

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Protizápalové účinky rostlinných extraktov

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Daniela Drabyčová
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný obor:	Biochemie
Forma štúdia:	Prezenční
Vedúc práce:	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Rok:	2015

Prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon.

V Olomouci dňa

.....
Daniela Drabyčová

Týmto by som chcela poďakovať svojej školiteľke Mgr. Lucii Rárovej, Ph.D. za odborné a trpezlivé vedenie pri tvorbe tejto diplomovej práce a za poskytnuté zázemie pre bezproblémový priebeh všetkých experimentov. Taktiež by som chcela poďakovať pani laborantke Olge Hustárovej za všestrannú pomoc pri plnení experimentálnej časti práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Daniela Drabyčová
Názov práce	Protizápalové účinky rastlinných extraktov
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Oddelenie chemickej biológie a genetiky, CRH Laboratórium rastových regulátorov, Prírodovedecká fakulta Univerzity Palackého
Vedúci práce	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Táto diplomová práca sa zaoberá charakterizáciou protizápalových účinkov rastlinných extraktov z rastlín pochádzajúcej z ostrova Kalimantan (Borneo, Indonézia). Prvá, teoretická, časť práce je venovaná literárnej rešerši, v ktorej je zahrnutá teória zápalu, jeho aktuálna možná liečba a s tou aj spojené nežiaduce účinky. Ďalej sa táto prvá časť venuje prírodným rastlinným produktom a ich zlúčeninám s protizápalovým účinkom.

V druhej, experimentálnej, časti práce bol pozorovaný vplyv 35 rastlinných extraktov na ľudské endotelové (HUVEC) bunky, u ktorých bol umelo vyvolaný zápal, *in vitro* pomocou ELISA metódy. Následne bola u niektorých z týchto extraktov pozorovaná expresia vybraných proteínov súvisiacich so zápalom prostredníctvom metódy Western blotting a prietokovou cytometriou. Bolo zistené, že protizápalové účinky *in vitro* vykazovala približne polovica testovaných extraktov o koncentrácii 30 µg/ml. Najvýraznejšie protizápalové účinky prejavovali vzorky rastlinných extraktov označených

číslo 4,6,20 a 21, pričom sa jednalo o metanolvý alebo metanol-tetrahydrofuránový extrakt.

Kľúčové slova	Zápal, NF- κ B, protizápalové účinky rastlín, kortikosteroidy, ELISA, imunodetekcia, prietoková cytometria
Počet strán	64
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Daniela Drabyčová
Title	Anti-inflammatory effects of plant extracts
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Chemical Biology and Genetics, CRH Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University
Supervisor	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>This thesis deals with the characterization of the anti-inflammatory effects of plant extracts from plants originating from the island of Kalimantan (Borneo, Indonesia). The first, theoretical part is devoted to the literature review, which includes the theory of inflammation, its possible current therapy and associated side effects. Furthermore, this first part deals with natural plant products and compounds with anti-inflammatory effect.</p> <p>In the second - experimental part of the work the effect of 35 plant extracts was observed in human endothelial (HUVEC) cells <i>in vitro</i> using ELISA, where inflammation were artificially induced. Then, for some of these extracts expression of the selected inflammation-related proteins were observed using Western blotting and flow cytometry. It was found that approximately one half of tested extracts at concentration of 30 µg/ml showed anti-inflammatory effects <i>in vitro</i>. The most significant anti-inflammatory effects of plant extracts displayed methanol or methanol-tetrahydrofuran extracts with</p>

numbers 4, 6, 20 and 21.

Keywords	Inflammation, NF- κ B, anti-inflammatory plant effects, corticosteroids, ELISA, immunodetection, flow cytometry
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1. CIELE PRÁCE	- 10 -
2. ÚVOD.....	- 11 -
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	- 13 -
3.1. ZÁPAL	- 13 -
3.1.1. Fázy zápalu	- 17 -
3.1.2. Možné liečby zápalu.....	- 18 -
3.1.2.1. Nesteroidné protizápalové lieky (NSAID)	- 18 -
3.1.2.2. Kortikosteroidy.....	- 19 -
3.2. PRÍRODNÉ LIEČIVÉ PRODUKTY.....	- 22 -
3.2.1. Zlúčeniny rastlinného pôvodu s protizápalovým účinkom	- 23 -
3.2.1.1. Kurkumín.....	- 23 -
3.2.1.2. Resveratrol.....	- 26 -
3.2.1.3. Kapsaicín	- 27 -
3.2.1.4. Kolchicín	- 27 -
3.3. NF- κ B A JEHO DRÁHA A PROTEÍNY SÚVISIACE SO ZÁPALOVÝM ÚČINKOM ...	- 29 -
3.3.1. <i>IκBα</i> (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha – nukleárny faktor kappa zosil'ovaču ľahkého polypeptidového génu v B-bunkovom inhibítore, alfa).....	- 30 -
3.3.2. <i>IKKα/β</i> (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha/beta – Inhibitor jadrového faktoru kappa-B kinázy podjednotka alfa/beta)	- 31 -
3.3.3. <i>mTOR</i> (The mammalian/mechanistic target of rapamycin – Cicavčí/mechanický cieľ rapamycínu).....	- 32 -
3.3.4. <i>ICAM-1</i> (Intracellular cell adhesion molecule 1 – Intracelulárna adhézna molekula 1)	- 33 -
3.3.5. <i>VCAM-1</i> (Vascular cell adhesion molecule 1 – Cievna bunková adhézna molekula 1)	- 33 -
3.3.6. <i>COX-1 a COX-2</i> (Cyclooxygenase 1, Cyclooxygenase 2)	- 34 -
3.3.7. <i>FAK</i> (Focal adhesion kinase - Fokálna adhézna kináza)	- 35 -
3.3.8. <i>SAPK/JNK</i> (Stress-activated protein kinases/Jun amino-terminal kinases - Stresom aktivovaná proteínkináza/Jun amino-koncová kináza).....	- 36 -
3.3.9. <i>p38^{MAPK}</i> (p38 mitogen-activated protein kinases).....	- 37 -
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	- 38 -
4.1. MATERIÁL	- 38 -
4.1.1. Použité chemikálie	- 38 -
4.1.2. Použité roztoky.....	- 39 -
4.1.3. Použité protilátky	- 40 -
4.1.4. Biologický materiál	- 41 -
4.2. METÓDY	- 42 -
4.2.1. ELISA	- 42 -
4.2.2. Ovplyvnenie buniek a ich zber	- 44 -
4.2.3. Príprava bunkových lyzátov.....	- 45 -
4.2.4. Polyakrylamidová gélová elektroforéza (SDS-PAGE)	- 46 -

4.2.5.	<i>Western blotting a imunodetekcia proteínov na membráne</i>	- 47 -
4.2.6.	<i>Analýza buniek pomocou prietokovej cytometrie</i>	- 48 -
5.	VÝSLEDKY	- 50 -
5.1.	ELISA.....	- 50 -
5.2.	PRIETOKOVÁ CYTOMETRIA.....	- 54 -
5.3.	WESTERN BLOTTING.....	- 57 -
6.	DISKUSIA	- 61 -
7.	ZÁVER	- 65 -
8.	POUŽITÁ LITERATÚRA	- 66 -
8.1.	ZOZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ODKAZOV	- 71 -
9.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	- 72 -

1. CIELE PRÁCE

- Vypracovanie literárnej rešerše k téme práce, ktorá zahŕňa zápal, protizápalové účinky rastlín, kortikosteroidy a ich nepriaznivé účinky, NF- κ B dráhu a proteíny súvisiace so zápalovým účinkom
- Cieľom experimentálnej časti bolo stanoviť schopnosť rastlinných extraktov vyvolávať odpoveď na ľudských endotelových bunkách, u ktorých bol zápal umelo vyvolaný. Konkrétne bola pomocou ELISA metódy sledovaná hladina cytokínu IL-6 a adhéznej molekuly ICAM-1. Ďalej bol sledovaný mechanizmus účinku pomocou niektorých vybraných proteínov vyššie zmienených signálnych dráh, ktoré boli detekované Western blottingom a prietokovou cytometriou.

2. ÚVOD

Zápal je fylogeneticky aj ontogeneticky najstarší obranný mechanizmus. (Ferenčík, M. *et al.*, 2005) V najširšom slova zmysle ide o hostiteľskú reakciu na poranenie. Štyri staroveké hlavné známky zápalu sú sčervenanie, teplo, opuch a bolesť. (Winyard P., Willoughby D.A., 2003) Týmito mechanizmami sa naše telo bráni pred patogénmi ako sú parazity, baktérie, vírusy a iné škodlivé organizmy. (Yang Y. *et al.*, 2013) Tieto klinické známky zápalu sú makroskopické vyvrcholenie molekulárneho a bunkového procesu, z ktorých mnohé sa stali dobre definované v priebehu posledných 120 rokov a mnoho z nich môže byť reprodukováných vo vhodnom experimentálnom systéme *in vitro*. (Winyard P., Willoughby D.A., 2003) Ochorenia vyvolané chronickým zápalom, vrátane gastritídy, kolitídy, dermatitídy, reumatoidnej artritídy, pľúcnych ochorení, a diabetu typu II poškodzuje zdravie miliónom ľudí každý rok. Okrem toho je stále viac zrejmé, že zápal je kritickým iniciačným faktorom indukujúcim radu ďalších závažných ochorení, ako je rakovina, ateroskleróza, Alzheimerova choroba, kardiovaskulárne ochorenia, neurologické poruchy a pľúcne choroby. (Yang Y. *et al.*, 2013)

Makrofágy v rámci tkanív hrajú zásadnú úlohu pri začatí, vývoji a riešení zápalu. Makrofágy sú biele krvinky a ich úlohou je vyčistenie poškodených buniek a patogénov prostredníctvom fagocytózy a aktivovanie imunitných buniek ako sú neutrofilny, dendritické bunky, makrofágy a monocyty v reakcii na patogény a choroby. Môžu byť aktivované alebo deaktivované počas zápalových procesov v závislosti na vytvorených signálnych molekulách. Stimulačné signály zahŕňajú lipopolysacharid (LPS), cytokíny (interleukín-1 (IL-1) a tumor nekrotizujúci faktor (TNF α)) a ďalšie chemické mediátory a proteíny extracelulárnej matrix. (Yang Y. *et al.*, 2013)

Zápalové ochorenia sú v dnešnej dobe najčastejšie liečené prostredníctvom kortikosteroidov a boli napríklad používané na liečenie zápalového ochorenia čriev od konca 40. rokov 20. storočia. Viac ako 80 % pacientov môže akútne reagovať na liečbu týmito liekmi, aj keď približne 20 % môže byť odolných, iní sa stali na užívaní kortikosteroidov závislými kvôli potlačeniu aktivity ochorenia. Užívaním kortikosteroidov sa vytvára prostredie pre možné vážne a nezvratné problémy. Krátkodobé užívanie kortikosteroidov je spojené so všeobecne miernejšími vedľajšími účinkami (kožné problémy, hypertenzia, hyperglykémia, pankreatitída, hematologické a imunologické problémy) aj keď niekedy môže dôjsť ku klinicky významnejším vedľajším účinkom (napr. psychóza). Dlhodobé užívanie kortikosteroidov je

problematickejšie a môže byť spojené s vážnejšími následkami, ako je osteoporóza, aseptická nekróza kĺbov, problémy nadobličiek, gastrointestinálne, pečenné a oftalmologické problémy, hyperlipidémia a potlačenie rastu. Medzi vedľajšie účinky kortikosteroidov patrí aj napodobňovanie exogénneho hyperkortizolizmu, ktorý je podobný klinickému syndrómu Cushingovej choroby. (Buchman A.L., 2001)

Kvôli týmto mnohým nežiaducim účinkom kortikosteroidov sa momentálne hľadajú za tieto lieky náhrady. Jednou z možností sú aj prírodné produkty, ktoré predstavujú dôležitý zdroj terapeutických látok. Prírodné produkty slúžili ako zdroj liekov po celé stáročia, pričom približne polovica dnes používaných liečiv je odvodených práve z prírodných produktov. (Alwashili A. *et al.*, 2012; Unger C. *et al.*, 2012) Skúmanie biologickej aktivity tradičných liečiv v rámci kontrolovaných podmienok v laboratóriu, je možnosť ako nájsť ďalšie aplikácie, nové formulácie alebo hlavné štruktúry pre vývoj nových liekov. (Madlener S. *et al.*, 2009)

Objektom štúdia tejto práce je zistiť, či ponúknuté rastlinné extrakty vykazujú protizápalové účinky na ľudských endotelových bunkách. Súčasťou experimentálnej časti diplomovej práce je stanoviť schopnosť rastlinných extraktov znižovať umelo vyvolaný zápal v týchto bunkách s využitím metód ELISA, Western blotting a prietoková cytometria. Získané poznatky a výsledky z tejto práce by mohli prispieť k získaniu nových terapeutických cieľov.

Táto práca bola realizovaná v Laboratóriu rastových regulátorov a Oddelení chemickej biológie a genetiky CRH, Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Zápal

Zápal je fylogeneticky aj ontogeneticky najstarší obranný mechanizmus. Je to typická miestna odpoveď organizmu na poškodenie jeho buniek a tkanív. Z patofyziologického hľadiska je to súbor reťazových reakcií vyvolaných patogénnym podnetom, ktorý narušil homeostázu organizmu. Jeho názov je odvodený z latinského slova *inflammatus*, čo v preklade značí v plameňoch. Zápalová odpoveď pozostáva z nervovej, vaskulárnej, celulárnej a humorálnej zložky. (Ferenčík, M. *et al.*, 2005; Murphy H.S., 2011; Salát, D. *et al.*, 2008)

Už v prvom storočí nášho letopočtu rímsky encyklopedista Aulus Celsus popísal vo svojom diele *De Medicina* štyri hlavné znaky zápalu. Tými sú *rubor* (začervenanie), *calor* (zvýšenie miestnej teploty), *tumor* (opuch) a *dolor* (bolestivosť). Následne v 19. storočí Rudolf Virchow ako prvý popísal zápal ako reakciu na predchádzajúce poranenia tkaniva a ku štyrom hlavným znakom pridal piaty: *functio laesa* (strata alebo porušenie funkcie). (Murphy H.S., 2011)

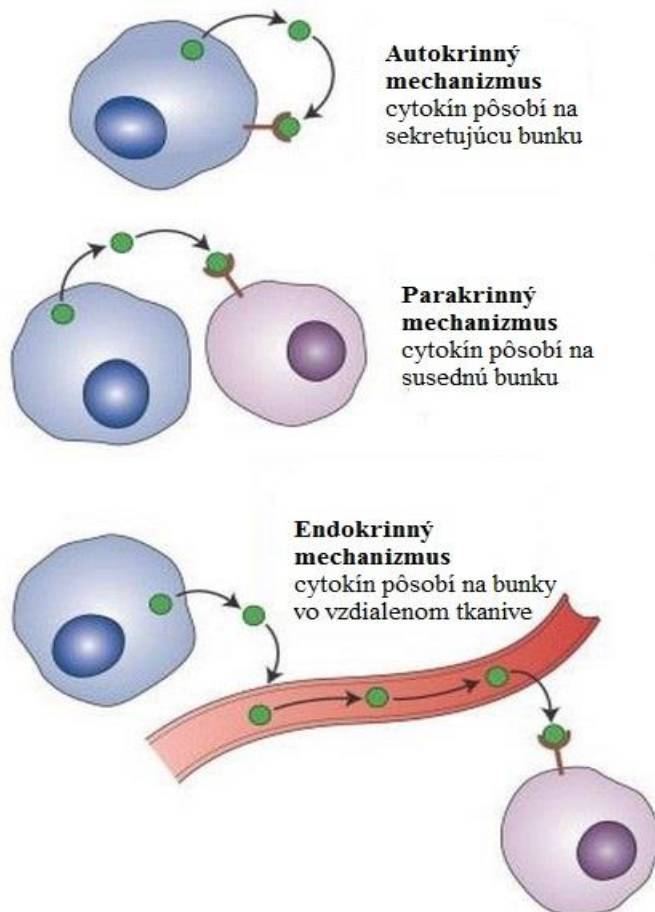
Odpoveď organizmu na poškodenie v závislosti na jeho rozsahu a dĺžke trvania môže byť lokálna (miestna) alebo systémová (celková). Týmito 5 znakmi sa klinicky prejavuje lokálny zápal. Typickým príznakom systémového zápalu je horúčka. Tento typ zápalu môže vyústiť až do zrušenia funkcií organizmu a spôsobiť smrť. (Ferenčík, M. *et al.*, 2005)

Medzi mechanizmy, ktoré vyvolávajú zápal patria mechanické faktory – odreniny, porezanie; fyzikálne faktory – popálenie; chemické faktory – jedy, žieraviny; metabolické faktory – nedostatok kyslíku, nedostatok proteínov alebo vitamínov; alebo biologické faktory – baktérie, plesne, vírusy a ich toxíny. (Ferenčík, M. *et al.*, 2005; Salát, D. *et al.*, 2008)

Zápal môže byť akútny alebo chronický. Akútny zápal má zvyčajne rýchly nástup a krátke trvanie, od niekoľkých minút po niekoľko dní, a vyznačuje sa sekréciou tekutiny a plazmových proteínov, prevažne akumuláciou neutrofilných leukocytov. Chronický zápal môže byť viac zákerný s prevažne dlhšou dobou trvania (dni až roky). Je pre neho typický príliv lymfocytov a makrofágov so spojenou cievnou proliferáciou a fibrózou (zjazvenie). Tieto dve základné formy spolu môžu koexistovať a mnoho variácií mení ich priebeh a histologický vzhl'ad. (Kumar, V. *et al.*, 2012)

Úlohou zápalu je likvidácia, zriedenie alebo odstránenie škodliviny z poškodeného tkaniva poprípade aspoň jej ohraničenie, aby sa ďalej nerozširovala, a súčasná oprava – zahojenie tkaniva. (Ferenčík, M. *et al.*, 2005)

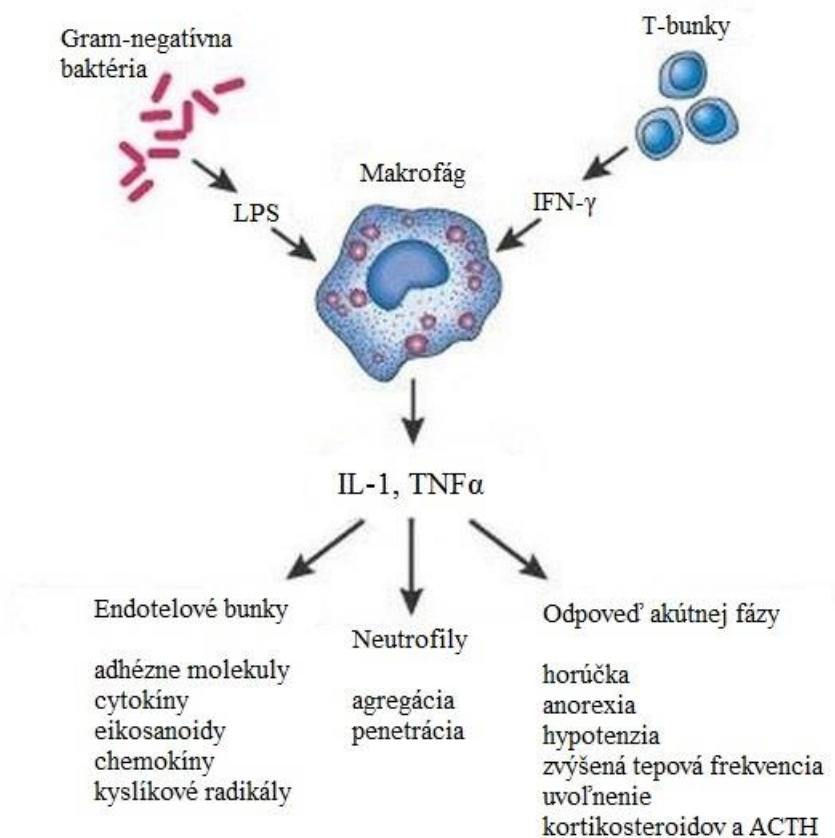
Zápalovej reakcie sa zúčastňuje veľa buniek patriacich do imunitného systému (predovšetkým neutrofil, makrofágy, T-lymfocyty, endotelové bunky ciev, eozinofily, mastocysty, trombocyty), mnohoenzymové systémy krvnej plazmy (hemokoagulačné, fibrinolytické, komplementové a kininové) a množstvo rôznych výkonných a regulačných molekúl podporujúcich alebo naopak tlmiacich priebeh zápalovej reakcie. Základnou bunkou akútneho zápalu, ktorá reguluje jeho vývoj a dostáva sa do miesta zápalu ako prvá, je neutrofil. Pri chronickom zápale sa uplatňujú hlavne makrofágy a T-lymfocyty. Priebeh zápalu regulujú zvláštne chemické látky – zápalové mediátory. Patrí medzi ne mnoho cytokínov vrátane interleukínov, rastových faktorov, kolóniu stimulujúcich faktorov, interferónov, chemokínov, prostaglandínov a proteínov akútnej fázy zápalu. Cytokíny produkované v miestach zápalu regulujú zápalové reakcie od počiatočných zmien v cievnej permeabilite k rozlíšeniu a obnoveniu integrity tkaniva. Tieto molekuly sú zápalové hormóny pôsobiace niekoľkými spôsobmi: autokrinným - sekretovaný produkt pôsobí cez receptor na sekretujúcu bunku, parakrinným - sekretované produkty pôsobia na blízke bunky a endokrinným - sekretované produkty sú prenášané prostredníctvom cievneho systému na vzdialené bunky (Obrázok 1). (Ferenčík, M. *et al.*, 2005; Murphy H.S., 2011)



Obrázok 1: Mechanizmy signalizácie cytokínov. V autokrinnom mechanizme pôsobia cytokíny na bunky, ktoré ich vytvorili. V Parakrinnom ovplyvňujú susedné bunky a v endokrinnom mechanizme pôsobia cytokíny prostredníctvom krvného riečišťa na vzdialené bunky (obrázok prevzatý a upravený z Murphy H.S., 2014)

Prostredníctvom produkcie cytokínov sú makrofágy rozhodujúce v organizovaní tkaniva zápalovej reakcie. Podľa toho, či zápal podporujú alebo tlmia, delíme cytokíny na prozápalové a protizápalové. Medzi prozápalové cytokíny patria TNF a IL-1 – sú to tzv. poplachové cytokíny, lebo spúšťajú akútny zápal. Priebeh zápalovej reakcie podporujú aj ďalšie interleukíny (IL-6, IL-11, IL-15, IL-18, IL-20), interferóny (INF α , INF β , INF γ) a chemokíny. Medzi protizápalové cytokíny radíme IL-4, IL-10, IL-13 a IL-19. Lipopolysacharid (LPS), molekula odvodená z vonkajšej bunkovej membrány gram-negatívnej baktérie, je jeden z najúčinnějších aktivátorov makrofágov. Taktiež aktivuje endotelové bunky a leukocyty. LPS viaže špecifické bunkové receptory buď priamo alebo po naviazaní sérového LPS-väzbového proteínu (LBP). To je silný podnet pre produkciu TNF α alebo interleukínov (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 a ďalších). Od makrofága odvodené cytokíny menia adhéziu medzi endotelovou bunkou a leukocytom

(TNF α), prijímanie leukocytov (IL-8), odpoveď akútnej fázy (IL-6, IL-1) a imunitné funkcie (IL-1, IL-6, IL-12). IL-1 a TNF α , produkované makrofágmi rovnako ako inými bunkami, hrajú ústrednú úlohu v rozvoji a amplifikácii zápalovej reakcie. Tieto cytokíny aktivujú endotelové bunky k expresnej adhézii molekúl a uvoľneniu cytokínov, chemokínov a reaktívnych foriem kyslíka (ROS). TNF α indukuje penetráciu a agregáciu neutrofilov. IL-1 a TNF α sú tiež medzi mediátormi horúčky, katabolizmu svalu, zmeny v syntéze bielkovín, hemodynamických účinkov spojených so zápalovými stavmi. Interferon- γ (IFN- γ), ďalší silný podnet pre aktiváciu makrofágov a produkciu cytokínov, je produkovaný T lymfocytmi ako súčasť imunitnej odpovede. Je taktiež syntetizovaný NK bunkami v primárnej hostiteľskej reakcii na vnútrobunkového patogéna (napr. *Listeria monocytogenes*) a niektoré vírusové infekcie. NK bunky migrujú do tkanív v miestach poranenia. Ak sú NK bunky vystavené IL-12 a TNF α , sú aktivované k produkcii IFN- γ . (Ferenčík, M. *et al.*, 2005; Murphy H.S., 2011)



Obrázok 2: Hlavná úloha interleukínu (IL)-1 a faktoru nádorovej nekrózy (TNF)- α v zápale. Lipopolysacharid (LPS) a interferón- γ (IFN- γ) aktivujú makrofágy k uvoľneniu zápalových cytokínov, hlavne IL-1 a TNF α , zodpovedných za priame a systémové zápalové reakcie. (obrázok prevzatý a upravený z Murphy H.S., 2011)

3.1.1. Fázy zápalu

Iniciačná fáza - k stimulácii endotelu a ďalších buniek dochádza už v prvých sekundách. Iniciačná zápalovej odpovede vedie k aktivácii rozpustných mediátorov a nábor zápalových buniek do tejto oblasti. Mediátory uvoľňované z poškodených mastocystov (žírných buniek), poškodených buniek a extracelulárnej matrix menia priepustnosť stien priľahlých ciev pre rozpustné molekuly a cirkulujúce zápalové bunky. Táto stereotypná okamžitá reakcia vedie k rýchlemu zaplaveniu poškodených tkanív tekutinou, koagulačnými faktormi, cytokínmi, chemokínmi, krvnými doštičkami, zápalovými bunkami a neutrofilmi. Tento celkový proces sa označuje ako akútna cievna reakcia. (Murphy H.S., 2011; Toman, M. *et al.*, 2009)

Amplifikačná fáza - zosilnenie závisí na rozsahu zranenia a aktivácii mediátorov ako sú kiníny a zložky komplementu. Do tejto oblasti sú prijímané ďalšie leukocyty a makrofágy. Akútna bunková reakcia sa objavuje po niekoľkých hodinách pri infekciách, ťažším alebo dlhšie trvajúcim poškodeniam tkanív a je charakterizovaná priestupom leukocytov (predovšetkým neutrofilov) do zápalového ložiska. Táto reakcia obvykle trvá niekoľko hodín až dní. Poškodenie endotelu je sprevádzané tvorbou fibrínu, prípadne aj krvnými výronmi. Pokiaľ je akútny fibrínový sekret odstránený skvapalnením a fagocytózou už v priebehu druhej fázy zápalu, dôjde väčšinou k obnoveniu pôvodnej štruktúry tkaniva – regenerácii. (Murphy H.S., 2011; Toman, M. *et al.*, 2009)

Deštrukčná fáza – prebieha za pomoci enzymatického štiepenia a fagocytózy, ktoré znižujú alebo odstraňujú nečistoty a infekčné organizmy. V rovnakej dobe sú tiež odstránené poškodené komponenty tkaniva. Chronická bunková reakcia nastáva až vtedy, keď indukujúci podnet (najčastejšie infekcia) trvá dostatočne dlho (niekoľko dní). Zloženie bunkového infiltrátu sa pri nej mení v prospech lymfocytov a makrofágov. (Murphy H.S., 2011; Toman, M. *et al.*, 2009)

Terminačná fáza - ukončenie zápalovej odpovede je sprostredkované vnútornými protizápalovými mechanizmami, ktoré obmedzujú poškodenie tkaniva a umožňujú opravy a návrat k normálnej fyziologickej funkcii. Ak nie je príčina odstránená do niekoľkých týždňov, v závislosti od charakteru zranenia a špecifickej zápalovej a opravnej reakcie sa môže vyvinúť v mieste normálneho tkaniva menej hodnotné spojivové tkanivo - jazva. Dôležité je, že vnútorné mechanizmy zápalového procesu sú ukončené, zabraňujú ďalšiemu prílivu tekutiny, mediátorov a zápalových

buniek, čím sa zabráni ďalšiemu poškodeniu normálnych buniek a tkanív. (Murphy H.S., 2011; Toman, M. *et al.*, 2009)

Prvé 2 fázy odpovedajú klinickému obrazu akútneho zápalu, zatiaľ čo ďalšie dve vytvárajú obraz chronického zápalu. Vo väčšine prípadov má akútny zápal charakter nešpecifickej obrannej reakcie, zatiaľ čo chronický zápal býva často sprevádzaný poškodením tkaniva. (Toman, M. *et al.*, 2009)

3.1.2. Možné liečby zápalu

Zápal je súčasťou liečebného procesu a medzi jeho hlavné znaky patrí aj bolesť. Bolesť predstavuje veľký problém pre verejné zdravie na celom svete, pričom chronická bolesť postihuje približne 27 % dospelaj populácie v Európe a viac ako 100 miliónov dospelých v Spojených štátoch. Neliečená akútna bolesť môže byť spojená so zvýšeným rizikom škodlivých zdravotných následkov (napr. spomalené hojenie rán, imunitná dysfunkcia, kardiovaskulárne problémy spojené s odpoveďou na stres a dýchacie ťažkosti ako je napr. aj zápal pľúc) a rozvojom chronickej bolesti. Okrem toho, nezmiernenie alebo neulavenie od silnej chronickej bolesti môže negatívne ovplyvniť kvalitu života jednotlivca. Medzi hlavné možnosti farmakologickej liečby bolesti patria nesteroidné protizápalové lieky (NSAID), ktoré pôsobia prostredníctvom inhibície cyklooxygenázy (COX) izoenzýmov a kortikosteroidy. (Brune K., Patrignani P., 2015)

3.1.2.1. Nesteroidné protizápalové lieky (NSAID)

Nesteroidné protizápalové lieky (NSAID) sú účinné protizápalové lieky a analgetiká a patria medzi najčastejšie používanú triedu liekov na celom svete. (Goldstein J.L., Cryer B., 2015) NSAID inhibujú aktivitu cyklooxygenázy (COX), kľúčový enzým pri syntéze prostaglandínu (PG) z kyseliny arachidónovej (AA). Je známe, že AA môže byť tiež metabolizovaná cez lipoxygenázovú a epoxygenázovú dráhu, pričom dôležitým prvkom je, že NSAID neblokujú tieto dráhy. V skutočnosti, blokovanie COX metabolizmu z AA môže presmerovať AA dole týmito alternatívnymi cestami a dokonca by to mohlo vysvetliť niektoré z negatívnych účinkov NSAID na rôzne tkanivá. (Mackey A.L., 2013)

Okrem dávky, terapeutickej činnosti a vedľajších účinkov vlastnosti NSAID závisia aj na ich absorpcii, distribúcii a eliminácii. Tieto farmakokinetické parametre sa môžu podstatne líšiť medzi rôznymi NSAID. Ako pri každej triede analgetík je kľúčovým faktorom pri výbere NSAID miera ich absorpcie. Tie s rýchlou absorpciou sú vhodnejšie pre väčšinu pacientov, najmä tých s ťažkou alebo akútnou bolesťou. Napríklad celecoxib, ktorý má pomerne pomalú rýchlosť absorpcie môže byť podávaný v bežných dávkach pre účinnú liečbu bolesti osteoartrózy, ale nie je ideálny pre liečbu akútnej bolesti, ktorá často vyžaduje nárazovú dávku pre dosiahnutie klinicky významnej analgézie a rýchlu absorpciu lieku. (Brune K., Patrignani P., 2015)

Ľudia by tieto lieky nemali užívať dlhodobo bez dozoru lekára keďže je tu možné riziko vzniku žalúdočných vredov a dokonca aj ťažkého, život ohrozujúceho krvácania. NSAID môžu takisto spôsobiť poškodenie obličiek a zvýšiť riziko mŕtvice a infarktu. Príkladom týchto liečiv sú aspirín, ibuprofén, naproxén alebo celecoxib. (Goldstein J.L., Cryer B., 2015)

3.1.2.2. Kortikosteroidy

Pojem steroidy je príliš rozsiahly na to, aby jednoducho opísal chemické zlúčeniny charakteristické ich viacnásobnou prstencovitou štruktúrou a obsahuje molekuly ako je cholesterol, pohlavné hormóny, a kortikosteroidy. Pod pojmom kortikosteroidy alebo steroidy v užšom slova zmysle rozumieme kortikosteroidy s 21 uhlíkovými atómami (glukokortikoidy a mineralokortikoidy) a 19 uhlíkovými atómami v molekule – androgény. Nadobličkové kortikosteroidy sa líšia svojimi glukokortikoidnými (regulácia metabolizmu sacharidov) a mineralokortikoidnými (regulácia metabolizmu minerálov) vlastnosťami, a preto sa historicky rozdeľujú na tieto 2 skupiny. (Buttgereit F et al., 2002) Hlavnými znakmi kortikosteroidov sú ovplyvnenie retencie sodíka, metabolizmu sacharidov (ukladanie glykogénu v pečeni, glukoneogenézu) a protizápalové účinky. Vplyv na metabolizmus glukózy a protizápalový účinok sú úzko späté. Práve to je dôvod, prečo sa názov glukokortikoidy začal používať pre lieky s výrazným protizápalovým účinkom. (Šteňová E., Koreň M., 2009)

Od ich objavenia v 40. rokoch 20. storočia, kedy boli prvýkrát použité doktorom Philipom Henchom pri liečbe reumatoidnej artritídy ako protizápalové lieky, sa stali kortikosteroidy jedným z najčastejšie používaných liečebných procesov pre rôzne

zápalové a autoimunitné choroby. Používajú sa ako náhradná terapia pri adrenálnej insuficiencii (nedostatočnosti nadobličiek) vo fyziologických dávkach, rovnako ako v suprafyziologických dávkach u rôznych dermatologických, očných, reumatologických, pľúcnych, hematologických a gastrointestinálnych porúch. V respiračnej oblasti sú kortikosteroidy používané na liečbu akútnej exacerbácie chronickej obštrukčnej choroby pľúc (COPD) a závažnej nekontrolovateľnej astmy, ako aj pri zápalových pľúcnych ochoreniach, ako je hypersenzitívna pneumonitída a imunitne sprostredkovaná vaskulitída. To sú len niektoré z mnohých dôležitých využití tejto skupiny liekov, ktoré sú využívané takmer vo všetkých oblastiach medicíny. (Goulding N.J., Flower, R.J., 2001; Liu D. *et al.*, 2013)

V dnešnej dobe sa v praxi používajú synteticky pripravované glukokortikoidy. Tým chýbajú mineralokortikoidné vlastnosti, ale od glukokortikoidných vlastností sa nepodarilo oddeliť protizápalový a imunosupresívny účinok. U všetkých synteticky pripravených glukokortikoidov platí, že čím väčšiu majú protizápalovú a imunosupresívnu aktivitu, tým väčší majú aj ich glukokortikoidný efekt (Tabuľka 1). (Špalek P., 2011) Pravdepodobne najčastejšie používané syntetické kortikosteroidy v praxi sú prednizón, prednizolón a metylprednizolón, ktoré majú vysokú glukokortikoidnú aktivitu vzhľadom k mineralokortikoidnej aktivite a relatívne najmenšie možné riziko vzniku vedľajších účinkov. Dexametazón, ktorý má taktiež minimálnu mineralokortikoidnú aktivitu a výrazný protizápalový účinok, nie je vhodný na dlhodobejšiu liečbu vzhľadom k dlhému biologickému polčasu a vysokému riziku vzniku nežiaducich účinkov a užíva sa len krátkodobo pri veľmi vážnych, akútnych stavoch. Kortizón a hydrokortizón nie sú vhodné pre ich najnižšiu glukokortikoidnú aktivitu a nízky polčas rozpadu. (Deshmukh C.T., 2007; Liu D. *et al.*, 2013; Špalek P., 2011)

Tabuľka 1: Prehľad syntetických glukokortikoidov a ich vlastností. Liečebný potenciál sa udáva ekvivalentom dávky daného lieku v porovnaní s hydrokortizónom. (Liu D. *et al.*, 2013; Šteňová E., Koreň M., 2009)

Syntetické kortikosteroidy	Ekvivalentná protizápalová dávka (mg)	Relatívna glukokortikoidná aktivita	Relatívna mineralokortikoidná aktivita	Biologický polčas (hodiny)
Hydrokortizón	20	1,0	1,0	8 - 12
Kortizón	25	0,8	0,8	8 - 12
Prednizón	5	4,0	0,8	16 - 24
Prednizolón	5	4,0	0,8	16 - 24
Metylprednizolón	4	5,0	0,5	16 - 40
Triamcinolón	4	5,0	0,0	12 - 36
Betametazón	0,6	30,0	0,0	36 - 54
Dexametazón	0,75	30,0	0,0	36 - 54
Fludrokortizón	1,2	15,0	200	18 - 36

Kortikosteroidy majú viacero nežiaducich účinkov, ktoré vyvolávajú ďalšie nežiaduce vedľajšie klinické prejavy. Tieto nežiaduce účinky kortikosteroidov závisia od biologického polčasu danej látky, spôsobu podania a množstva dávky daného liečiva ako aj od doby trvania liečby (Tabuľka 2). (Špalek P., 2011)

Tabuľka 2: Nežiaduce účinky glukokortikoidov s možnými klinickými následkami (Špalek P., 2011)

Nežiaduci účinok	Klinický následok
regulujúci vplyv na mobilizáciu a ukladanie tukov	cushingoidný syndróm, nadváha
zvýšenie glukoneogenézy z bielkovín	steroidný diabetes
katabolický účinok na metabolizmus bielkovín	osteoporóza, myopatia
tlmivý vplyv na os hypotalamus - hypofýza	útlm nadobličkových funkcií, nedostatok sexuálnych hormónov
vplyv na činnosť CNS	poruchy nálady, depresia, mánia, poruchy spánku
zníženie permeability a stabilizácia membrán	prokoagulačný stav, arteriálna hypertenzia, katarakta, glaukóm, poruchy menštruácie, myopatia

3.2. Prírodné liečivé produkty

Prírodné produkty predstavujú dôležitý zdroj terapeutických látok. Veľkou výhodou prírodných produktov je, že obsahujú obrovskú rozmanitosť zložitých štruktúr, zatiaľ čo syntetické knižnice zvyčajne vykazujú podstatne menej rozmanitosti. (Koehn F.E. 2005; Unger C. *et al.*, 2012)

Prírodné produkty slúžili ako zdroj liekov po celé stáročia, pričom v priebehu rokov významne prispeli k rozvoju moderných liekov. Viac ako 60 % konvenčných liekov používaných v západnej medicíne je odvodených z prírodných látok. Niektoré z najúčinnějších liekov (napr. aspirín, chinín a rôzne antibiotiká) pochádza z rastlín, mikroorganizmov a morských organizmov a veľké množstvo potenciálne hodnotných prírodných látok ostáva stále ešte k objaveniu. (Alwashili A. *et al.*, 2012; Calixto J.B. *et al.*, 2003; Madlener S. *et al.*, 2009; Unger C. *et al.*, 2012) Okrem toho približne 80% svetovej populácie sa spolieha na liečivé rastliny pri ich primárnej zdravotnej starostlivosti, predovšetkým v menej rozvinutých krajinách kde hrá tradičná medicína hlavnú úlohu v zdravotníctve. (Alwashili A. *et al.*, 2012; Unger C. *et al.*, 2012) Rastúci záujem o tradičné lieky na rastlinnej báze (napr. Ajurvéda a čínska tradičná medicína) ako potenciálnych zdrojov nových liečiv je čiastočne aj preto, že veľa bežných liekov pochádza práve z rastlinných zdrojov. (Madlener S. *et al.*, 2009) Veľké množstvo rastlinných liečiv má vynikajúce liečivé hodnoty a sú používané na liečenie rôznych chorôb. V ľudovom liečiteľstve sa so značným úspechom používajú rôzne pôvodné lieky samostatne alebo v kombinovanej forme pre liečenie rôznych typov zápalových a artritických stavov. (Abad M.J. *et al.*, 1996) Napríklad bolo preukázané, že zázvor a účinná látka z neho získaná, [6]-gingerol, majú antibakteriálne a antiangiogenické účinky *in vitro* a *in vivo*. Ďalej, rastlinné extrakty často obsahujú rôzne zlúčeniny (napr. polyhydroxyfenol kyseliny gallovej), ktoré majú vysokú zachytávajúcu aktivitu radikálnych alebo reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Tieto látky môžu mať významné účinky na zdravie, pretože radikály a ROS sú schopné vážne poškodiť proteíny a nukleové kyseliny, čo vedie k poraneniu buniek alebo tkanív. (Madlener S. *et al.*, 2009)

Prírodné produkty sú cenným zdrojom nových bioaktívnych sekundárnych metabolitov. Z tohto dôvodu je dôležité identifikovať prírodné produkty, ktoré majú farmakologickú alebo biologickú aktivitu pre použitie vo farmaceutických liečivách. (Jang M. *et al.*, 2013) Hoci pravdepodobnosť nájdenia nového chemotypu zo

suchozemských rastlín je nízka, liečivá rastlinného pôvodu často preukazujú nové mechanizmy pôsobenia. Preto je potrebné preskúmať bioaktivitu sekundárnych metabolitov rastlín a tiež by mali byť testované *in vivo* surové extrakty, ktoré vykazujú presvedčivé *in vitro* výsledky. Screening prírodných produktov zahŕňa vysokú pravdepodobnosť duplikácie, tzv. izolovaná aktívna zlúčenina môže byť už známa a preto nemôže byť patentovaná. Toto a problém spoľahlivého prístupu a dodania robia vývoj liečiv z prírodných zdrojov menej atraktívny pre farmaceutický priemysel. V dôsledku toho ostalo štúdium liečivých a iných rastlín alebo organizmov na akademických inštitúciách. (Unger C. *et al.*, 2012)

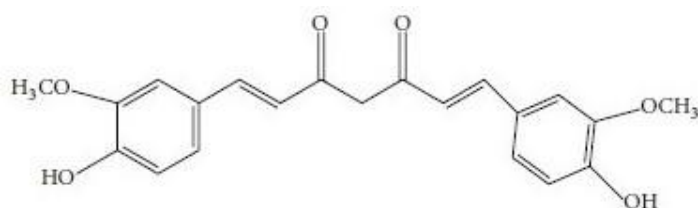
3.2.1. Zlúčeniny rastlinného pôvodu s protizápalovým účinkom

Bolo preukázané, že obrovské množstvo zlúčenín s rôznymi chemickými štruktúrami izolovaných z rastlín vykazuje protizápalovú aktivitu. Perez vo svojom článku z roku 2001 uvádza viac ako 300 zlúčenín s protizápalovým účinkom izolovaných z rastlín. Medzi nimi aj kurkumín a kapsaicín. Kurkumín, resveratrol, kapsaicín a kolchicín patria medzi popredné látky s protizápalovými účinkami, ktoré boli v posledných rokoch u ľudí testované. (Fürst R., Zündorf I., 2014; Perez G.R.M., 2001)

3.2.1.1. Kurkumín

Kurkumín je prirodzene sa vyskytujúci žltý pigment prítomný v podzemku rastliny *Curcuma longa* L.. (Calixto J.B. *et al.*, 2003) *Curcuma longa* L. je trváca bylina z rodiny *Zingiberaceae* hojne pestovaná v tropických oblastiach južnej Ázie. (Ammon H.P., Wahl M.A., 1991; Calixto J.B. *et al.*, 2003) Indické korenie kurkuma bolo používané po stáročia v ajurvédskej medicíne proti zápalovým ochoreniam a dodnes sa používa ako farbivo a ochucovadlo jedál. (Ammon H.P., Wahl M.A., 1991; Fürst R., Zündorf I., 2014; Gukovsky I. *et al.*, 2003) Kurkumín bol prvýkrát izolovaný už v roku 1815 avšak v jeho znečistenej forme, následne bola jeho chemická štruktúra a syntéza potvrdená Lampem v roku 1910 a prvá štúdia o použití kurkumínu na ľudské ochorenia bola publikovaná v roku 1937. (Jurenka J.S., 2009; Zhou H. *et al.*, 2011) Z chemického hľadiska sa jedná o bis- α,β -nenasýtený β -diketón s názvom (E,E)-1,7,bis(4-hydroxy-3-metoxyfenyl)-1,6-heptadien-3,5-dión. (Zhou H. *et al.*, 2011)

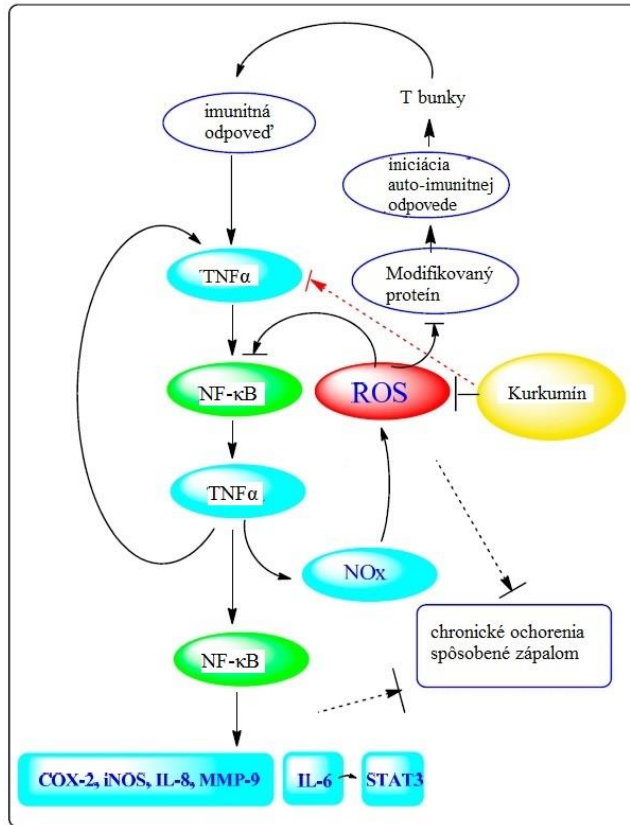
Aktívnou zložkou kurkumínu je diferuloylmetán, hydrofóbny polyfenol. (Epstein J. *et al.*, 2010) Patrí medzi najčastejšie sledované prírodné zlúčeniny. Kurkumín prejavuje protizápalové, antioxidačné, protirakovinové/proapoptotické, hepatoprotektívne a antibakteriálne účinky. (Calixto J.B. *et al.*, 2003; Fürst R., Zündorf I., 2014) V rámci protizápalových účinkov bola u kurkumínu zaznamenaná inhibícia dôležitých prozápalových signálnych kaskád (napríklad, NF κ B- MAPK-, COX- a LOX- dráha), znižovanie expresie sekrécie niektorých cytokínov (TNF α , IL-1 β , a IL-6) a blokovanie expresie bunkových adhézných molekúl (napr. ICAM-1), ktoré sú nevyhnutné pre interakciu leukocytov s endotelovými bunkami. (Fürst R., Zündorf I., 2014; Natarajan C., Bright J.J., 2002)



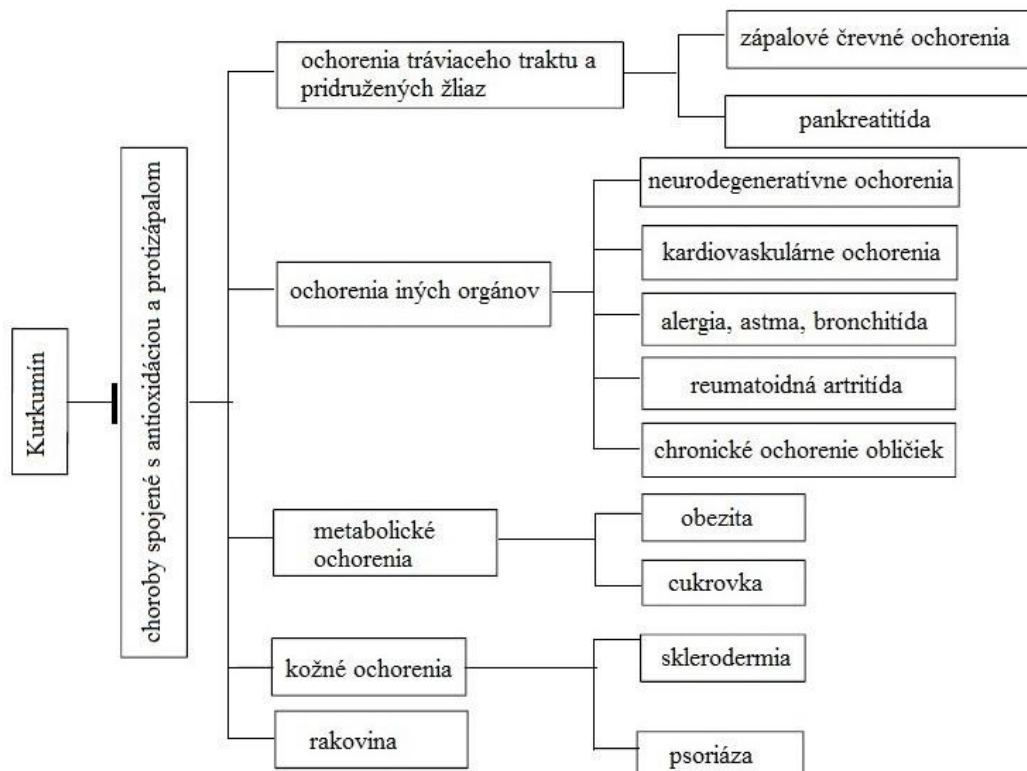
Obrázok 3: Chemická štruktúra kurkumínu (Fürst R., Zündorf I., 2014)

Bolo navrhnutých množstvo mechanizmov, ktorými kurkumín môže prejavovať protizápalovú aktivitu (Obrázok 4). Kurkumín môže potlačiť prozápalové cesty súvisiace s väčšinou chronických ochorení a blokovat produkciu TNF a signalizáciu bunkami sprostredkovanú TNF v rôznych typoch buniek. Z *in vitro* a *in vivo* štúdií je známe, že kurkumín môže byť tiež TNF blokátor pri naviazaní sa priamo na TNF. Vzhľadom k svojej chemickej štruktúre môže kurkumín pôsobiť ako tzv. prirodzený „čistič“ voľných radikálov. Kurkumín môže znížiť uvoľňovanie rôznych interleukínov prostredníctvom NF- κ B. (He Y. *et al.*, 2015)

Kurkumín je používaný ako liek na prevenciu a liečbu mnohých ochorení orgánov a tkanív, z ktorých väčšina je spojených so zápalom a oxidačným stresom. Kurkumín zmierňuje oxidačný stres, zápal u chronických ochorení a reguluje zápalové a prozápalové cesty súvisiace s väčšinou chronických ochorení (Obrázok 5). (He Y. *et al.*, 2015)



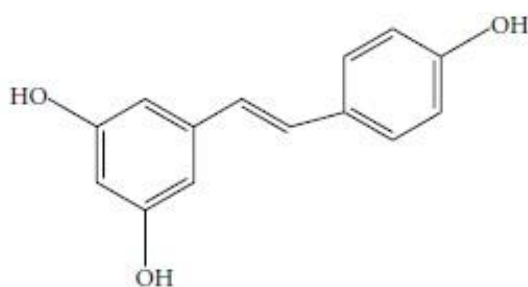
Obrázok 4: Vzťah medzi ROS, chronickým zápalovým ochorením a antioxidačnými vlastnosťami kurkumínu. (Obrázok prevzatý a upravený z He Y. *et al.*, 2015)



Obrázok 5: Hlavné chronické ochorenia, proti ktorým kurkumín pôsobí. (Obrázok prevzatý a upravený z He Y. *et al.*, 2015)

3.2.1.2. Resveratrol

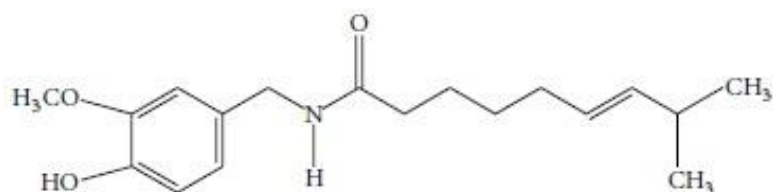
Resveratrol (5-[(E)-2-(4-hydroxyfenyl)etenyl]benzén-1,3-diol alebo trans-3,4',5-trihydroxystilbén) je v prírode sa vyskytujúci polyfenolický fytoalexín. (Fu D.G., 2015; Fürst R., Zündorf I., 2014; Hosseini A., Ghorbani A., 2015) Resveratrol bol známy po stáročia v ázijskej medicíne vo forme prášku z koreňa z rastliny *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. ako protizápalový liek. (Fu D.G., 2015) Môžeme ho nájsť v rôznych rastlinách a potravinových výrobkoch, napríklad v šupke hrozna a následne aj v červenom víne, orechoch, rôznych bobuliach a inom ovocí alebo liečivých rastlinách. (Calixto J.B. *et al.*, 2003; Fu D.G., 2015; Fürst R., Zündorf I., 2014; Zagotta I. *et al.*, 2015) Resveratrol patrí k podtypu fytochemických látok zvaných flavonoidy, ktoré sú syntetizované v rastlinách. Resveratrol je fytoalexín používaný rastlinami na obranu pred hubovými a inými formami agresie. (Fu D.G., 2015) Bolo zistené, že spolu s kurkumínom má resveratrol množstvo pre farmakológiu zaujímavých účinkov, napríklad má protizápalové, protialergické, antioxidantné, protinádorové/proapoptotické, chemopreventívne a antimikrobiálne vlastnosti a taktiež spomaľuje zrážanie krvných doštičiek. V súvislosti s chorobami spájanými so zápalom bolo na resveratrol vykonaných mnoho, pre neho priaznivo pôsobiacich, skúšok. Rovnako je známe, že resveratrol inhibuje NFκB-dráhu, COX-1 aj COX-2 enzýmy. (Calixto J.B. *et al.*, 2003; Fürst R., Zündorf I., 2014)



Obrázok 6: Chemická štruktúra resveratrolu (Fürst R., Zündorf I., 2014)

3.2.1.3. Kapsaicín

Kapsaicín (trans-8-matyl-N-vanillyl-6-nonenamid) je v prírode sa bežne vyskytujúci alkaloid pochádzajúci z rastlín z rodu *Capsicum*, lepšie známych ako čili papričky, a je zodpovedný za typickú ostrosť/pikantnosť týchto plodov. Je členom zlúčenín z rodiny vanilloidov (ako napríklad aj vanilín z vanilky, eugenol z bobkového listu, klinčeku alebo zingerón zo zázvoru). Ako aj iné vanilloidy aj kapsaicín má benzénové jadro a dlhý hydrofóbny uhlíkový postranný reťazec s polárnou amidovou skupinou. Kapsaicín je hydrofóbny, bezfarebný kryštalický alkaloid bez zápachu so sumárnym vzorcom $C_{18}H_{27}NO_3$. (Fürst R., Zündorf I., 2014; O'Neill J. *et al.*, 2012) Mnohé farmaceutické štúdie a štúdie výskumu bolesti poukazujú na viaceré účinky kapsaicínu v rôznych fyziologických systémoch. (O'Neill J. *et al.*, 2012) V tradičnej medicíne sa používa na zmiernenie bolesti svalov a kĺbov a momentálne aj proti neuropatickej bolesti a taktiež boli objavené jeho analgetické účinky. (Haanpää M., Treede R.D., 2012) V niektorých štúdiách sa okrem bolesti spomína aj protizápalový potenciál kapsaicínu. Bolo zaznamenané, že kapsaicín inhibuje COX-2 aktivitu, iNOS expresiu a taktiež blokuje LPS-idukované odstránenie $I\kappa B\alpha$, čím inaktivuje NF- κB dráhu v makrofágoch. (Kim C.S. *et al.*, 2003)

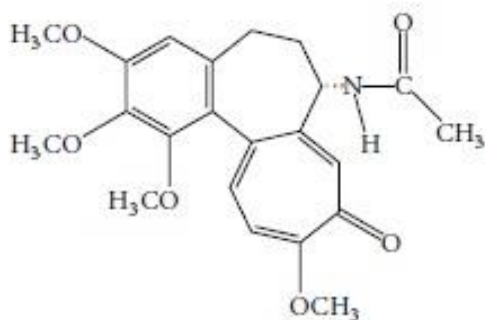


Obrázok 7: Chemická štruktúra kapsaicínu (Fürst R., Zündorf I., 2014)

3.2.1.4. Kolchicín

Kolchicín (N-[(7S)-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-6,7-dihydro-5H-benzo[a]heptalen-7-yl]acetamid), derivát tropolónu, je hlavným alkaloidom rastliny *Colchicum autumnale* L. (*Colchicaceae*), bežne známej ako Ocún jesenný. (Fürst R., Zündorf I., 2014) Už od dávnych čias sa extrakty z tejto rastliny používali v liečiteľstve ako protizápalové liečivá na akútnu artritídu alebo proti dne. V súčasnej dobe sa používa na liečbu familiárnej stredomorskej horúčky a recidivujúcej perikarditídy. (Imazio M. *et al.*, 2005) Je známe, že kolchicín inhibuje delenie a proliferáciu buniek tým, že narúša mitotické

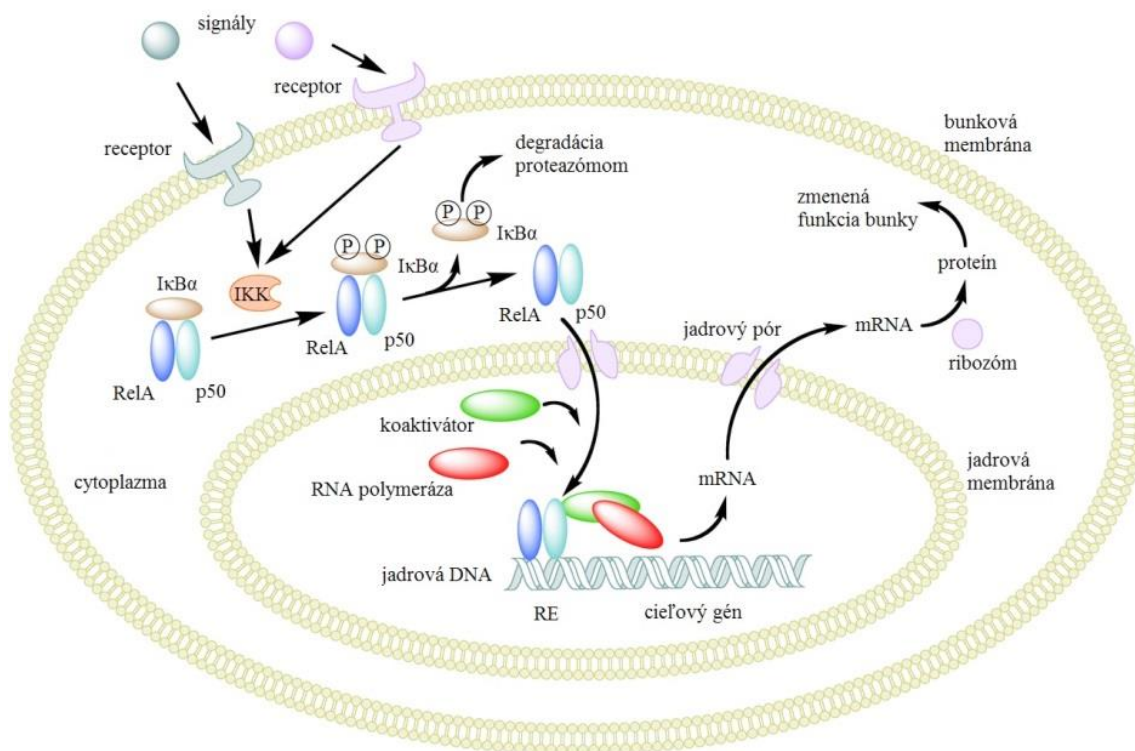
vretienko. V závislosti na dávke ovplyvňuje dynamiku mikrotubulov inhibíciou procesu skladby mikrotubulov tým, že tvorí komplex tubulín-kolchicín väzbu s β -tubulínom. (Stanton R.A. *et al.*, 2011) Taktiež inhibuje syntézu TNF α makrofágmi a znižuje povrchovú expresiu TNF α receptora na makrofágoch a endotelových bunkách. (Molad Y.M.D., 2002)



Obrázok 8: Chemická štruktúra kolchicínu (Fürst R., Zündorf I., 2014)

3.3. NF- κ B a jeho dráha a proteíny súvisiace so zápalovým účinkom

Rel alebo NF- κ B proteíny patria do rodiny transkripčných faktorov, ktoré sa podieľajú na regulácii veľkého počtu génov kontrolujúcich rôzne aspekty imunitnej alebo zápalovej reakcie, vývojových procesov, bunkového rastu alebo apoptózy. Okrem toho sú tieto transkripčné faktory trvalo aktívne v mnohých chorobných stavoch, vrátane rakoviny, artritídy, chronického zápalu, astmy, neurodegeneratívnych ochorení a ochorení srdca. (Boston University (25.6.2015)) NF- κ B rodina transkripčných faktorov sa skladá z piatich členov: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), c-Rel, a RelB, ktoré sa špecificky viažu ku κ B motívom lokalizovaných v promotoroch alebo zosilňovačoch cieľových génov a regulujú transkripciu prostredníctvom náboru koaktivátorov a korepresorov. Všetky z týchto proteínov zdieľa vysoko konzervovaný približne 300 aminokyselinový homológny región známy ako Rel homológna doména (RHD) nachádzajúca sa na N-konci. Táto doména je zodpovedná za väzbu s DNA, homo- a heterodimerizáciu a interakciu s inhibičnými proteínmi z I κ B rodiny. (Hayden M.S., Ghosh S., 2008; Sun S.C., 2012; Thompson J.E. *et al.*, 1995; Whiteside S.T. *et al.*, 1997) Sú známe 2 dráhy vedúce k aktivácii NF- κ B nazývané kanonická alebo nekanonická dráha, respektíve klasická alebo alternatívna. Spoločným regulačným krokom na hornom konci (upstream) v oboch týchto dráhach je aktivácia I κ B kinázového (IKK) komplexu. (Gilmore T.D., 2006) Ubikvitinácia hrá zásadnú úlohu v regulácii NF- κ B dráhy. Vo väčšine buniek je NF- κ B udržiavaná v cytoplazme v neaktívnom stave s komplexe s I κ B proteínom. Po aktivácii, ktorej predchádza naviazanie napríklad IL-1 alebo TNF α na svoje receptory IL-1R a TNFR. Tým sú následne spustené odlišné signálne kaskády, ktoré sa zbiehajú na TGF- β aktivovanej kináze 1 (TAK1), ktorá fosforyluje a aktivuje IKK. Potom dochádza prostredníctvom aktivovaného IKK komplexu ku fosforylácii I κ B. Fosforylovaný I κ B je následne ubikvitinovaný a degradovaný 26S proteazómom, čo umožňuje NF- κ B translokáciu do jadra, kde reguluje expresiu veľkého množstva génov. (Chen J., Chen Z.J., 2013; Senftleben U. *et al.*, 2001)



Obrázok 9: Na obrázku môžeme vidieť NF-κB heterodiméry zložené konkrétne z RelA a p50 proteínov. V neaktívnom stave sa NF-κB nachádza v cytoplazme v komplexe s inhibičným proteínom IκBα. Cez medziprodukt integrálnych membránových receptorov môžu rôzne extracelulárne signály aktivovať enzým IKK. IKK najprv fosforyluje proteín IκBα, čo má za následok ubiquitináciu a disociáciu IκBα od NF-κB a následnú degradáciu IκBα proteazómom. Aktivovaná NF-κB je transportovaná do jadra, kde sa viaže na špecifické DNA sekvencie tzv. regulačné elementy (RE). DNA/NF-κB komplex potom regrutuje ďalšie proteíny, ako sú koaktivátory a RNA polymeráza, ktorá prepisuje DNA do mRNA, následne je mRNA preložená do proteínu, čo má za následok zmenu funkcie buniek. (Obrázok prevzatý a upravený z Indonesian Neurobehavioural Science (8.7.2015))

3.3.1. IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha – nukleárny faktor kappa zosil'ovaču ľahkého polypeptidového génu v B-bunkovom inhibítore, alfa)

IκBα je regulačný proteín patriaci do rodiny IκB cytoplazmatických proteínov. IκBα proteín inhibuje NF-κB aktivitu maskovaním signálov jadrovej lokalizácie (NLS) NF-κB proteínov a udržiava NF-κB v cytoplazme. (Liu L. *et al.*, 1998; Vancurova I., Vancura A., 2012) K aktivácii dochádza prostredníctvom fosforylácie IκBα na dvoch miestach nachádzajúcich sa blízko N-konca a to na Ser³² a Ser³⁶. Fosforylovaný IκBα je

následne ubikvitinovaný na Lys²¹ a Lys²² a odchádza k proteazómom sprostredkovanej degradácii. Odstránený IκBα odmaskuje NLS z NF-κB a umožní tak translokáciu do jadra. (Jacobs M.D., Harrison S.C., 1998) Degradácii IκBα a aktivácii NF-κB zabraňujú peptidové inhibítory proteazómu. (Traenckner E.B. *et al.*, 1995) Fosforylácia IκBα je aktivovaná extracelulárnymi signálmi, napr. zápalovými cytokínmi, rastovými faktormi a chemokínmi. (Karin M., Ben-Neriah Y., 2000) IκBα v jadre potláča transkripciu prozápalových a antiapoptických génov závislých na NF-κB. (Vancurova I., Vancura A., 2012)

3.3.2. IKKα/β (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha/beta – Inhibitor jadrového faktoru kappa-B kinázy podjednotka alfa/beta)

NF-κB/Rel transkripčné faktory sú prítomné v cytozole v neaktívnom stave v komplexe s inhibičnými IκB proteínmi. (Beg A.A., Baldwin A.S. Jr., 1993) Fosforyláciou IκB dôjde k označeniu IκB pre zničenie, čím dôjde k zmierneniu ich inhibičného účinku na NF-κB. Cytokín-aktivujúci proteínkinázový komplex IKK (IκB kináza) fosforyluje IκB inhibičné proteíny, čo spôsobuje ich degradáciu a aktiváciu transkripčného faktora NF-κB, hlavného aktivátora zápalových reakcií. (Delhase M. *et al.*, 1999; DiDonato J.A. *et al.*, 1997) IKK kinázový komplex je kľúčovým prvkom v NF-κB kaskáde. Tento komplex je tvorený IKKα a IKKβ, ktoré slúžia ako katalytické podjednotky kinázového komplexu, zatiaľ čo tretia polypeptidová podjednotka IKKγ má regulačnú funkciu. IKKα a IKKβ majú veľmi podobnú primárnu štruktúru (vyše 50% identickú sekvenciu) a obsahujú proteínkinázové domény na ich N-konci a motívy leucínových zipov (ich úloha je umožniť homo- alebo heterodimerizáciu týchto kináz) a helix-otočka-helix (ich funkcia je v modulovaní IKK kinázovej aktivity) v ich C-koncových častiach. IKKγ neobsahuje rozpoznávaciu katalytickú doménu ale je zložená predovšetkým z 3 veľkých α-helikálnych regiónov. (Israel A., 2010; Karin M., 1999) IκB kináza fosforyluje IκBα a IκBβ v miestach sprostredkujúcich ich ubikvitinizáciu a degradáciu. Aktivita IKK je rýchlo stimulovaná IL-1 a TNFα a závisí na jeho fosforylizácii. (Zandi E. *et al.*, 1997) Biochemická analýza ukazuje, že prevládajúca forma IKK je heterodimér IKKα:IKKβ spojený s dimérom alebo trimérom IKKγ. (Karin M., 1999) Na to aby sa IKKα a IKKβ stali aktívnymi potrebujú byť fosforylované na 2 serínových zvyškoch (Ser¹⁷⁷ a

Ser¹⁸¹ pre IKK β a Ser¹⁷⁶ a Ser¹⁸⁰ pre IKK α) lokalizovaných v aktivačnej slučke. Táto fosforylácia vedie ku konformačným zmenám a kinázovej aktivite. (Israel A., 2010)

3.3.3. mTOR (The mammalian/mechanistic target of rapamycin – Cicavčí/mechanický cieľ rapamycínu)

mTOR je veľká (2549 aminokyselín), všadeprítomne exprimovaná multi-efektorová serín/treonín kináza patriaca do rodiny kináz príbuzných s fosfatidylinositol-3-kinázou (PIKK), ktorá zahŕňa veľké proteíny umožňujúce organizmom vyrovnať sa s metabolickým, genetickým stresom a stresom zo životného prostredia. (Hoeffler C.A., Klann E., 2010; Laplante M., Sabatini D.M., 2012; Zoncu R. *et al.*, 2011) Je vysoko konzervovaným homológom kvasinkového proteínu, TOR (target of rapamycin). Rapamycín, lipofilný makrolid, bol izolovaný z pôdnej baktérie *Streptomyces hygroscopicus* nájdenej vo vzorke pôdy z Veľkonočného ostrova. (Hoeffler C.A., Klann E., 2010) Táto zlúčenina účinne inhibuje rast kvasiniek, rovnako ako proliferáciu niekoľkých typov cicavčích buniek, vrátane B a T lymfocytov. (Gingras A.C. *et al.*, 2001) mTOR pôsobí ako centrálny regulátor bunkového rastu a metabolizmu a deregulácia jeho signálnej dráhy je spájaná so starnutím a rozvojom ľudských ochorení (rakoviny, obezity, cukrovky 2. typu a neurodegenerácie). (Laplante M., Sabatini D.M., 2013) mTOR interaguje s niekoľkými proteínmi za vzniku 2 odlišných komplexov. mTOR komplex 1 (mTORC1) sa skladá z mTOR, Raptor, G β L a DEPTOR a mTOR komplex 2 (mTORC2) sa skladá z mTOR, Rictor, G β L, Sin1, PRR5/Protor-1, a DEPTOR. Mnoho funkcií mTORC1 je vysoko citlivých k rapamycínu. Je to rastový regulátor, ktorý integruje s rôznymi podnetmi zo životného prostredia, vrátane rastových faktorov, energetických hladín, bunkového stresu a aminokyselín. Spája tieto signály a podporuje bunkový rast fosforyláciou substrátov, ktoré zvyšujú anabolické procesy, ako je translácia mRNA a syntéza lipidov, alebo obmedzuje katabolické procesy ako napr. autofágia. (Cell Signaling 1 (20.6.2015); Laplante M., Sabatini D.M., 2012) mTORC2 podporuje bunkové prežitie aktiváciou Akt, reguluje cytoskeletálnu dynamiku aktiváciou PKC α a kontroluje iónový transport a rast prostredníctvom SGK1 fosforylácie. mTOR hrá kľúčovú úlohu v raste buniek a homeostázy a jeho aberantná (abnormálna) signalizácia sa podieľa na mnohých chorobných stavoch, vrátane rakoviny, kardiovaskulárnych chorôb a diabetes. (Cell Signaling 1 (20.6.2015); Laplante M., Sabatini D.M., 2013)

3.3.4. ICAM-1 (Intracellular cell adhesion molecule 1 – Intracelulárna adhézna molekula 1)

Intercelulárna adhézna molekula 1 (ICAM-1, tiež nazývaná CD54) je silne glykozylovaný, jednoreťazcový proteín patriaci do superrodiny imunoglobulínov (IgSF) adhézných molekúl. ICAM-1 je exprimovaný konštitutívne v nízkych hladinách na lymfocytoch, vaskulárnom endotele a rôznych iných typoch buniek. *In vivo* sú exprimované vysoké hladiny v tkanivách podieľajúcich sa na zápalovej odpovedi. *In vitro*, je expresia ICAM-1 rýchlo zvýšená zápalovými cytokínmi, ako sú interferóny, IL-1, a faktorom nádorovej nekrózy (TNF- α). (Etienne S. *et al.*, 1998; Holland J., Owens T., 1997; Pluskota E. *et al.*, 2000) Lokalizácia ICAM-1 na bunkách endotelu je nevyhnutným predpokladom pre prechod leukocytov cez endotelovú bariéru. Expresia ICAM-1 na epitelových bunkách sprostredkúva inváziu patogénov rovnako ako hostiteľskú obranu, tento vzor je tiež pozorovaný pri nádoroch. (Hopkins A.M. *et al.*, 2004) Epitelové bunky exprimujú ICAM-1 po aktivácii na svojom povrchu, ktorý sa pravdepodobne podieľa aj na mechanizme obrany hostiteľa spustením interakcie medzi epitelovými bunkami a leukocytmi. Niektoré zo statínov (liečivá znižujúce hladinu cholesterolu v plazme) sa viažu na LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) v ICAM-1 väzbovej doméne pričom inhibujú interakciu ICAM-1 a LFA-1. Tento účinok statínov prispieva k inhibícii adhézie leukocytov k vaskulárnym endotelovým bunkám, čím sa znižuje infiltrácia leukocytov z krvi do zápalových miest v tkanivách. To znamená, že regulácia interakcie LFA-1 a ICAM-1 poskytuje nový cieľ pre reguláciu zápalových ako aj imunitných odpovedí. (Nishibori M. *et al.*, 2003.)

3.3.5. VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1 – Cievna bunková adhézna molekula 1)

Cievna bunková adhézna molekula 1 (VCAM-1) alebo tiež indukovateľná bunková adhézna molekula 110 (INCAM-110) je transmembránový glykoproteín, ktorý obsahuje viacnásobné amino-koncové extracelulárne Ig-podobné domény, transmembránovú doménu a krátku karboxy-terminálnu cytoplazmatickú doménu. (Cook-Mills J.M., 2011; Cybulsky M.I., 1991; Osborn L., 1989) Štrukturálne je podobná s ICAM-1 a ďalšími endotelovými adhéznymi molekulami. (Ley K., Huo Y., 2001) VCAM-1 je mononukleárna leukocyt-selektívna adhézna molekula exprimovaná na cievnom

endotele počas zápalových ochorení po aktivácii určitými cytokínmi alebo endotoxínom, vrátane TNF- α , IL-1 β alebo ROS. (Cook-Mills J.M., 2011; Cybulsky M.I., 1991; Osborn L., 1989) K mononukleárnym leukocytom je VCAM-1 viazaný cez integrín VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) alebo $\alpha 4\beta 7$ a sprostredkováva migráciu cirkulujúcich leukocytov z krvi cez endotel do tkanív, kde prispieva k rozvoju aterosklerózy a reumatoidnej artritídy. (Elices M.J., 1990; Hession C., 1991; Lim S.T., 2012) VCAM-1 nie je exprimovaná pri základných podmienkach, ale je rýchlo indukovaná pro-aterosklerotickými podmienkami. (Ley K., Huo Y., 2001) V niekoľkých zápalových ochorenia je zápal blokovaný inhibíciou leukocytov viazať sa na VCAM-1 alebo inhibíciou signálnej transdukcie VCAM-1. Signálna transdukcia VCAM-1 a na VCAM-1 závislý zápal sú blokované antioxidantmi. VCAM-1 signalizácia je teda cieľom pre zásah farmakologickými činidlami a antioxidantmi počas zápalových ochorení. (Cook-Mills J.M., 2011)

3.3.6. COX-1 a COX-2 (Cyclooxygenase 1, Cyclooxygenase 2)

Cyklooxygenáza (COX), ktorá bola prvýkrát purifikovaná pred približne 40 rokmi, je kľúčový enzým pri syntéze prostaglandínov (PG) a tromboxánu z kyseliny arachidónovej. Obe cyklooxygenázové izoformy, COX-1 a COX-2, sú v štruktúre takmer identické, ale majú dôležité rozdiely v substrátovej a inhibítorovej selektivitě a v ich vnútrobunkovom umiestnení a u ľudí vykazujú 60% homológiu. (Cell Signaling 2 (21.6.2015); Vane J.R. *et al.*, 1998) Sú známe tým, že sa podieľajú na zápalových odpovediach a normálnych neuronálnych funkciách. (Qin W. *et al.*, 2003) COX-1 je konštitutívne exprimovaný vo väčšine tkanív, sprostredkováva fyziologické odpovede a reguluje homeostázu obličiek a ciev. (Chen B.C. *et al.*, 2004) Prostredníctvom neho sú taktiež syntetizované ochranné PG, ktoré zachovávajú integritu sliznice žalúdka. (Vane J.R. *et al.*, 1998) COX-2 je indukovateľný gén pre syntézu buniek, pričom môže byť zvýšený zápalovými podnetmi, vrátane IL-1 β , kyseliny lipoteichoicovej (LTA), a lipopolysacharidov, čo vedie k produkcii prozápalových prostaglandínov v zápale. (Chen B.C. *et al.*, 2004) Okrem vzniku COX-2 v zápalových léziách, je konštitutívne prítomný v mozgu a mieche, kde môže byť zapojený do nervového prenosu, predovšetkým pre bolesť a horúčku. PG vytvorené COX-2 sú tiež dôležité v ovulácii a pri pôrode. COX-2 umožňuje návrh liečiv, ktoré znižujú zápal bez odstránenia

ochranných PG v žalúdku a obličiek vytvorených COX-1. (Vane J.R. *et al.*, 1998)
Inhibícia COX udeľuje úľavu od zápalu, horúčkovitých, trombotických, neurodegeneratívnych a onkologických ochorení. (Fitzpatrick F.A., 2004)

3.3.7. FAK (Focal adhesion kinase - Fokálna adhézna kináza)

Fokálna adhézna kináza (FAK) je 125 kDa nereceptorová cytoplazmatická tyrozínkináza podieľajúca sa na integrínom sprostredkovaných signálnych dráhach, ktorá bola identifikovaná v roku 1992. (Chen H.C. *et al.*, 1996; Mon N.N. *et al.*, 2006)
FAK je exprimovaná vo väčšine typov buniek a tkanív a je evolučne konzervovaná naprieč druhmi. Integrínom-sprostredkovaná bunková adhézia podporuje rýchlu FAK fosforyláciu tyrozínu, ktorý rovnako ako receptor tyrozínkináz, vedie k aktivácii signálnych funkcií. Šesť FAK tyrozínov (397, 407, 576, 577, 861, a 925) bolo identifikovaných ako miesta fosforylácie závislých na adhézii. Z nich, len Tyr³⁹⁷ je ako jediný miestom autofosforylácie. Fosforylácia v Tyr³⁹⁷ koreluje so zvýšenou katalytickou aktivitou FAK a tiež vytvára väzbové miesto s vysokou afinitou rozpoznávané SH2 doménou z rodiny Src kináz a vedie k prijímaniu a aktivácii Src prostredníctvom vytvorenia komplexu. (Parsons J.T. *et al.*, 2000; Zhang X. *et al.*, 1999)
Nábor Src kináz má za následok fosforyláciu Tyr⁴⁰⁷, Tyr⁵⁷⁶ a Tyr⁵⁷⁷ v katalytickej doméne, a Tyr⁸⁷¹ a Tyr⁹²⁵ v karboxy-koncovnej oblasti FAK. (Cell Signalig 3 (28.6.2015)) Aktivácia komplexu FAK-Src je kľúčová pre reguláciu dole smerujúcich (down-stream) signálnych dráh, ktoré riadia bunkové delenie, pohyb buniek a prežívanie buniek a adhéziu. Fokálna adhézna kináza je často nadmerne exprimovaná v rôznych nádoroch a jej expresia vykazuje dobrú koreláciu s progresiou nádoru. Okrem týchto bunkových funkcií hrá FAK signalizácia kritickú úlohu v produkcii matrixových metaloproteináz (MMP) a následne aktivovanej nádorovej invázii. Navyše TNF α , prozápalový cytokín, ktorý pôsobí ako endogénny nádorový promótor, aktivuje FAK signalizáciu a zvyšuje nádorovú inváziu taktiež sú kľúčovými regulátormi zápalu. (Lim S.T. *et al.*, 2012; Mon N.N. *et al.*, 2006; Parsons J.T. *et al.*, 2000)

3.3.8. SAPK/JNK (Stress-activated protein kinases/Jun amino-terminal kinases - Stresom aktivovaná proteínkináza/Jun amino-koncová kináza)

Cicavčie bunky majú najmenej šesť MAP kinázových rodín, z ktorých tri boli charakterizované detailnejšie: ERK, stresom aktivované proteínkinázy (SAPK, tiež označované ako Jun N-koncové kinázy alebo JNK) a p38. ERK dráha je hlavným smerujúcim (down-stream) cieľom Ras proto-onkoproteínov. SAPK a p38 sú aktivované rôznymi vplyvmi životného prostredia (ionizujúce žiarenie, tepelný šok, oxidačný stres, osmotický šok), zápalovými mediátormi z rodiny TNF (TNF, interleukín-1, CD40L) a cievnymi reakciami na ischémiu, reperfúziu, a hypertenziu a súvisiacich humorálnych faktorov (angiotenzín II, endotelín). SAPK a p38 aktivujú niekoľko transkripčných faktorov, najmä aktívatorový proteín-1. (Bogoyevitch M.A. *et al.*, 2010; Kyriakis J.M., 1999) V JNK podskupine nájdeme 3 gény (jnk1, jnk2 a jnk3). (Ichijo H., 1999) Izoformy JNK1 a JNK2 sú exprimované vo všetkých typoch buniek, ale JNK3 je exprimovaná špecificky len v srdcovom a nervovom tkanive. (Verma G., Datta M., 2012) Mechanizmus aktivácie JNK je sprostredkovaný duálnou fosforyláciou Tyr a Thr zbytkov lokalizovaných v Thr-Pro-Tyr motíve v aktivačnej slučke medzi VII a VIII kinázovou doménou. (Davis R.J., 1999; Nishina H. *et al.*, 2004) Konkrétne je to Thr¹⁸³-Pro-Tyr¹⁸⁵. (Kyriakis J.M., Avruch J., 2001) Táto fosforylácia je sprostredkovaná duálne špecifickými MAP kináza kinázami MKK4 (SEK1) a MKK7, ktoré sú schopné katalyzovať fosforylizáciu oboch Thr a Tyr zbytkov a slúžia ako signálne molekuly, ktoré integrujú širokú škálu stimulov do aktivácie JNK signálnej dráhy. (Davis R.J., 1999; Nishina H. *et al.*, 2004) V *in vitro* systéme SEK1 preferenčne fosforyluje Tyr zbytok a MKK7 Thr zbytok JNK. SAPK/JNK dráha je zastúpená v mnohých rôznych vnútrobunkových signálnych dráhach, ktoré riadia spektrum bunkových procesov, vrátane bunkovej proliferácie, diferenciácie, apoptózy, transformácie, migrácie, a integrity cytoskeletu. SAPK/JNK fosforyluje transkripčné faktory okrem c-Jun sú to napríklad ATF-2, Elk1, p53 a c-myc, rovnako ako ne-transkripčné faktory ako sú Bcl-2, Bcl-xL, paxillinu, a MAP2. (Nishina H. *et al.*, 2004)

3.3.9. p38^{MAPK} (p38 mitogen-activated protein kinases)

p38 mitogén-aktivované proteínkinázy sú triedou evolučne konzervovaných serín/treonín mitogén-aktivovaných proteínkináz. (Coulthard L.R. *et al.*, 2009) p38 má 4 izoformy a to p38 α , p38 β , p38 γ (tiež značená ako ERK6 alebo SAPK3) a p38 δ (SAPK4). (Zhao M. *et al.*, 1999) Izoformy tohto proteínu vykazujú v ľudských tkanivách vyše 60% celkovú sekvenčnú homológiu a viac ako 90% identitu v rámci kinázových domén, ale len 40 až 45% s ďalšími tromi MAP kinázovými členmi rodiny. Napriek vysokej sekvenčnej homológii majú tieto izoformy pozoruhodné rozdiely v expresii tkaniva, aktivátorov na hornom konci (upstream) a efektorov na dolnom konci (downstream) a taktiež sa líšia vo svojej citlivosti voči chemickým inhibítorm. p38a a p38b sú exprimované vo väčšine tkanív, a sú citlivé na pyridinylimidazolové inhibítory, zatiaľ čo p38 γ a p38 δ sú exprimované rozdielne v závislosti od typu tkaniva. (Coulthard L.R. *et al.*, 2009; Zarubin T., Han J., 2005) p38 viaže pyridinylimidazolové deriváty, ktoré sú známe tým, že regulujú biosyntézu kľúčových prozápalových mediátorov, ako je interleukín-1 (IL-1), faktor nádorovej nekrózy alfa (TNF α) a COX-2. (Kumar S. *et al.*, 1999; Schieven G.L., 2005; Zarubin T., Han J., 2005) p38 ja neaktívna v nefosforylovanom stave, aktívnou sa stáva rýchlo po duálnej fosforylácii na Thr-Gly-Tyr motívoch nachádzajúcich sa v rámci regulačnej slučky medzi subdoménami VII a VIII. (Coulthard L.R. *et al.*, 2009) Konkrétne je p38 fosforylovaná na Thr¹⁸⁰-Gly-Tyr¹⁸². (Raingeaud J. *et al.*, 1995) Táto fosforylácia indukuje konformačné zmeny v proteíne umožňujúce väzbu ATP a substrátu. Fosforylovaný p38 môže aktivovať celý rad substrátov, ktoré zahŕňajú transkripčné faktory, proteínkinázy, cytozolové a jadrové proteíny. V cicavčích bunkách, sú tieto úzko príbuzné p38 izoformy aktivované v odpovedi na extracelulárne podnety, ako sú UV svetlo, teplo, osmotický šok, zápalové cytokíny a rastové faktory. (Zarubin T., Han J., 2005; Zhao M. *et al.*, 1999)

4. EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

4.1. MATERIÁL

4.1.1. Použité chemikálie

ABTS [2,2'-azino-bis(3-etylbenzthiazolin) sulfonová kyselina]	Sigma-Aldrich*
Akrylamid	Sigma-Aldrich*
Aprotinín	Sigma-Aldrich*
Bromfenolová modrá	Sigma-Aldrich*
Butylalkohol	Sigma-Aldrich*
Etyléndiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma-Aldrich*
Formaldehyd	Sigma-Aldrich*
Dihydrogénfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Chemapol*
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich*
Dodecylsírán sodný (SDS)	Lach-Ner*
Dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného	Penta*
Etanol	Penta*
Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich*
Fluorid sodný	Sigma-Aldrich*
Glycerol	Lach-Ner*
Glycín	M.G.P.*
Hovädzí sérový albumín (BSA)	Sigma-Aldrich*
Chemiluminiscenčné substráty luminol a peroxid	Thermo Scientific*
Chlorid draselný	Penta*
Chlorid sodný	Lach-Ner*
Leupeptín	Sigma-Aldrich*
Kyselina chlorovodíková (HCl)	Lach-Ner*
Kyselina o-fosforečná	Penta*
2-merkaptóethanol	Serva*
N,N'-metylenbisakrylamid	Sigma-Aldrich*
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich*
Peroxid vodíka (H ₂ O ₂)	Chemapol*
Peroxodisírán amonný (APS)	Sigma-Aldrich*
Ponceau S	Serva*
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich*
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	MP Biomedicals*
Trypsín	Sigma-Aldrich*
Tween 20	MP Biomedicals*

*Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Chemapol (Praha, ČR), Lach-Ner (Neratovice, ČR), Penta (Chrudim, ČR), M.G.P. (Zlín, ČR), Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), Serva (Heidelberg, Německo), MP Biomedicals (Aurora, OH, USA)

4.1.2. Použité roztoky

Trypsín/EDTA: 0,1% trypsin; 0,25 mM EDTA

PBS (Phosphate buffered saline): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 2 mM KH_2PO_4 (pH = 7,4)

TBS (Tris-buffered saline): 137 mM NaCl; 20 mM TRIS (pH = 6,8)

RIPA pufr: 20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM NaF; 2 mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4); tesne pred použitím pridať: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ leupeptín; $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ aprotinín

Činidlo Bradfordovej: 0,01% Coomassie brilliant blue; 95% etanol; 85% kyselina *o*-fosforečná

Roztok akrylamidu: 30% akrylamid; 0,8% bisakrylamid

1M TRIS/HCl pH 8,8: 48,46 g TRIS/400 ml pH 8,8

1M TRIS/HCl pH 6,8: 24,23 g TRIS/200 ml pH 6,8

10% SDS: 5 g SDS/50 ml H_2O

10% APS: 0,1 g APS/1 ml H_2O

5x SDS vzorkovací pufr: 0,3 M TRIS (pH = 6,8); 10% SDS; 50% glycerol; 0,05% Bromfenolová modrá; 5% 2-merkptoethanol

Elektroforetický pufer: 25 mM TRIS; 192 mM glycín; 0,1% SDS

Blotovací pufer: 25 mM TRIS; 192 mM glycín

Blokovací roztok: 3% (w/v) BSA v TBS s 0,1% Tween 20

Ponceau S: 0,2% v 1% kyseline octovej

10 mM citrátový pufer o pH=5

Blokovací pufer: 1% BSA v PBS

Premývací pufer k ELISA: 0,1M PBS + 0,05% Tween 20

4.1.3. Použité protilátky

V experimentálnej časti bolo pri Western blottingu použitých celkom 14 primárnych protilátok a dve sekundárne protilátky (Tabuľka 3) a pri prietokovej cytometrii boli použité 2 protilátky (Tabuľka 4).

Tabuľka 3: Zoznam protilátok používaných pre analýzu Western blottu

Primárne protilátky				
Označenie	Výrobca	Zdroj	Veľkosť detekovaného proteínu (kDa)	Použitie riedenie
anti-mTOR	Cell Signaling Technology [†]	R	289	1:1000
anti-ICAM-1	Peprtech [†]	R	150	1:5000
anti-FAK	Cell Signaling Technology [†]	R	125	1:1000
anti-pIKK α / β	Cell Signaling Technology [†]	R	85-87	1:250
anti-COX-2	Cell Signaling Technology [†]	R	74	1:1000
anti-COX-1	Cell Signaling Technology [†]	R	65-70	1:1000
anti-SAPK/JNK	Cell Signaling Technology [†]	R	46 a 54	1:1000
anti-pSAPK/JNK	Cell Signaling Technology [†]	M	46 a 54	1:500
anti-p38	Cell Signaling Technology [†]	R	43	1:1000
anti-p-p38	Cell Signaling Technology [†]	R	43	1:1000
anti- β -actin	Santa Cruz Biotechnology [†]	M	42	1:5000
anti-I κ B α	Cell Signaling Technology [†]	M	39	1:250
Sekundárne protilátky				
Označenie	Výrobca	Zdroj	Veľkosť detekovaného proteínu (kDa)	Použitie riedenie
RAM/Px	Sigma-Aldrich [†]	anti-M	-	1:5000
SWAR/Px	Sigma-Aldrich [†]	anti-R	-	1:1000

Tabuľka 4: Zoznam protilátok používaných pre prietokovú cytometriu

Protilátky				
Označenie	Výrobca	Zdroj	Veľkosť detekovaného proteínu (kDa)	Použitie riedenie
anti-VCAM-1-PE	BD Biosciences Pharmingen	M	-	1:30
anti-ICAM-1-FITC	Invitrogen	M	-	1:30

* Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Invitrogen (Waltham, MA, USA), Peprtech (Rocky Hill, NJ, USA), BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, USA).

◇ RAM/Px (rabbit anti-mouse IgG značený chrenovou peroxidázou), SWAR/Px (swine anti-rabbit IgG značený chrenovou peroxidázou), R (rabbit), M (mouse), PE (R-phycoerythrin), FITC (fluoresceín izotiokyanát).

4.1.4. Biologický materiál

Extrakty použité v diplomovej práci pochádzali z rastliny zbieranej na ostrove Kalimantan (Borneo, Indonézia). Rastlina bola určená botanikmi z herbária v Palangkaraya, Bogor, Indonézia a Kew Gardens, Spojené Kráľovstvo. Presné vedecké meno rastliny v tejto práci nie je uvedené, pretože doteraz nebolo publikované v žiadnej odbornej tlači. Extrakty boli pripravené v LRR a OChBG, pričom sa jedná o vodný, metanolvý, metanol-tetrahydrofuranový a etanolvý extrakt z listov alebo koreňov rastlín zbieraných na ostrove Kalimantan (Borneo, Indonézia).

Pre pozorovanie vplyvu extraktov boli na *in vitro* experimenty využité normálne ľudské endotelové bunky z pupočných ciev, HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells).

4.2. METÓDY

4.2.1. ELISA

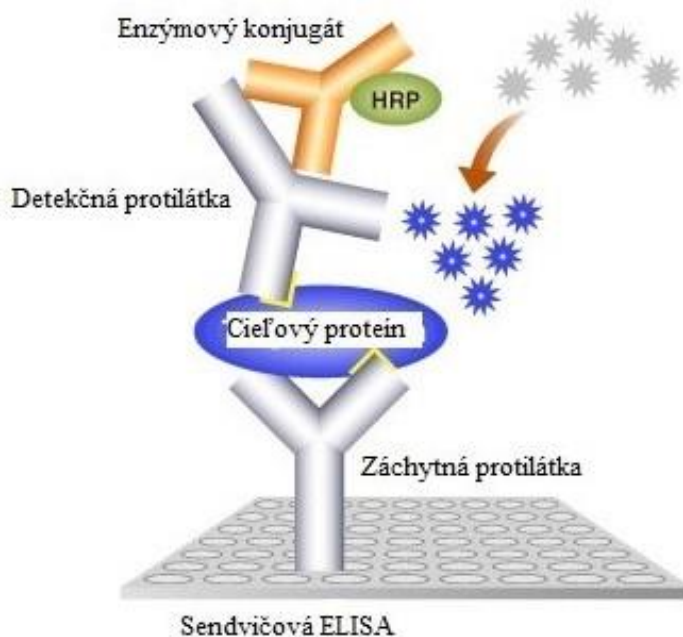
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) patrí k najpoužívanejším imunochemickým metódam v rámci základného výskumu a klinickej praxe. Medzi jej výhody patrí rýchle prevedenie a ľahká aplikácia. Slúži k detekcii a kvantifikácii antigénov a protilátok. (Lukáš Z.*et al.*, 1997)

Antigén je látka, ktorú rozpoznáva imunitný systém a reaguje na ňu. Medzi najčastejšie antigény patria cudzorodé látky z vonkajšieho prostredia (infekčné organizmy a ich produkty). Ako antigén môže pôsobiť prakticky akákoľvek látka. Najvýznamnejšími antigénmi sú proteíny a rôzne komplexné polysacharidy, ale tiež lipidy a lipoproteíny. Oblasť antigénu rozpoznávaná imunitnými receptormi sa nazýva epitop. (Hořejší V., Bartůňková J., 2009)

Protilátka je proteín špecificky sa viažuci na určitú látku - antigén. Každá protilátka má jedinečnú štruktúru, ktorá jej umožňuje špecificky sa viazať na zodpovedajúci antigén, ale všetky protilátky majú rovnakú celkovú štruktúru a sú súhrnne známe pod pojmom imunoglobulíny. Protilátky sú produkované diferencovaných B bunkami (plazmatickými bunkami) v reakcii na infekciu alebo očkovanie, a viažu sa a neutralizujú patogény alebo ich pripravujú na zničenie fagocytmi. (Murphy K.M., 2014)

V rámci ELISA metódy je známych niekoľko typov testov a to priama, nepriama, sendvičová a kompetitívna.

V tejto diplomovej práci bola konkrétne použitá sendvičová ELISA metóda. Princípom sendvičovej ELISA metódy je naviazanie protilátky na polystyrénovú maticu, tá zachytáva sledovaný antigén vo vzorke a dochádza medzi nimi k špecifickej reakcii. Tento komplex následne reaguje s detekčnou protilátkou. Táto protilátka je detekovaná prostredníctvom špecifického enzýmového konjugátu. Po reakcii medzi substrátom a enzýmom dochádza k zmene sfarbenia. (Crowther J.R., 2000)



Obrázok 10: Ukážka sendvičovej metódy. Na obrázku je znázornený imunokomplex skladajúci sa zo záchytnéj protilátky (Capture antibody), cieľového proteínu (antigénu) detekčnej protilátky (Detection antibody) a enzymového konjugátu. Po reakcii substrát-konjugát dochádza k zmene sfarbenia. (obrázok prevzatý a upravený z Cell Signaling Technology (8.7.2015))

Na túto metódu boli použité dopredu zakúpené súbavy (kity) pre štandardy ľudského IL-6 a ICAM-1 od spoločnosti Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) a 96 jamkové dosky (Nunc-Immuno™ Plate F96 MaxiSorp™, Thermofisher, Rockford, USA).

Záchytná protilátka (capture antibody) bola nariadená roztokom PBS (riedenie 100x pre IL-6 aj ICAM-1 na koncentráciu 1 µg/ml) a po napipetovaní 100 µl do každej jamky bola doska inkubovaná cez noc pri laboratórnej teplote. Na druhý deň bola doska premytá 4x premývacím pufrom (rovnaký premývací krok bol opakovaný po každej inkubácii). Po premytí bolo do jamiek napipetovaných 300 µl blokovacieho pufu a doska bola inkubovaná 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Následne bolo do 1. a 2. radu jamiek napipetovaných 100 µl štandardu rekombinantného hIL-6 alebo hICAM-1 s postupne sa znižujúcou koncentráciou (u hIL-6 od 1,5 ng/ml k 0,95 ng/ml s riedením 2x v diluente a u hICAM-1 od 3 ng/ml k 1,5 pg/ml s riedením 2x). Do zvyšných jamiek bolo napipetovaných po 100 µl skúmaných vzoriek a doska bola inkubovaná 2 hodiny. Po 2 hodinách bolo do jamiek pridaných 100 µl detekčnej protilátky (detection antibody) zriedenej v diluente (riedenie 200x pre IL-6 aj ICAM-1 na koncentráciu 0,5 µg/ml) s následnou inkubáciou 2 hodiny. Potom bolo do všetkých jamiek napipetovaných 100 µl konjugátu avidín-HRP nariadení v diluente (riedenie 2000x pre

IL-6 aj ICAM-1) a doska bola inkubovaná ďalších 30 minút. Nakoniec bolo do jamiek napipetovaných 100 µl roztoku obsahujúceho ABTS, citrátový pufer a H₂O₂ a po krátkej inkubácii (cca. 10 minút) bola meraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 405 nm na readri Tecan infiniteM200 PRO (Männedorf, Švajčiarsko).

4.2.2. Ovplyvnenie buniek a ich zber

HUVEC bunky boli kultivované na Petriho miskách o priemere 100 mm (pre Western blotting) a na 24 jamkovej doske s priemerom jamky 15 mm (pre prietokovú cytometriu) a na 24 hodín inkubované pri teplote 37 °C. Po 24 hodinách kultivácie bolo médium odsaté a nahradené médiom obsahujúcim testovaný rastlinný extrakt o zvolenej koncentrácii (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 alebo 50 µg/ml). Následne sa po 30-minútovej inkubácii ku vzorkám pridal roztok obsahujúci 10 ng/ml TNF α a opäť prebiehala 24 hodinová inkubácia. U buniek s označením kontrola bez TNF α bolo pridané iba médium, u kontroly s TNF α médium s následne pridaným roztokom TNF α . Nasadenie a ovplyvnenie buniek bolo vykonané laborantkou v Laboratóriu rastových regulátorov.

Zber buniek pre ďalšie analýzy metódami Western blottingu a prietokovej cytometrie nasledovalo po 24 hodinovom pôsobení testovaných extraktov.

Bunky určené pre analýzu prostredníctvom metódy Western blottingu boli postupne zbierané mechanickým zoškrabaním z dna Petriho misky a médium s bunkami bolo prepipetované do skúmaviek. Po zoškrabaní a prepipetovaní média s bunkami zo všetkých misiek boli skúmavky centrifugované pri 1000 g a teplote 4 °C po dobu 10 minút v centrifúge BR4i (Jouan, Saint-Herblain, Francie). Následne bolo médium odsaté a bunky na dne skúmavky rozsuspendované v 1 ml PBS. Skúmavky s bunkami boli opäť zcentrifugované za rovnakých podmienok (1000 g, 4 °C, 10 minút). Supernatant bol znovu odsatý a k peletu buniek bol pridaný 1 ml roztoku PBS, ktoré sa v ňom rozsuspendovali. Rozsuspendované bunky v PBS sa následne preniesli do mikroskúmavky a vzorky boli centrifugované za rovnakých podmienok (1000 g, 4 °C, 10 minút). Napokon bol roztok PBS opäť odsatý a pelety s bunkami uschované v mrazáku pri -70 °C. Behom celého zberu je potrebné bunky neustále uchovávať na ľade.

U buniek určených na cytometrickú analýzu bolo po 24 hodinovej inkubácii s testovanými rastlinnými extraktami odliate médium a následne bola každá jamka premytá s filtrovaným PBS. Po premytí bolo do jamiek opätovne napipetovaných 500 μ l filtrovaného PBS, ktoré sa postupne odsávalo aby sa vyšlo zaschnutiu buniek. Do odsatých jamiek sa vzápätí pridalo 100 μ l trypsínu. Po približne 1 minúte, kedy boli bunky uvoľnené (kontrola pod mikroskopom) sa bunky zafixovali v 100 μ l 4% formalínu. Skúmavky sa zvortexovali a inkubovali pri laboratórnej teplote 10 minút. Potom bolo do skúmaviek pridaných 0,5 ml PBS a skúmavky boli centrifugované pri laboratórnej teplote a 1500 rpm po dobu 5 minút. Následne bol supernatant odliaty a do zvyšného objemu (cca. 100 μ l) pridaná anti-ICAM-1 alebo anti-VCAM-1 protilátka konjugovaná s fluorescenčnou značkou FITC alebo PE. Po zvortexovaní boli skúmavky inkubované v tme 45 minút pri laboratórnej teplote. Po ukončení inkubácie bolo do roztoku pridaný 1 ml PBS a skúmavky boli zcentrifugované pri rovnakých podmienkach (1500 rpm, 5 minút, laboratórna teplota). Následne bol supernatant zo skúmaviek odliaty a k peletu na dne bolo pridaných 250 μ l PBS. Skúmavky boli zvortexované a testované látky okamžite merané na prietokovom cytometri [Cell Lab QuantaTM SC-MPL (Beckman Coulter, CA, USA) merané na kanáli FL1 - 525nm a FL2 - 575 nm].

4.2.3. Príprava bunkových lyzátov

Pre prípravu lyzátov boli bunky vybraté z -70 °C a po ich rozmrazení na ľade resuspendované vo vychladenom lyzačnom pufre RIPA podľa veľkosti peletu (cca. 10^6 buniek v 20-50 μ l). Následne boli bunky sonifikované na ultrazvukovom homogenizátore (3 cykly, 10 sekúnd) Sonopuls HD2200 (Bandelin, Nemecko). Po sonifikácii buniek nasledovala centrifugácia vzoriek pri 14000 rpm a 4°C po dobu 30 minút. Lyzát bol prenesený do nových mikroskúmaviek a prostredníctvom Bradfordovej metódy bola zmeraná koncentrácia proteínov v lyzátoch pri 595 nm na UV-VIS spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu, Japonsko). Následne boli lyzáty nariadené na najnižšiu koncentráciu proteínov prostredníctvom príslušného množstva lyzačného pufru a 5x SDS vzorkovacieho pufru. Po premiešaní boli vzorky denaturované pri teplote 98°C a následne uchované v mrazáku.

4.2.4. Polyakrylamidová gélová elektroforéza (SDS-PAGE)

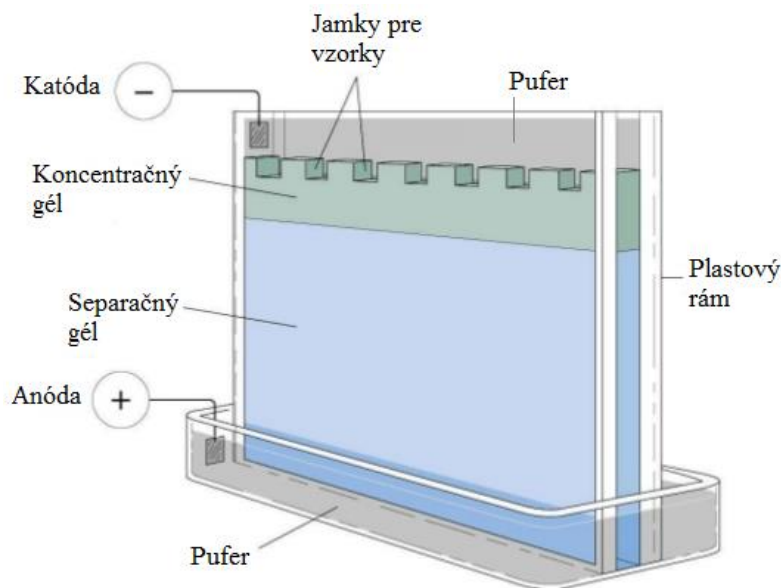
Ako prvý krok pri separovaní proteínov, ktoré bolo uskutočnené prostredníctvom diskontinuálnej SDS-PAGE elektroforézy, bola príprava polyakrylamidových gélov. Pre separáciu bol použitý 5% koncentračný gél, ktorého úlohou je zakoncentrovať proteíny do úzkeho pruhu a 10% separačný gél, ktorý má za úlohu rozdeliť proteíny podľa ich veľkosti. Do jednotlivých jamiek bolo nanosených 30 µg proteínu a do bočnej jamky 3,5 µl štandardu molekulových hmotností proteínov (Spectra™ Multicolor Broad 32 Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA alebo Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, BioRad, Hercules, CA, USA). Elektroforetická separácia proteínov prebiehala na aparátúre pre vertikálnu elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, Hercules, CA, USA) približne 30 minút pri 80 V. Akonáhle proteíny vstúpili do separačného gélu, bolo napätie pre ďalší beh elektroforézy navýšené na 120 V.

Zloženie reakčnej zmesi pre SDS-PAGE je uvedené v tabuľke č. 5.

Tabuľka 5: Zloženie reakčnej zmesi pre SDS-PAGE (pre 2 gély) :

Reakčný komponent	Objem	
	10% Separáčny gél	5% Koncentračný gél
Voda	2,15 ml	3,51 ml
Roztok AA + Bis	2,5 ml	0,84 ml
Tris pH = 8,8	2,8 ml	-
Tris pH = 6,8	-	0,63 ml
10% SDS	0,075 ml	0,050 ml
10% APS	0,030 ml	0,030 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml
Celkový objem reakčnej zmesi	7,56 ml	5,065 ml

* AA (Akrylamid), Bis (Bis-akrylamid), Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin), SDS (Dodecylsírán sodný), APS (Peroxodisírán amonný).



Obrázok 11 : Ukážka elektroforetickej aparatúry (upravený a stiahnutý z Rai University (4.7.2015))

4.2.5. Western blotting a imunodetekcia proteínov na membráne

Po ukončení elektroforézy boli proteíny z gélu prenesené na nitrocelulóзовú membránu (BioRad, Hercules, CA, USA) prostredníctvom metódy Western blottingu, ktorá prebiehala v blotovacej aparatúre Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Hercules, CA, USA). Blotovací sendvič bol zostavený v poradí od vrstvy papiera určeného pre blotting, nitrocelulóзовej membrány, gélu po elektroforéze po ďalšiu vrstvu papiera určeného pre blotting. Nato sa uloží sendvič do blotovacej vane a zaleje prenosovým pufrom. Prenos proteínov prebiehal pri 270 mA, za stáleho chladenia ľadom po dobu 2 hodín a vo vychladenom 1x koncentrovanom blotovacom pufre. Membrána s prenesenými proteínmi bola vložená na 5 minút do farbiaceho roztoku Ponceau S za súčasného trepania vaničky. Následne sa farbiaci roztok zliat a membrána premyla vodou, nechala sa uschnúť na filtračnom papieri. Podľa molekulových hmotností nanoseného markeru bola narezaná na prúžky so sledovanými proteínmi a prúžky boli dané do roztoku TBS, kde sa nechali do úplného odfarbenia.

Nešpecifické väzby sa následne blokovali v blokačnom roztoku (3% (w/v) BSA v TBS s 0,1% Tweenem 20 alebo 3% (w/v) sušené mlieko v TBS s 0,1% Tweenem 20) po dobu 2 hodín pri pokojovej teplote na trepačke. Po zablokovaní boli membrány opláchnuté v roztoku TBS a potom bola uskutočnená imunodetekcia proteínov

prostredníctvom primárnych a sekundárnych protilátok značených chrenovou peroxidázou (viz Tabuľka 3). Membrány sa nechali inkubovať cez noc pri 4 °C s primárnymi protilátkami zriedenými v blokovacom pufri. Na druhý deň po ukončení inkubácie boli membrány premyté (5 min v TBS, 5 min TBS s 0,1% Tweenem 20, 5 min v TBS, 10 min v TBS) a opäť inkubované pri laboratórnej teplote 1 hodinu so sekundárnymi protilátkami zriedenými v blokovacom pufri. Po 1 hodine boli membrány opäť premyté v roztoku TBS a TBS s 0,1% Tweenem 20 (10 min v TBS, 5 min TBS s 0,1% Tweenem 20, 5 min v TBS, 10 min v TBS).

Na záver bola vykonaná vizualizácia s využitím chemiluminiscenčného činidla (roztok luminolu a peroxidu v pomere 1:1; PierceTM Fast Western Blot Kit, ECL Substrate, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) a signál sa detekoval vyfotografovaním pomocou CCD kamery LAS4000 (FujiFilm, Japonsko).

4.2.6. Analýza buniek pomocou prietokovej cytometrie

Pomocou prietokovej cytometrie možno študovať jednotlivé bunky alebo aj iné častice v suspenzii podľa ich chemických a fyzikálnych vlastností. V prietokovom cytometri prebieha vlastná analýza bunkovej suspenzie. Bunky sú unášané v laminárne prúdiacej tekutine, ktorá je usmerňovaná prietokom nosnej tekutiny, do ktorej sú bunky aplikované otvorom o malom priemere. Dochádza k tzv. hydrodynamické fokusácii, ktorá zaisťuje, že meracím zariadením budú prechádzať jednotlivé častice za sebou. (Brown M., Wittwer C., 2000) Tieto častice sú potom ožiarené monochromatickým laserovým paprskom. Po interakcii laserového paprsku s časticou dochádza k prednému rozptylu svetla – forward scatter a bočnému rozptylu – side scatter. Forward scatter určuje veľkosť buniek a side scatter zisťuje kompaktnosť bunkového povrchu, prítomnosť granúl a optické vlastnosti cytoplazmy a jadra. Pre každú bunku sú typické povrchové alebo intracelulárne antigény tzv. CD-znaky. Pokiaľ sú tieto CD-znaky označené vhodnými monoklonálnymi protilátkami konjugovanej s fluorochrómom, po ožiarení laserom emitujú svetlo príslušnej vlnovej dĺžky. Jedná sa o tzv. imunofluorescenciu. Získané signály sú detekované pomocou fotonásobičov a fotodiód, potom digitalizované a získané dáta sú počítačovo vyhodnotené. (Marinov I., 2008)

K vyhodnoteniu počtu buniek bola použitá analýza prietokovou cytometriou. Princípom tejto metódy bolo meranie množstva proteínov ICAM-1 alebo VCAM-1 označenej sondou.

Po zbere buniek a ich následnom spracovaní bol obsah zo skúmaviek po danej inkubácii prepipetovaný do vialiek pre prietokový cytometer a analyzovaný na prietokovom cytometri Cell Lab QuantaTM SC-MPL (Beckman Coulter, CA, USA) na kanáli FL1 (525nm) a FL2 (575 nm).

Celý proces bol zaznamenaný prostredníctvom softwaru Quanta Collection (Beckman Coulter, CA, USA) a vyhodnotený pomocou programu Quanta Analysis (od tej istej firmy).

5. VÝSLEDKY

5.1. ELISA

Pomocou ELISA metódy bola v tejto diplomovej práci stanovovaná prítomnosť a hladina cytokínov IL-6 a ICAM-1 celkovo na 35 rôznych rastlinných extraktoch pochádzajúcich z rastlín z ostrova Kalimantan. Konkrétne sa jednalo o 11 vodných, 11 metanolových a 11 metanol-tetrahydrofuranových extraktov z listov alebo koreňov rôznych rastlín. U posledných 2 extraktov označených číslom 34 a 35 išlo o etanolový extrakt. Protizápalové účinky týchto vzoriek boli pozorované prostredníctvom tejto metódy na ľudských endotelových (HUVEC) bunkách. Ako kontrola pre tento experiment boli vybrané 3 štandardy – kurkumín, celecoxib a dexametazón, pričom u kurkumínu sa jedná o zlúčeninu rastlinného pôvodu prejavujúcu protizápalový účinok, celecoxib patrí medzi nesteroidné protizápalové lieky (NSAID) a dexametazón patrí medzi kortikosteroidy.

V tabuľke 6 a 7 sú prehľadne uvedené súhrnné výsledky rastlinných extraktov a štandardov pri rôznych koncentráciách dosiahnuté pri ELISA testoch na IL-6 a ICAM-1 proteín. Všetky vzorky boli testované v triplikátoch a spriemerované hodnoty z týchto triplikátov uvedené v tabuľke sú po optimalizácii porovnávané v rámci kontroly s pridaným TNF α , kde táto kontrola predstavuje hodnotu 100 %. Následne u vzoriek môžeme vidieť kladné číslo, čo značí, že extrakt zvyšuje hladinu zápalových cytokínov a neprejavuje žiadne protizápalové účinky. Naopak pri vzorkách so záporným číslom extrakt znižoval expresiu zápalových cytokínov a mal protizápalové účinky.

Tabuľka 6 zobrazuje rastlinné extrakty a štandardy o rôznych koncentráciách testované na prozápalový proteín IL-6. U štandardov bola najnižšia koncentrácia 1 $\mu\text{g/ml}$ a najvyššia 30 $\mu\text{g/ml}$. V rámci extraktov bola najnižšia koncentrácia 5 $\mu\text{g/ml}$ a najvyššia 50 $\mu\text{g/ml}$. Najlepšie sa dajú porovnať výsledky extraktov so štandardmi pri koncentrácii 10 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$, kde pri týchto koncentráciách boli testované všetky štandardy aj nadpolovičná väčšina rastlinných extraktov. Najvýraznejšie protizápalové účinky sa v rámci tohto testu na IL-6 pri koncentrácii 30 $\mu\text{g/ml}$ prejavili u extraktov s číslom 4, 6 a 21, naopak najviac zvyšovali hladiny cytokínov pri tejto koncentrácii extrakty s číslom 10 a 15. Tento experiment bol u rastlinných extraktoch s číslom 4,6 a 21 minimálne dvakrát zopakovaný, pričom testy vykazovali podobné výsledky.

Tabuľka 6 : Zmena hladiny zápalového cytokínu IL-6 produkovaného HUVEC bunkami s pridanými extraktmi a TNF α v porovnaní s kontrolnými bunkami ošetrovanými len 10 ng/ml TNF α (100% zápal) meraná pomocou metódy ELISA. Kladné číslo u extraktov značí, že extrakt zvyšuje hladinu IL-6, naopak pri extraktoch so záporným číslom bol zaznamenaný protizápalový účinok.

IL-6									
	1	5	10	15	20	30	40	50	$\mu\text{g/ml}$
kurkumín	+3	+9	-14	-23	-31	-43			
celecoxib	-4		-27			-41			
dexametazón	-2		-10			-18			
extrakt 1						-5			
extrakt 2		0	-2		+7	-4	-10	-3	
extrakt 3						-12			
extrakt 4		-7	-8		-9	-20	-30	-43	
extrakt 5		-8							
extrakt 6		-5	-2		-13	-19	-33	-45	
extrakt 7		-3	-6		-5		+3	+24	
extrakt 8		+5	+4		+2		+10	+5	
extrakt 9		0	+5		+4	+10	+8	+1	
extrakt 10		+3	+8		+18	+23	+28	+34	
extrakt 11		+5	+8		+11				
extrakt 12		+8	+10		+16				
extrakt 13			+2		+7	+5			
extrakt 14			+13		+7	+14			
extrakt 15			+4		+14	+25			
extrakt 16									
extrakt 17			-35		-5	-6			
extrakt 18									
extrakt 19									
extrakt 20			-3		-4	-11			
extrakt 21			-9		-9	-20			
extrakt 22								+17	
extrakt 23								+17	
extrakt 24								-10	
extrakt 25								+4	
extrakt 26								+11	
extrakt 27								-15	
extrakt 28								-13	
extrakt 29			-2		0	+3		-27	
extrakt 30			+5		+3	-1		-24	
extrakt 31								-18	
extrakt 32			+5		+5	-1		-21	
extrakt 33			+4		+6	+7		-33	
extrakt 34	+1		-3					-12	
extrakt 35	-3		-12					-26	

Ako druhá bola testovaná adhezívna molekula ICAM-1, ktorá napomáha priľnutiu leukocytov v zápalovom ložisku, a reakcia rastlinných extraktov a štandardov na tento proteín je uvedená v tabuľke 7. Rovnako ako u proteínu IL-6 aj u proteínu ICAM-1 bola u štandardov najnižšia koncentrácia 1 µg/ml a najvyššia 30 µg/ml a u extraktov bola najnižšia koncentrácia 5 µg/ml a najvyššia 50 µg/ml. Pri tomto proteíne vykazovali štandardy vyššiu expresiu detekovaného ICAM-1 proteínu oproti štandardom testovaných na IL-6. Aj v tomto prípade sa najlepšie porovnávajú vzorky so štandardmi pri koncentráciách 10 µg/ml a 30 µg/ml, kde boli testované všetky štandardy a približne polovica rastlinných extraktov. Najviac znižovali hladinu ICAM-1 proteínu pri koncentrácii 30 µg/ml extrakty s číslom 20 a 21, ktorých hodnota bola takmer rovnaká ako hodnota štandardov. Významné zmeny hladiny ICAM-1 boli zaznamenané aj u extraktov s číslom 15 a 18. Mierne zvyšovanie expresii ICAM-1 pri tejto koncentrácii spôsobili len 4 extrakty s číslom 4, 6, 29 a 30. Tento experiment bol u rastlinných extraktoch s číslom 20 a 21 dvakrát zopakovaný, pričom výsledky boli podobné.

Na základe týchto výsledkov boli na ďalšie experimenty vybrané 4 extrakty s najvýraznejšie prejavujúcim sa protizápalovým účinkom pri koncentrácii 30 µg/ml (v teste na detekciu IL-6 išlo o extrakty s číslom 4 a 6 a v teste na detekciu ICAM-1 o extrakty s číslom 20 a 21).

Tabuľka 7 : Zmena hladiny adhezívnej molekuly ICAM-1 napomáhajúcej priľnutiu leukocytov v zápalovom ložisku produkovaného HUVEC bunkami s pridanými extraktmi a TNF α v porovnaní s kontrolnými bunkami ošetrovanými len 10 ng/ml TNF α (100% zápal) meraná pomocou metódy ELISA. Kladné číslo u extraktov značí, že extrakt zvyšuje hladinu ICAM-1, naopak pri extraktoch so záporným číslom bol zaznamenaný protizápalový účinok.

ICAM-1									
	1	5	10	15	20	30	40	50	$\mu\text{g/ml}$
kurkumín	0	-10	-38	-44	-70	-69			
celecoxib	-4		-70			-76			
dexametazón	+10		+5			0			
extrakt 1						-3			
extrakt 2		0	-5		-3				
extrakt 3						-8			
extrakt 4			-2		-5	+8			
extrakt 5						-4			
extrakt 6			+8		+4	+5			
extrakt 7							-8	-7	
extrakt 8		-11	-9		-4		+13	+8	
extrakt 9		+2	-5		-3		+2	-7	
extrakt 10		-1	-2		+8				
extrakt 11		-4	-2		-7				
extrakt 12		0	-3		-6				
extrakt 13						0			
extrakt 14						-6			
extrakt 15						-15			
extrakt 16									
extrakt 17			-17		-13	-12			
extrakt 18			-14		-15	-17			
extrakt 19			-5		-14	0			
extrakt 20			+3		-41	-70			
extrakt 21			+6		-48	-65			
extrakt 22									
extrakt 23									
extrakt 24									
extrakt 25									
extrakt 26									
extrakt 27									
extrakt 28									
extrakt 29			+3		+5	+1			
extrakt 30			-3		0	+2			
extrakt 31									
extrakt 32			-5		-8	-1			
extrakt 33			+1		-6	-6			
extrakt 34	-2		-8					+9	
extrakt 35	+1		+4					-47	

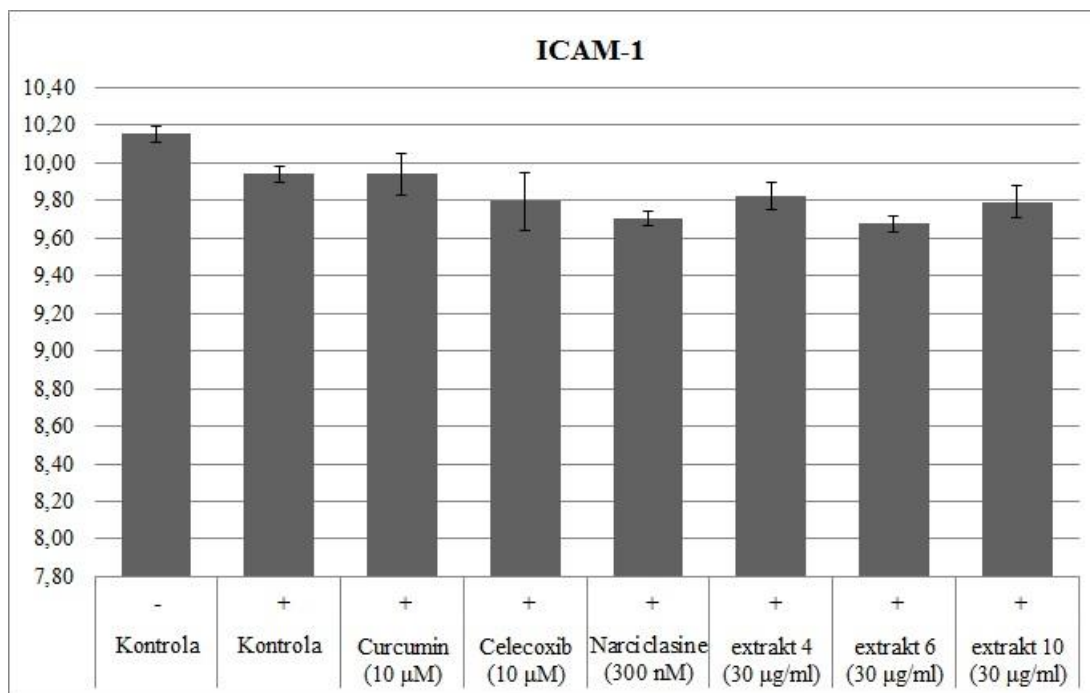
5.2. Prietoková cytometria

K vyhodnoteniu počtu buniek bola použitá analýza prietokovou cytometriou. Princípom tejto metódy bolo meranie množstva buniek vykazujúcich prítomnosť adhezívnych molekúl ICAM-1 alebo VCAM-1, ktoré boli detekované pomocou protilátok označených fluorescenčnou sondou, na svojom povrchu.

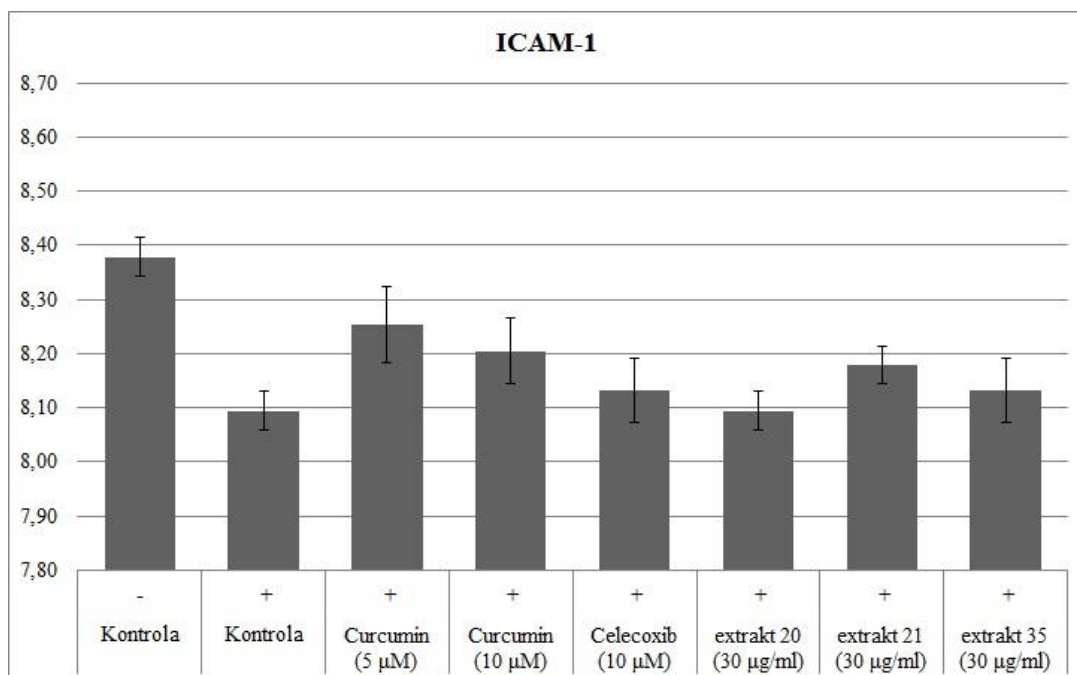
Všetky vzorky boli testované v triplikátoch a hodnoty zobrazené na obrázku sú po spriemerovaní mediánu týchto hodnôt pre jeden rastlinný extrakt. Ako negatívna kontrola boli použité bunky s médiom bez TNF α a ako pozitívna kontrola slúžili bunky s médiom, do ktorého bol pridaný roztok obsahujúci 10 ng/ml TNF α . Pri všetkých troch pokusoch v rámci tejto metódy sme nedostali signifikantné rozdiely, keďže kontroly nevykazovali taký signál aký bol očakávaný, t.j. pri pozitívnej kontrole zvýšený a pri negatívnej kontrole znížený.

Na obrázkoch 12 a 13 môžeme vidieť grafické znázornenie signálu odpovedajúceho množstvu proteínu ICAM-1 na svojom povrchu prostredníctvom metódy prietokovej cytometrie. U obrázku 12 je to pre extrakty s číslom 4, 6 a 10 s koncentráciou 30 μ g/ml, štandardy kurkumínu a celecoxibu s 10 μ M koncentráciou a narciklasínu s 300nM koncentráciou a u obrázku 13 je to pre extrakty s číslom 20, 21 a 31 s koncentráciou 30 μ g/ml, štandardy kurkumínu a celecoxibu s 10 μ M koncentráciou a kurkumínu s 5 μ M koncentráciou. Tieto štandardy slúžili aj ako pozitívna kontrola.

Na obrázku 14 je graficky znázornené množstvo buniek vykazujúcich prítomnosť VCAM-1 na svojom povrchu pre extrakty s číslom 20, 21 a 31 s koncentráciou 30 μ g/ml, štandardy kurkumínu a celecoxibu s 10 μ M koncentráciou a kurkumínu s 5 μ M koncentráciou.

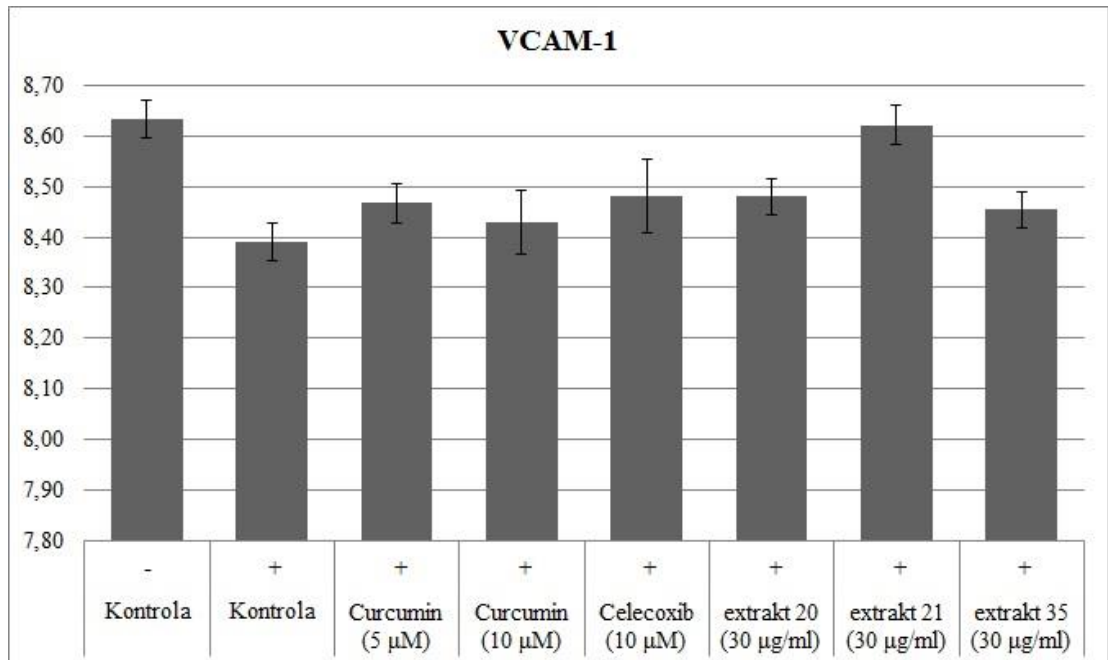


Obrázok 12 : Hladina adhezívnej molekuly ICAM-1 meraná prostredníctvom metódy prietokovej cytometrie pre extrakty s číslom 4, 6 a 10 s koncentráciou 30 µg/ml, štandardy kurkumínu a celecoxibu s 10µM koncentráciou a narciklasínu s 300nM koncentráciou a pozitívnej kontroly obsahujúcej roztok s TNFα a negatívnej kontroly bez TNFα. Y-os označuje priemernú výšku hodnoty mediánu daného roztoku extraktu z triplicátu. X-os označuje poradie sledovaných vzoriek s koncentráciou; znamienko - značí, že k bunkám nebol pridaný roztok s 10 ng/ml TNFα a znamienko + značí, že k bunkám bol pridaný 10ng/ml roztok TNFα.



Obrázok 13 : Hladina adhezívnej molekuly ICAM-1 meraná prostredníctvom metódy prietokovej cytometrie pre extrakty s číslom 20, 21 a 31 s koncentráciou 30 µg/ml, štandardy kurkumínu a celecoxibu s 10µM koncentráciou a kurkumínu s 5µM

koncentráciou a pozitívnej kontroly obsahujúcej roztok s TNF α a negatívnej kontroly bez TNF α . Y-os označuje priemernú výšku hodnoty mediánu daného roztoku extraktu z triplikátu. X-os označuje poradie sledovaných vzoriek s koncentráciou; znamienko - značí, že k bunkám nebol pridaný roztok s 10 ng/ml TNF α a znamienko + značí, že k bunkám bol pridaný 10ng/ml roztok TNF α .

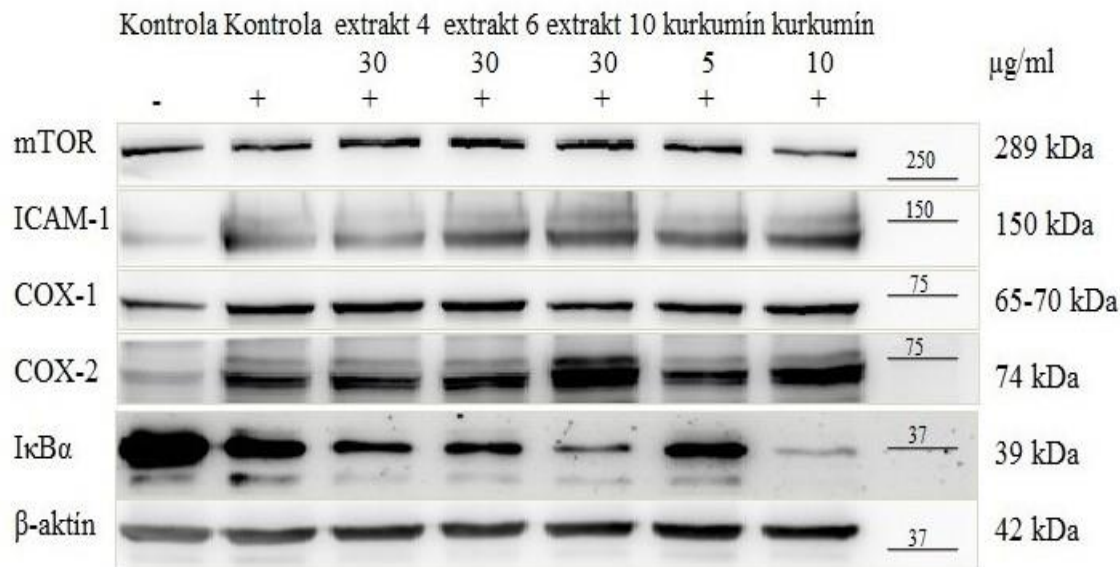


Obrázok 14 : Hladina adhezívnej molekuly VCAM-1 meraná u prostredníctvom metódy prietokovej cytometrie pre extrakty s číslom 20, 21 a 31 s koncentráciou 30 µg/ml, štandardy kurkumínu a celecoxibu s 10µM koncentráciou a kurkumínu s 5µM koncentráciou a pozitívnej kontroly obsahujúcej roztok s TNF α a negatívnej kontroly bez TNF α . Y-os označuje priemernú výšku hodnoty mediánu daného roztoku extraktu z triplikátu. X-os označuje poradie sledovaných vzoriek s koncentráciou; znamienko - značí, že k bunkám nebol pridaný roztok s 10 ng/ml TNF α a znamienko + značí, že k bunkám bol pridaný 10ng/ml roztok TNF α .

5.3. Western blotting

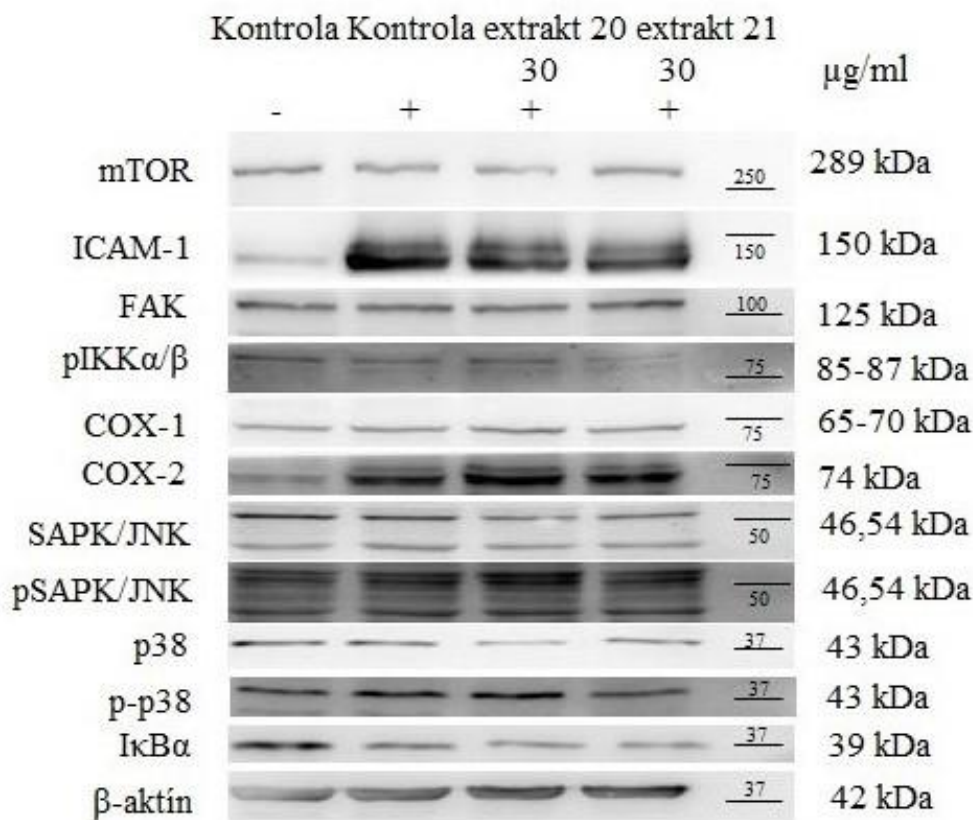
Pre overenie zmien v expresii sa v tejto diplomovej práci detekoval signál vybraných proteínov súvisiacich so zápalom. Konkrétne sa jednalo o detekciu signálu proteínov mTOR, ICAM-1, COX-1, COX-2 a I κ B α pri všetkých vzorkách. Pri vzorkách 20, 21 a štandardoch kurkumínu a celecoxibu sa merala detekcia signálu aj u proteínov FAK, IKK α/β , SAPK/JNK a p38. Po vykonaní ELISA testu sa pri vybraných extraktoch predpokladala u týchto proteínov (okrem I κ B α) znížená expresia. Celková hladina proteínov vo všetkých vzorkách bola detekovaná pomocou expresie β -aktínu. Tento experiment bol opakovaný dvakrát s podobnými výsledkami.

Na obrázku 15 je zobrazený detekovaný signál 5 proteínov (mTOR, ICAM-1, COX-1, COX-2 a I κ B α) na kontrolných bunkách bez (Kontrola -) a s 10 ng/ml TNF α (Kontrola +), bunkách ovplyvnených 3 rôznymi rastlinnými extraktami označenými číslom 4, 6 a 10, všetky o koncentrácii 30 μ g/ml a štandardom kurkumínu o 2 koncentráciách 5 a 10 μ g/ml. Rastlinné extrakty s číslom 4, 6 a 10 boli vybraté na základe predchádzajúceho ELISA testu na expresiu IL-6, kde tieto extrakty vykazovali najvýraznejšie protizápalové účinky (extrakt 4 a 6) a extrakt 10 mal oproti týmto dvom výsledky opačné. U kurkumínu boli na základe predchádzajúcich výsledkov otestované dve koncentrácie, z ktorých tá nižšia koncentrácia (5 μ g/ml) bola vybraná pre ďalšie testy. Kurkumín s vyššou koncentráciou (10 μ g/ml) mohol dosahovať cytotoxickú hranicu pre bunky, keďže očakávané výsledky boli v niektorých prípadoch pri tomto štandarde opačné. To možno pozorovať aj na obrázku, kde najvýraznejšie je to vidieť u proteínu I κ B α , COX-2 a ICAM-1. Ako môžeme ďalej vidieť na tomto obrázku protizápalové účinky boli aj touto metódou potvrdené u extraktu s číslom 4, kde dochádza k zníženej expresii proteínu ICAM-1 oproti pozitívnej kontrole, hoci výsledok už nie je taký výrazný ako bol pri ELISA metóde. U extraktu s číslom 10 sa opačné výsledky oproti výsledkom vykazujúcim extrakty s číslom 4 a 6 touto metódou len potvrdili, kde najvýraznejšie je to možné vidieť pri veľmi zníženej expresii proteínu I κ B α a zvýšenej expresii proteínov COX-2 a ICAM-1.



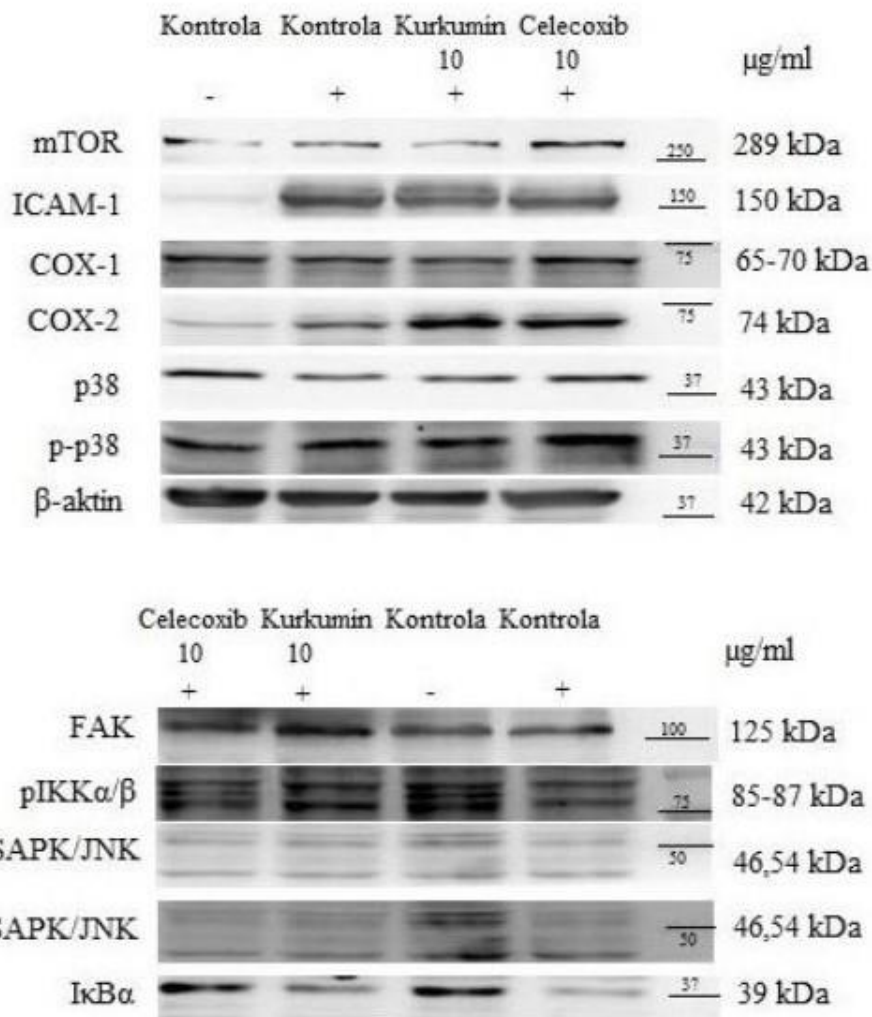
Obrázok 15 : Detekcia proteínov na membráne prostredníctvom metódy Western blottingu na vzorkách buniek s extraktmi 4, 6 a 10, kontrolnými vzorkami buniek so zápalom (pozitívna kontrola = kontrola +) a bez zápalu (negatívna kontrola = kontrola -) a vzorkami štandardu kurkumínu. Na ľavo sú uvedené názvy proteínov súvisiacich so zápalom. Celková hladina proteínov vo všetkých vzorkách bola detekovaná pomocou expresie β-aktínu. Na pravo vedľa membrány sú uvedené molekulové hmotnosti (v kDa) daných proteínov a molekulové hmotnosti jednotlivých proteínov v použitom markeri sú 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa. Hore nad membránou sú uvedené názvy extraktov v akom poradí nasledovali, ich koncentrácia, znamienko - značí, že k bunkám nebol pridaný roztok s 10 ng/ml TNFα a znamienko + značí, že k bunkám bol pridaný 10ng/ml roztok TNFα.

Na obrázku 16 môžeme vidieť detekciu signálu 9 proteínov podieľajúcich sa na procese zápalu alebo signálnych zápalových dráhach. Signál týchto proteínov bol detekovaný na kontrolných bunkách bez (Kontrola -) a s 10 ng/ml TNFα (Kontrola +) a vzorkách buniek obsahujúcimi rastlinné extrakty s číslom 20 a 21, obe o koncentrácii 30 µg/ml, ktoré boli vybraté na základe ELISA testu na ICAM-1, kde tieto extrakty vykazovali oproti ostatným vzorkám výrazne zvýšený protizápalový účinok. Výsledky však touto metódou pri daných vzorkách neboli preukázané tak ako sa očakávalo po výsledkoch v ELISA teste, naopak podľa výsledkov zobrazených na tomto obrázku sa javí, že protizápalové účinky tieto extrakty nevykazujú.



Obrázok 16 : Detekcia proteínov na membráne prostredníctvom metódy Western blottingu na vzorkách buniek s extraktmi 20 a 21 a kontrolnými vzorkami buniek so zápalom (pozitívna kontrola = kontrola +) a bez zápalu (negatívna kontrola = kontrola -). Na ľavo sú uvedené názvy proteínov súvisiacich so zápalom. Celková hladina proteínov vo všetkých vzorkách bola detekovaná pomocou expície β-aktínu. Na pravo vedľa membrány sú uvedené molekulové hmotnosti (v kDa) daných proteínov a molekulové hmotnosti jednotlivých proteínov v použítom markeri sú 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa. Hore nad membránou sú uvedené názvy extraktov v akom poradí nasledovali, ich koncentrácia, znamienko - značí, že k bunkám nebol pridaný roztok s 10 ng/ml TNFα a znamienko + značí, že k bunkám bol pridaný 10ng/ml roztok TNFα.

Na obrázku 17 je zobrazená detekcia signálu 9 proteínov podieľajúcich sa na procese zápalu alebo signálnych zápalových dráhach. Signál týchto proteínov bol detekovaný na kontrolných bunkách bez (Kontrola -) a s 10 ng/ml TNFα (Kontrola +) a vzorkách buniek obsahujúcimi štandardy kurkumínu a celecoxibu, obe o koncentrácii 10 µg/ml. Touto metódou boli štandardy testované z dôvodu potvrdenia mechanizmu pôsobenia štandardov oproti kontrolám (či už pozitívnej alebo negatívnej). Tieto výsledky však ani u štandardov nie sú veľmi jednoznačné. Naopak u proteínu IκBα môžeme pri celecoxibe vidieť predpokladanú, o niečo zvýšenú, expresiu tohto proteínu oproti pozitívnej kontrole.



Obrázok 17 : Detekcia proteínov na membráne prostredníctvom metódy Western blottingu na vzorkách buniek so štandardami kurkumínu a celecoxibu a kontrolnými vzorkami buniek so zápalom (pozitívna kontrola = kontrola +) a bez zápalu (negatívna kontrola = kontrola -). Na ľavo sú uvedené názvy proteínov súvisiacich so zápalom. Celková hladina proteínov vo všetkých vzorkách bola detekovaná pomocou exprese β-aktínu. Na pravo vedľa membrány sú uvedené molekulové hmotnosti (v kDa) daných proteínov a molekulové hmotnosti jednotlivých proteínov v použiteľnom markeri sú 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa. Hore nad membránou sú uvedené názvy extraktov v akom poradí nasledovali, ich koncentrácia, znamienko - značí, že k bunkám nebol pridaný roztok s 10 ng/ml TNF α a znamienko + značí, že k bunkám bol pridaný 10ng/ml roztok TNF α .

6. DISKUSIA

Cieľom experimentálnej časti diplomovej práce bola charakterizácia protizápalových účinkov vybraných rastlinných extraktov na ľudské endotelové bunky z pupočných ciev (HUVEC) *in vitro*. Pre tieto účely boli využité rastlinné extrakty z rastlín zbieraných na ostrove Kalimantan (Borneo, Indonézia), konkrétne vodné, metanolové, metanol-tetrahydrofuranové a etanolové extrakty z listov alebo koreňov daných rastlín.

Zápal je fyziologická odpoveď na poranenie tkanív, ale ak nie je kontrolovaná, vedie k ďalším komplikáciám. V mieste poranenia môže zvýšená priepustnosť cievnej steny, ktorá je nasledovaná migráciou imunitných buniek, spôsobiť počas zápalu tvorbu edému. Nadmerný zápal prispieva k tvorbe mnohých akútnych a chronických ochorení človeka. Imunitný systém nepretržite monitoruje mikroflóru a využíva konštitutívne antimikrobiálne mechanizmy na udržanie imunitnej homeostázy. Napríklad, lipopolysacharid (LPS) je endotoxín a zložka vonkajšej membrány gramnegatívnych baktérií. LPS stimuluje vrodenú imunitu prostredníctvom úpravy produkcie zápalových mediátorov, ako je oxid dusnatý (NO), TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alfa), interleukín-6 (IL-6), prostanoidy a leukotriény. TNF- α je jedným z najviac prozápalových cytokínov produkovaných aktivovanými T bunkami a ak táto reakcia nie je pod kontrolou, môže viesť ku chronickým, deštruktívnym zápalom. Preto sú antioxidantné a protizápalové účinky veľmi dôležité pre kontrolu oxidačného stresu a zápalových procesov, ktoré vznikli v priebehu odpovede na infekčné ochorenia. (Sagnia B. *et al.*, 2014)

Liečivé rastliny boli používané v tradičných systémoch zdravotnej starostlivosti od prehistorických čias a sú stále najvýznamnejším zdrojom zdravotnej starostlivosti pre drvivú väčšinu populácie na celom svete, ktorá ešte vždy používa liečivé rastliny ako prvý zdroj zdravotnej starostlivosti v boji proti infekčným a neinfekčným chorobám. Rastlinné extrakty a antioxidantné látky rastlinného pôvodu môžu pôsobiť ako antioxidanty alebo môžu zosilňovať antioxidantné a protizápalové obranné mechanizmy organizmu. (Sagnia B. *et al.*, 2014) Mnoho bylenných extraktov a prírodných produktov predchádza alebo znižuje oxidačný stres v modeloch *in vitro*. Mueller *et al.* testovali 30 rastlinných extraktov z rôznych rastlinných rodín pre ich protizápalové účinky na LPS-stimulovaných makrofágoch. Uvádzané výsledky hovoria o tom, že tieto zlúčeniny zahŕňajú v rámci ich protizápalových mechanizmov redukciu prozápalových cytokínov

IL-6 a TNF- α , znižujú expresiu cyklooxygenázy-2 (COX-2) a oxidu dusnatého a zvyšujú protizápalovú sekréciu IL-10. (Mueller M. *et al.*, 2010; Thring T.S. *et al.*, 2011)

V prvej časti experimentálnej činnosti tejto práce bolo 35 rôznych rastlinných extraktov skúmaných prostredníctvom ELISA metódy, kde sa stanovovala prítomnosť a hladina cytokínu IL-6 a adhezívnej molekuly ICAM-1.

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) je jednou z najpoužívanejších imunodetekčných metód slúžiacich k detekcii a kvantitatívnej analýze antigénov pomocou protilátok. Pri sendvičovej ELISE je imunoenzymatickou reakciou protilátka imobilizovaná na pevnú fázu (povrch jamky mikrotitračnej dosky) a zachytáva molekulu antigénu. Na antigén sa špecifickou väzbou viaže detekčná protilátka a na tento komplex sa nakoniec naviaže značený enzýmový konjugát. Reakcia je vizualizovaná substrátom, ktorý je pridaný v poslednom kroku experimentu. V prípade štiepenia substrátu enzýmom dochádza k farebnej reakcii, ktorej intenzita je meraná pomocou spektrofotometru. (Crowther J.R., 2000)

V rámci ELISA metódy bola posudzovaná expresia interleukínu IL-6 produkovaný ľudskými endotelovými bunkami ošetrovanými skúmanými rastlinnými extraktmi, kde najvýraznejšie protizápalové účinky prejavili extrakty s číslom 4, 6 a 21 pri koncentrácii 30 $\mu\text{g/ml}$, naopak najmenej protizápalovo sa pri tejto koncentrácii javili extrakty s číslom 10 a 15. Pri skúmaní expresie ICAM-1 po pridaní týchto extraktov na bunky s umelo vyvolaným zápalom mali najvýraznejšie protizápalové vlastnosti extrakty s číslom 20 a 21 pri porovnávannej koncentrácii 30 $\mu\text{g/ml}$. Taktiež dobré protizápalové výsledky vykazovali aj extrakty s číslom 15 a 18 a veľmi mierny prozápalový účinok pri rovnakej koncentrácii pôsobili extrakty s číslom 4, 6, 29 a 30.

Zo zistených dát, ktoré boli získané pomocou ELISA metódy, boli vybrané najúčinnnejšie rastlinné extrakty (extrakty s číslom 4, 6, 20 a 21), u ktorých sa predpokladali výrazné protizápalové účinky. Tieto rastlinné extrakty boli následne monitorované na proteínovej úrovni prostredníctvom Western blottingu a prietokovej cytometrie.

Prietoková cytometria je technika slúžiaca na vykonanie rýchleho merania častíc alebo buniek prúdiacich v tekutine jedna po druhej cez snímací bod. Dôležitým rysom prietokovej cytometrie je to, že meraná je zvlášť každá častica v suspenzii a vzorky nie sú vyhodnocované len ako priemerné hodnoty celej populácie. (Ormerod M.G., 2000)

Expresia adhezívnych molekúl ICAM-1 a VCAM-1 zmeraná pomocou prietokovej cytometrie vykazovala slabší signál než aký bol očakávaný – pri pozitívnej

kontrole zvýšený a pri negatívnej znížený, čo mohlo ovplyvniť niekoľko krokov pri farbení pomocou konjugovaných protilátok vrátane ich nestability.

Western blotting je metóda využívaná za účelom kvalitatívneho zhodnotenia reakcie špecifických protilátok so spektrom elektroforeticky separovaných antigénov bielkovinovej povahy. Prevedenie Western blottingu je presnejšie než ELISA, avšak je finančne nákladnejšia, časovo náročnejšia a nie tak citlivá. (Dupouy-Camet J., Murrell K.D., 2007)

Prostredníctvom metódy Western blotting sa detekovala expresia vybraných proteínov podieľajúcich sa na procese zápalu alebo signálnych zápalových dráhach (mTOR, ICAM-1, COX-1, COX-2, I κ B α , FAK, IKK α/β , SAPK/JNK a p38) po pridaní vybraných rastlinných extraktov. S extraktmi s číslom 4 a 6 bol ako extrakt s opačným pôsobením vybratý extrakt s číslom 10, kde sa pri tomto rastlinnom extrakte aj na základe tejto metódy potvrdili negatívne protizápalové účinky (pôsobil prozápalovo) najlepšie viditeľné pri expresii proteínov I κ B α , COX-2 a ICAM-1. Výsledky pre extrakty s číslom 4 a 6 merané pomocou tejto metódy neboli veľmi presvedčivé, čo dokazuje aj expresia proteínov v endotelových bunkách ošetrovaných rastlinnými extraktmi (Obrázok 15).

U kurkumínu s vyššou koncentráciou (10 μ g/ml) bola pravdepodobne dosiahnutá cytotoxická hranica pre bunky, ako možno pozorovať aj na obrázku 15, kde je to najvýraznejšie viditeľné u proteínov I κ B α , COX-2 a ICAM-1. To však nepotvrďuje vo svojom článku Kim D.S.H.L. *et al.*, (2001), kde boli účinky kurkumínu taktiež testované na HUVEC bunkách a cytotoxicitu na nich nevykazoval ani pri koncentrácii 50 μ g/ml. Štúdie *in vitro* ukazujú, že kurkumín potláča aktiváciu NF- κ B blokovaním fosforylácie inhibičného faktoru I κ B. Potlačenie aktivácie následne znižuje COX-2 aktivitu, čo vo svojom článku potvrdil aj Zhang F. *et al.*, (1999). (Jurenka J.S., 2009; Zhang F. *et al.*, 1999) Ako môžeme ďalej vidieť na obrázku 15, protizápalové účinky boli aj touto metódou potvrdené u extraktu s číslom 4, hoci výsledok už nie je taký výrazný ako bol pri ELISA metóde. U extraktov s číslom 20 a 21 sa v rámci tohto testu predpokladali ešte výraznejšie rozdiely ako u extraktov s číslom 4 a 6 z dôvodu výsledkov vykazujúcich pri ELISA metóde na detekovateľný cytokín ICAM-1. Tieto výsledky, ako znázorňuje obrázok 16, sa prejavili pri zníženej expresii proteínov SAPK/JNK a ICAM-1 v prípade oboch extraktov a pri extrakte s číslom 21 aj pri zníženej expresii proteínov pSAPK/JNK a p-p38, zároveň ich protizápalové vlastnosti nie sú viditeľné pri zvýšenej expresii proteínu I κ B α . Fosfo forma proteínov SAPK/JNK

a p38 je ich aktivovaná forma a aj z toho dôvodu bola jeho hladina sledovaná. Celková hladina proteínov SAPK/JNK a p38 bola sledovaná pre porovnanie, či nedochádzalo k úbytku alebo zvýšeniu hladiny aj u týchto celkových proteínov.

Pendurthi U.R. *et al.*, (1997) vo svojom článku uvádza, že aplikácia kurkumínu na endotelové bunky potlačila fosforyláciu I κ B α . Ďalej uvádza, že v mnohých experimentoch sa úroveň I κ B α v bunkách ošetrovaných kurkumínom znížili po 15 minútovej expozícii s roztokom obsahujúcim TNF α . Pokles hladiny I κ B α naznačuje, že rýchlosť rozkladu TNF α je vyššia než rýchlosť fosforylácie I κ B α v bunkách ošetrovaných kurkumínom. Toto zistenie sa hodí na hypotézu, že kurkumín potláča fosforyláciu, ale nie degradáciu I κ B α . (Pendurthi U.R. *et al.*, 1997)

Vzhľadom k týmto výsledkom môžeme povedať, že niektoré rastlinné extrakty vykazujú protizápalové účinky, ale bolo by potrebné testy s extraktmi ešte zopakovať a vykonať s nimi viacero ďalších testov už aj s inými koncentráciami. Napríklad pomocou imunofluorescencie by sa mohla určiť zmena lokalizácie zápalových markerov v bunke.

7. ZÁVER

Rastliny sú hlavným zdrojom nových chemických látok s možným terapeutickým účinkom, vzhľadom k tomu, že v sebe obsahujú obrovské množstvo zložitých štruktúr, ktoré doteraz ešte neboli objavené. Aj z toho dôvodu je štúdium rastlín atraktívne pre akademické inštitúcie aj priemysel.

Táto práca sa zaoberala charakterizáciou protizápalových účinkov rastlinných extraktov z rastlín pochádzajúcich z ostrova Kalimantan (Borneo, Indonézia). 11 študovaných extraktov bolo vodných, 11 metanolových, 11 metanol-tetrahydrofuranových a 2 etanolové extrakty z listov alebo koreňov rastlín z daného ostrova. Protizápalové vlastnosti týchto extraktov z listov alebo koreňov by mohli priaznivo prispieť k využitiu týchto rastlín pre prípravu nových liečiv.

Rastlinné extrakty boli skúmané pomocou metódy ELISA, Western blotting a prietoková cytometria. Rastlinné extrakty dosahovali najpriaznivejšie protizápalové účinky metódou ELISA, pomocou ktorej bola skúmaná expresia interleukínu IL-6 a adhezívnej molekuly ICAM-1 produkované bunkami s umelo vyvolaným zápalom pomocou $\text{TNF}\alpha$ a obsahujúcimi médium s rôznymi extraktmi. Pomocou Western blottingu a prietokovej cytometrie som overovala možnú signálnu dráhu, ale obdržané výsledky boli pomerne slabé v porovnaní s očakávaným efektom.

Vzhľadom k týmto výsledkom môžeme povedať, že niektoré rastlinné extrakty vykazujú protizápalové účinky, ale pre potvrdenie ich účinkov by bolo treba testy s danými extraktmi ešte zopakovať. Do budúca by sa mohli v rámci ďalších testov vyskúšať aj iné koncentrácie a zistiť, či práve tie nevyzakujú v niektorých prípadoch lepšie protizápalové účinky a taktiež by sa mohla detailne študovať signálna dráha.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abad M.J., Bermejo P., Carretero E., Martínez-Acitores C., Noguera B., Villar A. (1996): Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. *The Journal of Ethnopharmacology* **55**, 63-68.
- Alwashili A., Al-Sobarry M., Cherrah Y., Alaoui K. (2012): Anti-inflammatory and Analgesic effects of ethanol extract of *Draaena cinnabari* balf, asendemic plant in Yemen. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **3**:11.
<http://www.ijpbs.net/vol-3/issue-2/pharma/11.pdf>
- Ammon H.P., Wahl M.A. (1991): Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* **57**, 1-7.
- Beg A.A., Baldwin A.S. Jr. (1993): The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes and development* **7**, 2064-2070.
- Bogoyevitch M.A., Ngoei K.R., Zhao T.T., Yeap Y.Y., Ng D.C. (2010): c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta* **1804**, 463-475.
- Brown M., Wittwer C. (2000): Flow Cytometry: Principles and Clinical Application in Hematology. *Clinical Chemistry* **46**, 1221-1229.
- Brune K., Patrignani P. (2015): New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of pain research* **8**, 105-118.
- Buchman A.L., (2001): Side effects of corticosteroid therapy. *Journal of clinical gastroenterology* **33**, 289-294.
- Buttgereit F., daSilva J.A.P., Boers M., Burmester G.R., Cutolo M., Jacobs J., Kirwan J., Köhler L., vanRiel P., Vischer T., Bijlsma J.W.J. (2002): Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. *Annals of the Rheumatic Diseases* **61**, 718-722.
- Calixto J.B., Otuki M.F., Santos A.R. (2003) : Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Medica* **69**, 973-983.
- Chen H.C., Appeddu P.A., Isoda H., Guan J.L. (1996): Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 26329-26334.
- Chen B.C., Chang Y.S., Kang J.C., Hsu M.J., Sheu J.R., Chen T.L., Teng C.M., Lin C.H. (2004): Peptidoglycan induces nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression via Ras, Raf-1, and ERK in RAW 264.7 macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 20889-20997.
- Chen J., Chen Z.J. (2013): Regulation of NF-κB by Ubiquitination. *Current Opinion in Immunology* **25**, 4-12.
- Cook-Mills J.M., Marchese M.E., Abdala-Valencia H. (2011): Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & Redox Signaling* **15**, 1607-1638.
- Coulthard L.R., White D.E., Jones D.L., McDermott M.F., Burchill S.A. (2009): p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* **15**, 369-379.
- Crowther J.R. (2000): *The ELISA Guidebook*. Springer Science & Business Media, Berlin, Nemecko, 436 strán.
- Cybulsky M.I., Fries J.W., Williams A.J., Sultan P., Davis V.M., Gimbrone M.A. Jr., Collins T. (1991): Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *The American Journal of Pathology* **138**, 815-820.
- Davis R.J. (1999): Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical Society Symposia* **64**, 1-12.
- Delhase M., Hayakawa M., Chen Y., Karin M. (1999): Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* **284**, 309-313.
- Deshmukh C.T. (2007): Minimizing side effects of systemic corticosteroids in children. *The Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology* **73**, 218-221.

- DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., Karin M. (1997): A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* **388**, 548-554.
- Dupouy-Carnet J., Murrell, K.D. (2007): *FAO/WHO/OIE Guidelines for Surveillance, Management, Prevention and Control of Trichinellosis*. Food and Agriculture Organization, Rím , Taliansko, 108 strán.
- Elices M.J., Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskyj S., Hemler M.E., Lobb R.R. (1990): VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60**, 577:584.
- Epstein J., Sanderson I.R., Macdonald T.T. (2010): Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *British Journal of Nutrition* **103**, 1545-1557.
- Etienne S., Adamson P., Greenwood J., Strosberg A.D., Cazaubon S., Couraud P.O. (1998): ICAM-1 Signaling Pathways Associated with Rho Activation in Microvascular Brain Endothelial Cells. *The Journal of Immunology* **161**, 5755-5761.
- Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Mařha V. (2005): *Imunitní systém: informace pro každého*. 1st ed., Grada Publishing a.s., Praha, Česká republika, 236 strán.
- Fitzpatrick F.A. (2004): Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 577-588.
- Fu D.G. (2015): Regulation of redox signalling and autophagy during cardiovascular diseases-role of resveratrol. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **19**, 1530-1536.
- Fürst R., Zündorf I. (2014): Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. *Mediators of Inflammation*, **2014**:146832. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4060065/pdf/MI2014-146832.pdf>
- Gilmore T.D. (2006): Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684.
- Gingras A.C., Raught B., Sonenberg N. (2001): Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development* **15**, 807-826.
- Goldstein J.L., Cryer B. (2015): Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. *Drug, healthcare and patient safety* **7**, 31-41.
- Goulding N.J., Flower R.J. (2001): *Glucocorticoids*. Birkhauser, Basel, Švajčiersko, 205 strán.
- Gukovsky I., Reyes C.N., Vaquero E.C., Gukovskaya A.S., Pandol S.J. (2003): Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **284**, 85-95.
- Haanpää M., Treede R.D. (2012): Capsaicin for Neuropathic Pain: Linking Traditional Medicine and Molecular Biology. *European Neurology* **68**, 264-275.
- Hayden M.S., Ghosh S. (2008): Shared Principles in NF-κB Signaling. *Cell* **132**, 344-362.
- He Y., Yue Y., Zheng X., Zhang K., Chen S., Du Z. (2015): Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked?. *Molecules* **20**, 9183-9213.
- Hession C., Tizard R., Vassallo C., Schiffer S.B., Goff D., Moy P., Chi-Rosso G., Luhowskyj S., Lobb R., Osborn L. (1991): Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1). *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 6682-6685
- Hoeffler C.A., Klann E. (2010): mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences* **33**, 67-75.
- Holland J., Owens T. (1997): Signaling through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in a B cell lymphoma line. The activation of Lyn tyrosine kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 9108-9112
- Hopkins A.M., Baird A.W., Nusrat A. (2004): ICAM-1: targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands. *Advanced drug delivery reviews* **56**, 763-778.
- Hořejší V., Bartůňková J. (2009): *Základy imunologie*. 4th ed. Triton, Praha, Česká republika, 304 strán.

- Hosseini A., Ghorbani A. (2015): Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *The Avicenna Journal of Phytomedicine* **5**, 84-97.
- Ichijo H. (1999): From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**, 6087-6093.
- Imazio M., Bobbio M., Cecchi E., Demarie D., Demichelis B., Pomari F., Moratti M., Gaschino G., Giammaria M., Ghisio A., Belli R., Trincherio R. (2005): Colchicine in Addition to Conventional Therapy for Acute Pericarditis : Results of the COLchicine for acute PERicarditis (COPE) Trial. *Circulation* **112**, 2012-2016.
- Israel A. (2010): The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**:a000158. <http://cshperspectives.cshlp.org/content/2/3/a000158.long>
- Jacobs M.D., Harrison S.C. (1998): Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. *Cell* **95**, 749-758.
- Jang M., Jeong S.W., Cho S.K., Ahn K.S., Kim B.K., Kim J.C. (2013): Anti-inflammatory effects of 4 medicinal plant extracts in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *The Food Science and Biotechnology* **22**, 213-220.
- Jurenka J.S. (2009): Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review* **14**, 141-153.
- Karin M. (1999): How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* **18**, 6867-6874.
- Karin M., Ben-Neriah Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology* **18**, 621-663.
- Kim C.S., Kawada T., Kim B.S., Han I.S., Choe S.Y., Kurata T., Yu R. (2003): Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cellular Signalling* **15**, 299-306.
- Koehn F.E., Carter G.T. (2005): The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 206-220.
- Kumar S., Jiang M.S., Adams J.L., Lee J.C. (1999): Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **263**, 825-831.
- Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C. (2012): *Robbins Basic Pathology*. 9th ed., Saunders, Philadelphia, PA, USA, 29-74.
- Kyriakis J.M. (1999): Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 5259-5262.
- Kyriakis J.M., Avruch J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* **81**, 807-869.
- Laplante M., Sabatini D.M. (2012): mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-293.
- Laplante M., Sabatini D.M. (2013): Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *The Journal of Cell Science* **126**, 1713-1719.
- Ley K., Huo Y. (2001): VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* **107**, 1209-1210.
- Lim S.T., Miller N.L., Chen X.L., Tancioni I., Walsh C.T., Lawson C., Uryu S., Weis S.M., Cheresch D.A., Schlaepfer D.D. (2012): Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. *The Journal of Cell Biology* **197**, 907-919.
- Liu L., Kwak Y.T., Bex F., Garcia-Martinez L.F., Li X.H., Meek K., Lane W.S., Gaynor R.B. (1998): DNA-Dependent Protein Kinase Phosphorylation of I κ B α and I κ B β Regulates NF- κ B DNA Binding Properties. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 4221-4234.
- Liu D, Ahmet A., Ward L., Krishnamoorthy P., Mandelcorn E.D., Leigh R., Brown J.P., Cohen A., Kim H. (2013): A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, **9**:30. <http://www.aacijournal.com/content/9/1/30>
- Lukáš, Z., Dráberová, E., Feit, J., Vojtěšek B. (1997). *Imunohistochemické metody v biologii a v biotické diagnostice*. Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, 170 strán.

- Mackey A.L. (2013) Does an NSAID a day keep satellite cells at bay?. *Journal of Applied Physiology* **115**, 900-908.
- Madlener S., Svacinová J., Kitner M., Kopecky J., Eytner R., Lackner A., Vo T.P., Frisch R., Grusch M., De Martin R., Dolezal K., Strnad M., Krupitza G. (2009): In vitro anti-inflammatory and anticancer activities of extracts of *Acalypha alopecuroidea* (Euphorbiaceae). *The International Journal of Oncology* **35**, 881-891.
- Marinov I. (2008): *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2nd ed., Triton, Praha, Česká republika, 148 strán.
- Molad Y.M.D. (2002): Update on colchicine and its mechanism of action. *Current Rheumatology Reports* **4**, 252-256.
- Mon N.N., Ito S., Senga T., Hamaguchi M. (2006): FAK signaling in neoplastic disorders: a linkage between inflammation and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1086**, 199-212.
- Mueller M., Hobiger S., Jungbauer A. (2010): Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry* **122**, 987-996.
- Murphy H.S. (2011): *Inflammation*. In: *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine*. 6th ed., (Rubin R., Strayer D.S., Rubin E.), Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 47-82.
- Murphy H.S. (2014): *Inflammation*. In: *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine*. 7th ed., (Strayer D.S., Rubin E.), Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 55-94.
- Murphy K.M. (2014): *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. Taylor & Francis, Oxford, Velká Británie, 888 strán.
- Natarajan C., Bright J.J. (2002): Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *The Journal of Immunology* **168**, 6506-6513.
- Nishibori M., Takahashi H.K., Mori S. (2003): The regulation of ICAM-1 and LFA-1 interaction by autacoids and statins: a novel strategy for controlling inflammation and immune responses. *Journal of Pharmacological Sciences* **92**, 7-12.
- Nishina H., Wada T., Katada T. (2004): Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *The Journal of Biochemistry* **136**, 123-126.
- O'Neill J., Brock C., Olesen A.E., Andresen T., Nilsson M., Dickenson A.H. (2012): Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacological Reviews* **64**, 939-971.
- Ormerod M.G. (2000): *Flow Cytometry : A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, Velká Británie, 276 strán.
- Osborn L., Hession C., Tizard R., Vassallo C., Luhowskyj S., Chi-Rosso G., Lobb R. (1989): Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **59**, 1203-2011.
- Parsons J.T., Martin K.H., Slack J.K., Taylor J.M., Weed S.A. (2000): Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* **19**, 5606-5613.
- Pendurthi U.R., Williams J.T., Rao L.V.M. (1997): Inhibition of tissue factor gene activation in cultured endothelial cells by curcumin. Suppression of activation of transcription factors Egr-1, AP-1, and NF-kappa B. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **17**, 3406-3413.
- Perez G.R.M. (2001) : Anti-Inflammatory Activity of Compounds Isolated from Plants. *The Scientific World Journal* **29**, 713-784.
- Pluskota E., Chen Y., D'Souza S.E. (2000): Src homology domain 2-containing tyrosine phosphatase 2 associates with intercellular adhesion molecule 1 to regulate cell survival. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 30029-30036
- Qin W., Ho L., Pompl P.N., Peng Y., Zhao Z., Xiang Z., Robakis N.K., Shioi J., Suh J., Pasinetti G.M. (2003): Cyclooxygenase (COX)-2 and COX-1 Potentiate β -Amyloid Peptide Generation through Mechanisms That Involve γ -Secretase Activity. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 50970-50977.

- Raingeaud J., Gupta S., Rogers J.S., Dickens M., Han J., Ulevitch R.J., Davis R.J. (1995): Pro-inflammatory Cytokines and Environmental Stress Cause p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 7420-7426.
- Sagnia B., Fedeli D., Casetti R., Montesano C., Falcioni G., Colizzi V. (2014): Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Cassia alata*, *Eleusine indica*, *Eremomastax speciosa*, *Carica papaya* and *Polyscias fulva* medicinal plants collected in Cameroon. *PLoS One*, **9**:e103999. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103999>
- Salát D. a kolektív (2008): *Všeobecná patologická fyziológia*. Typi Universitatis Tyrnaviensis, Trnava, Slovenská republika, 173 strán.
- Schieven G.L. (2005): The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **5**, 921-928.
- Senftleben U., Cao Y., Xiao G., Greten F.R., Krähn G., Bonizzi G., Chen Y., Hu Y., Fong A., Sun S.C., Karin M. (2001): Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-1499.
- Stanton R.A., Gernert K.M., Nettles J.H., Aneja R. (2011): Drugs That Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective. *Medicinal Research Reviews* **31**, 443-481.
- Sun S.C. (2012): The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunological reviews* **246**, 125-140.
- Špalek P. (2011): Základné princípy terapie kortikosteroidmi pri autoimunitných neuromuskulárnych ochoreniach. *Neurológia pre prax* **6**, 368-372.
- Šteňová E., Koreň M. (2009): Systémová kortikoterapia – špecifická liečba kortikosteroidmi. *Ambulantná terapia* **1**, 38-42.
- Thring T.S., Hili P., Naughton D.P. (2011): Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *Journal of inflammation*, **8**:27. <http://www.journal-inflammation.com/content/8/1/27>
- Thompson J.E., Phillips R.J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Ghosh S. (1995): I kappaB-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* **80**, 573-582.
- Toman M. a kolektív (2009): *Veterinárni imunologie*. 2nd ed., Grada Publishing a.s., Praha, Česká republika, 392 strán.
- Traenckner E.B., Pahl H.L., Henkel T., Schmidt K.N., Wilk S., Baeuerle P.A. (1995): Phosphorylation of human I kappaB-alpha on serines 32 and 36 controls I kappaB-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *The EMBO Journal* **15**, 2876-2883.
- Unger C, Popescu R, Giessrigl B, Rarova L, Herbacek I, Seelinger M, Diaz R, Wallnöfer B, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T, Frisch R, Doležal K, Strnad M, De Martin R, Grusch M, Kopp B, Krupitza G. (2012): An apolar extract of *Critonia morifolia* inhibits c-Myc, cyclin D1, Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C and Akt and induces apoptosis. *The International Journal of Oncology* **40**, 2131-2139.
- Vancurova I., Vancura A. (2012): Regulation and function of nuclear I κ B α in inflammation and cancer. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* **1**, 56-66.
- Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. (1998): Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **38**, 97-120.
- Verma G., Datta M. (2012): The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death. *The Journal of Cellular Physiology* **227**, 1791-1795.
- Whiteside S.T., Epinat J.C., Rice N.R., Israël A. (1997): I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *The EMBO Journal* **16**, 1413-1426.
- Winyard P., Willoughby D.A., (2003): *Inflammation Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press, New York, NY, USA, 380 strán.
- Yang Y., Kim S.C., Yu T., Yi Y.S., Rhee M.H., Sung G.H., Yoo B.C., Cho J.Y. (2014): Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated

- inflammatory responses. *Mediators of inflammation*, **2014**:352371.
<http://www.hindawi.com/journals/mi/2014/352371/>
- Zagotta I., Dimova E.Y., Debatin K.M., Wabitsch M., Kietzmann T., Fischer-Posovszky P.(2015): Obesity and inflammation: reduced cytokine expression due to resveratrol in a human *in vitro* model of inflamed adipose tissue. *Frontiers in Pharmacology*, **6**:79.
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2015.00079/full>
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., Hayakawa M., Karin M. (1997): The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **91**, 243-252.
- Zarubin T., Han J. (2005): Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* **15**, 11-18
- Zhang F., Altorki N.K., Mestre J.R., Subbaramaiah K., Dannenberg A.J. (1999): Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis* **20**, 445-451.
- Zhang X., Chattopadhyay A., Ji Q.S., Owen J.D., Ruest P.J., Carpenter G., Hanks S.K. (1999): Focal adhesion kinase promotes phospholipase C- γ 1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9021-9026.
- Zhao M., New L., Kravchenko V.V., Kato Y., Gram H., di Padova F., Olson E.N., Ulevitch R.J., Han J. (1999): Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 21-30.
- Zhou H., Beevers C.S., Huang S. (2011): The targets of curcumin. *Current Drug Targets* **12**, 332-347.
- Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D.M. (2011): mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 21-35.

8.1. Zoznam použitých internetových odkazov

- Boston University : <http://www.bu.edu/nf-kb/> (25.6.2015).
- Cell Signaling 1: <http://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/9862?Ntt=mtor&fromPage=search> (20.6.2015)
- Cell Signaling 2: <http://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/4841?Ntt=cox-1&fromPage=search> (21.6.2015)
- Cell Signaling 3: <http://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/13009?Ntt=fak&fromPage=search> (28.6.2015)
- Cell Signaling Technology : http://www.cstj.co.jp/ddt/elisa_line.php (8.7.2015)
- Indonesian Neurobehavioural Science : http://neurobehaviour.files.wordpress.com/2011/07/450px-nfkb_mechanism_of_action.png (8.7.2015)
- Rai University : <http://www.slideshare.net/raiuniversity/bsc-biotech-ii-bat-unit-3-electrophoresis> (4.7.2015)

9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etylbenzthiazolin) sulfonová kyselina (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))
ACTH	adrenokortikotropný hormón (adrenocorticotropic hormone)
Akt	proteínkináza B (protein kinase B)
APS	peroxodisíran amonný (ammonium persulfate)
ATF	aktivujúci transkripčný faktor (activating transcription factor)
ATP	adenozíntrifosfát (adenosine triphosphate)
Bcl	lymfóm B buniek (B-cell lymphoma)
Bcl-xL	extra veľký lymfóm B buniek (B-cell lymphoma-extra large)
BSA	hovädzí sérový albumín (bovine serum albumin)
CD54	diferenciačný zhluk 54 (cluster of differentiation 54)
COPD	chronická obštrukčná choroba pľúc (chronic obstructive pulmonary disease)
COX	cyklooxygenáza (cyclooxygenase)
DTT	dithiothreitol (dithiothreitol)
EDTA	etyléndiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
ERK	extracelulárna signálom regulovaná proteínkináza (extracellular signal-regulated protein kinase)
FAK	fokálna adhézna kináza (focal adhesion kinase)
GβL	podjednotka podobná G proteínu beta (G protein beta subunit-like)
Gly	glycín
HUVEC	ľudské endotelové bunky z umbilikálnej žily (Human umbilical vein endothelial cell)
ICAM-1	vnútrobunková adhézna molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)
Ig	imunoglobulín
IgSF	imunoglobínová superrodina (immunoglobulin superfamily)
IκB	inhibítor kappa B (inhibitor of kappa B)
IKK	IκB kináza (IκB kinase)
IL	interleukín (interleukin)
ImSAID	imunitné selektívne protizápalové deriváty (immune selective anti-inflammatory derivatives)
INF	interferón (interferon)
JNK	Jun amino-koncová kináza (Jun amino-terminal kinase)
LBP	lipopolysacharid-väzbový proteín (lipopolysaccharide-binding protein)
LFA	s lymfocytou funkciou spájaný antigén (lymphocyte function-associated antigen)
LOX	lipooxygenáza (lipoxygenase)
LPS	lipopolysacharid (lipopolysaccharide)
LRR	laboratórium rastových regulátorov
LTA	kyselina lipoteichová (Lipoteichoic acid)
Lys	lyzín
MAP	mitogénom aktivovaný proteín (mitogen-activated protein)
MAPK	mitogénom aktivovaná proteínkináza (mitogen-activated protein kinase)
MKK	mitogénom aktivovaná proteínkináza kináza (Mitogen-activated protein kinase kinase)
MMP	matrixová metaloproteináza (Matrix metalloproteinase)
mTOR	cicavčí/mechanický cieľ pre rapamycín (mammalian/mechanistic target of rapamycin)
mTORC	komplex cicavčieho cieľu pre rapamycín (mammalian target of rapamycin complex)
NF-κB	zosilovač ľahkého reťazca jadrového faktoru kappa aktivovaných B buniek (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NK bunky	prirodzené zabíjačské bunky (natural killer cells)
NLS	jadrové lokalizačné signály (nuclear localization signals)
NSAID	nesteroidné protizápalové lieky (non-steroidal anti-inflammatory drugs)
OChBG	oddelení chemické biológie a genetiky
p38 ^{MAPK}	p38 mitogénom aktivovaná proteínkináza (p38 mitogen-activated protein kinase)
p53	nádorový proteín p53 (tumor protein p53)
PBS	fosfátový pufer (phosphate-buffered saline)
PG	prostaglandín
PIKK	kinázy príbuzné s fosfatidylinositol-3-kinázou (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases)
PKC	proteínkináza C (protein kinase C)
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid (phenylmethanesulfonylfluoride)
Pro	prolín
RE	regulačné elementy (regulatory elements)
RHD	Rel homológna doména (Rel homology domain)
RIPA	pufer s rádioaktívne značenou protilátkou (Radioimmunoprecipitation assay buffer)
ROS	reaktívne formy kyslíku (reactive oxygen species)
SAPK	stresom aktivovaná proteínkináza (Stress-activated protein kinase)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
SEK	SAPK/ERK kináza (SAPK/ERK kinase)
Ser	serín
SGK	sérom a glukokortikoidom regulovaná kináza (serum and glucocorticoid-regulated kinase)
Sin1	stresom aktivovaná proteínkináza interagujúca s proteínom 1 (stress-activated protein kinase interacting protein 1)
Tak	TGF aktivovaná kináza (TGF activated kinase)
TBS	tris pufer (tris-buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (tetramethylethylenediamine)
TGF	transformujúci rastový faktor (transforming growth factor)
Thr	treonín
TNF	faktor nádorovej nekrózy (tumor necrosis factor)
TNFR	receptor faktoru nádorovej nekrózy (tumor necrosis factor receptor)
TOR	cieľ rapamycínu (target of rapamycine)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan (tris(hydroxymethyl)aminomethane)
Tyr	tyrozín
UV	ultrafialové žiarenie (ultraviolet)
VCAM-1	adhéznna molekula cievnej bunky 1 (vascular cell adhesion molecule 1)