) *In vitro* phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. *ATLA* 22, pp. 314 - 348.

Sun M., Chun J., Lou W., Gao A. (2010) Sanguinarine is a novel inhibitor of survivin and inhibits the growth of prostate cancer cells. *The journal of Urology* 183, pp. 459.

Šimánek V. (1985) Benzophenanthridine alkaloids. In the alkaloids 26. Brossi A., Academic Press, New York, pp. 185 – 240.

Tisserad R., Balacs T. (1995). Essential oil safety a guide for health care professionals. Churchill Livingstone, Elsevier Limited.

Vičar J., Soural M., Hlaváč J. (2010) Separace benzo[c]fenanthridinových alkaloidů z *Macleaya cordata*. *Chem.listy* 104, pp. 51-53.

Vichkanova S. A., Tolkachev O. N., Martynova R. G., Arzamastsev E. V. (1982) Sanguiritrin, a new antimicrobial drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 16, pp. 1515 – 1520.

Vrba J., Doležel P., Vičar J., Ulrichová J. (2009) Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Toxicology in vitro* 23, pp. 580 – 588.

Vrublová E. (2010) Biologická aktivita *Macleaya cordata*. Disertační práce.

Walterova D., Ulrichová J., Valka I., Vicar J., Vavreckova C. (1995) Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerithrine: biological activities and dental care applications. *Acta Univ Palacki Olomouc Fac Med* 139, pp. 7-16.

Weiss D., Baumert A., Vogel M., Roos W. (2006) Sanguinarin reduktase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant. Cell Env.* 29, pp. 291 – 302.

Wolkenstein P., Revuz J. (1995) Drug-induced severe skin reactions. Incidence, management and prevention. *Drug Safety* 13, pp. 56 – 58.

Wondrak G. T., Jacobson M. K., Jacobson E. L. (2005) Endogenous UVA-photosensitizers: Mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, pp. 215 – 237.

Young A. R., Walker S. L., Kinley J. S., Plastow S. R., Averbeck D., Morlière P., Dubertret L. (1990) Phototumorigenesis studies of 5-methoxypsoralen in bergamot oil: evaluation and modification of risk of human use in an albino mouse skin model. *J Photochem Photobiol* 7, pp. 231 - 50.

Young C. (2009) Solar ultraviolet radiation and skin cancer. *Occup. Med.* 59, pp. 82 – 88.

Zaynoun S. T., Aftimos B. A., Tenekjian K. K., Kurban A. K. (1981) Berloque dermatitis: a continuing cosmetic problem. *Contact Dermatitis* 7, pp. 111 - 116.

Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V. (2006) Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky *in vitro* a *in vivo*. *Chem. Listy* 100, pp. 30 – 41.

Zhai H., Maibach H. I. (2004). *Dermatotoxicology*, 6th edition. CRC Press LLC, Boca Raton, USA.

9. SEZNAM ZKRATEK

BA	Benzo[c]fenantridinové alkaloidy
BSA	Bovinní sérový albumin
DHBO	Dihydrobenzofenanthridinoxidasa
DHSA	Dihydrosanguinarin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	Fetální bovinní sérum
GSH	Glutathion
IR	Infračervené záření (infrared)
IRA	A složka IR záření
LDH	Laktátdehydrogenasa
NAC	N-acetylcystein
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukována forma
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SA	Sanguinarin
SD	Směrodatná odchylka
UV	Ultrafialové záření (ultraviolet)
UVA	A složka UV záření
UVB	B složka UV záření
UVC	C složka UV záření
VIS	Viditelná oblast světla