

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Transdermální transport a bezpečnost  
přírodních látek**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Lucie Novotná</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2. května 2013

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 2.5.2013

.....

Bc. Lucie Novotná

#### Poděkování

Velké poděkování patří vedoucí této práce doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, velkou obětavost a trpělivost při práci v laboratoři a vypracování této práce. Dále děkuji Mgr. Pavlu Kosinovi, Ph.D. za stanovení obsahu alkaloidů ve vzorcích metodou HPLC/ESI-MS a paní Jitce Šťastné z Ústavu histologie a embryologie LF UP za nařezání kůže kryostatem. Také děkuji pracovníkům Oddělení plastické a estetické chirurgie Fakultní nemocnice Olomouc za odběr kůže a všem dárcům za poskytnutí kůže pro experimentální účely. Děkuji prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. za možnost vypracovat diplomovou práci na Ústavu lékařské chemie a biochemie a všem zaměstnancům za příjemné prostředí. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu během celého studia.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Lucie Novotná
Název práce	Transdermální transport a bezpečnost přírodních látek
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Lidská kůže není zcela nepropustná, proto je důležité znát její propustnost pro látky, které se používají v řadě dermatologických a kosmetických přípravků. U benzo[c]-fenanthridinového alkaloidu sanguinarinu (SG) při topické aplikaci není známa bezpečnost jeho použití. Studie prokázala, že SG je pro kožní fibroblasty toxický (<math>IC_{50} = 1,94 \mu\text{mol/l}</math>) a je těmito buňkami přeměňován na méně cytotoxický metabolit dihydrosanguinarin (DHSG, <math>IC_{50} &gt; 50 \mu\text{mol/l}</math>). DHSG je účinkem UVA záření přeměňován na SG a <math>IC_{50}</math> klesá na hodnotu <math>0,625 \mu\text{mol/l}</math>. Při této konverzi dochází k produkci reaktivních forem kyslíku, které jsou zodpovědné za tvorbu jednovláknových zlomů DNA. <i>In vitro</i> při použití difuzních komůrek s lidskou kůží bylo zjištěno, že oba alkaloidy SG i DHSG se váží jen do vrstvy <i>stratum corneum</i> (SC) a neprochází do hlubších vrstev kůže. Při použití zamražené kůže byla pozorována vyšší akumulace těchto látek v SC v porovnání s čerstvou kůží. Topická aplikace SG/DHSG může být spojena s fototoxickou reakcí, čehož by se mohlo využít ve fotodynamické terapii při léčbě nemocí kůže.</p>
Klíčová slova	transdermální transport, difuzní komůrky, sanguinarin, dihydrosanguinarin, fototoxicita, metabolismus
Počet stran	82
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Lucie Novotná
Title	Transdermal transport and safety of natural substances
Type of thesis	Master
Department	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc
Supervisor	Doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>Human skin isn't completely impermeable, therefore the permeability for substances, which are used in the dermatologic and cosmetic products is important to know. The safety of topical application of benzo[c]phenanthridine alkaloid sanguinarine (SG) is unknown to date. In this study SG was toxic for dermal fibroblasts (<math>IC_{50} = 1.94 \mu\text{mol/l}</math>) and the cells transformed SG to less cytotoxic metabolite dihydrosanguinarine (DHSG, <math>IC_{50} &gt; 50 \mu\text{mol/l}</math>). UVA part of solar radiation induced the back conversion to SG and the <math>IC_{50}</math> value dropped to <math>0.625 \mu\text{mol/l}</math>. This conversion led to the overproduction of reactive oxygen species, which are responsible for the formation of DNA single-strand breaks. SG and DHSG accumulated only into the <i>stratum corneum</i> (SC) layer of the epidermis and not in the deeper layers of skin as observed <i>in vitro</i> using diffusion cells with human skin. These substances were found in higher amount in SC of frozen skin compared to fresh one. Topical application of SG/DHSG may be associated with phototoxic reactions; these substances could be useful in photodynamic therapy for the treatment of skin diseases.</p>
Keywords	transdermal transport, diffusion cells, sanguinarine, dihydrosanguinarine, phototoxicity, metabolism
Number of pages	82
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>- 9 -</b>
2.1.KŮŽE .....	- 9 -
2.1.1. Pokožka (epidermis) .....	- 9 -
2.1.2. Škára (dermis, corium).....	- 11 -
2.1.3. Podkožní vazivo (subcutis, tela subcutanea) .....	- 11 -
2.1.4. Funkce kůže .....	- 11 -
2.1.5. Kožní bariéra .....	- 12 -
2.2.TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE .....	- 13 -
2.2.1. Testování <i>in vitro</i> .....	- 14 -
2.2.2. Testování <i>in vivo</i> .....	- 14 -
2.2.3. Faktory ovlivňující transdermální absorpci .....	- 15 -
2.2.3.1. Druh kůže .....	- 15 -
2.2.3.2. Místo odběru .....	- 15 -
2.2.3.3. Věk .....	- 16 -
2.2.3.4. Pohlaví.....	- 16 -
2.2.3.5. Barva kůže .....	- 16 -
2.2.3.6. Teplota kůže .....	- 16 -
2.2.3.7. Hydratace .....	- 17 -
2.2.3.8. Stav kůže .....	- 17 -
2.2.4. Difuzní komůrky .....	- 17 -
2.2.4.1. Statické vertikální difuzní komůrky .....	- 17 -
2.2.4.2. Průtokové vertikální difuzní komůrky.....	- 18 -
2.2.5. Testovaná látka .....	- 18 -
2.2.6. Receptorová tekutina .....	- 19 -
2.2.7. Příprava kůže .....	- 19 -
2.2.8. Průběh testování.....	- 20 -
2.2.9. Metabolismus .....	- 21 -
2.2.10. Transportéry v kůži .....	- 22 -
2.2.11. Zpracování výsledků .....	- 22 -
2.3.BENZO[C]FENANTRIDINOVÉ ALKALOIDY .....	- 24 -
2.3.1. Sanguinarin .....	- 24 -
2.3.1.1. Biosyntéza sanguinarinu .....	- 25 -
2.3.1.2. Chemické vlastnosti .....	- 29 -
2.3.1.3. Fluorescence .....	- 30 -

2.3.1.4. Metabolická transformace v živočišných buňkách .....	- 30 -
2.3.1.5. Biologická aktivita.....	- 31 -
2.3.1.6. Využití SG .....	- 33 -
2.4.SLUNEČNÍ ZÁŘENÍ .....	- 34 -
2.4.1. Fototoxicita .....	- 35 -
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>- 36 -</b>
3.1.BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	- 36 -
3.1.1. Alkaloidy .....	- 36 -
3.1.2. Kůže .....	- 36 -
3.1.3. Buňky .....	- 36 -
3.2.CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, ROZTOKY, OSTATNÍ MATERIÁL.....	- 36 -
3.2.1. Chemikálie.....	- 36 -
3.2.2. Přístroje .....	- 37 -
3.2.3. Roztoky.....	- 37 -
3.2.4. Ostatní materiál .....	- 38 -
3.3.METODY .....	- 39 -
3.3.1. Kultivace fibroblastů.....	- 39 -
3.3.2. Příprava fibroblastů pro experimenty .....	- 39 -
3.3.3. Nanesení látek na buňky .....	- 40 -
3.3.4. Cytotoxicita alkaloidů .....	- 40 -
3.3.4.1. Měření cytotoxicity stanovením aktivity LDH v médiu .....	- 40 -
3.3.4.2. Měření cytotoxicity pomocí neutrální červeně.....	- 40 -
3.3.5. Fototoxicita alkaloidů .....	- 41 -
3.3.5.1. Ozáření buněk .....	- 41 -
3.3.6. Stanovení reaktivních forem kyslíku.....	- 42 -
3.3.6.1. Stanovení proteinů bicinchoninovou metodou (BCA) .....	- 42 -
3.3.7. Transformace SG a DHSG .....	- 42 -
3.3.8. Jednobuněčná gelová elektroforéza .....	- 43 -
3.3.8.1. Vyhodnocení .....	- 44 -
3.3.9. Stanovení životnosti pomocí mitochondriálního potenciálu .....	- 44 -
3.3.10. Transdermální transport.....	- 45 -
3.3.11. HPLC/ESI-MS.....	- 46 -
3.3.12. Statistická analýza .....	- 46 -
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>- 47 -</b>
4.1.Toxicita sanguinarinu (SG), dihydrosanguinarinu (DHSG) na lidských kožních fibroblastech měřená změnou aktivity laktátdehydrogenasy (LDH) v médiu.....	- 47 -

4.2.Fototoxicita SG, DHSG vyvolaná složkami UV záření na lidských kožních fibroblastech měřená inkorporací neutrální červeně .....	- 48 -
4.2.1. Fototoxicita vyvolaná UVA zářením .....	- 48 -
4.2.2. Fototoxicita vyvolaná UVB zářením .....	- 51 -
4.3.Poškození DNA fibroblastů po působení SG, DHSG a v kombinaci s UV zářením metodou SCGE .....	- 53 -
4.3.1. Fototoxicita vyvolaná UVA zářením .....	- 53 -
4.3.2. Fototoxicita vyvolaná UVB zářením .....	- 54 -
4.4.Stanovení fototoxicity SG a DHSG měřením mitochondriálního potenciálu .....	- 55 -
4.5.Produkce ROS při UVA- a UVB-fototoxické reakci vyvolané studovanými alkaloidy .....	- 56 -
4.5.1. UVA záření .....	- 57 -
4.5.2. UVB záření .....	- 58 -
4.6.Transformace SG a DHSG .....	- 60 -
4.7.Transdermální transport .....	- 62 -
4.7.1. Transdermální transport SG.....	- 62 -
4.7.2. Transdermální transport DHSG .....	- 65 -
<b>5. DISKUSE .....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>- 70 -</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>- 71 -</b>
<b>8. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>- 82 -</b>

# 1. CÍLE PRÁCE

Testování průniku sanguinarinu a dihydrosanguinarinu přes lidskou kůži použitím difuzních statických vertikálních komůrek.

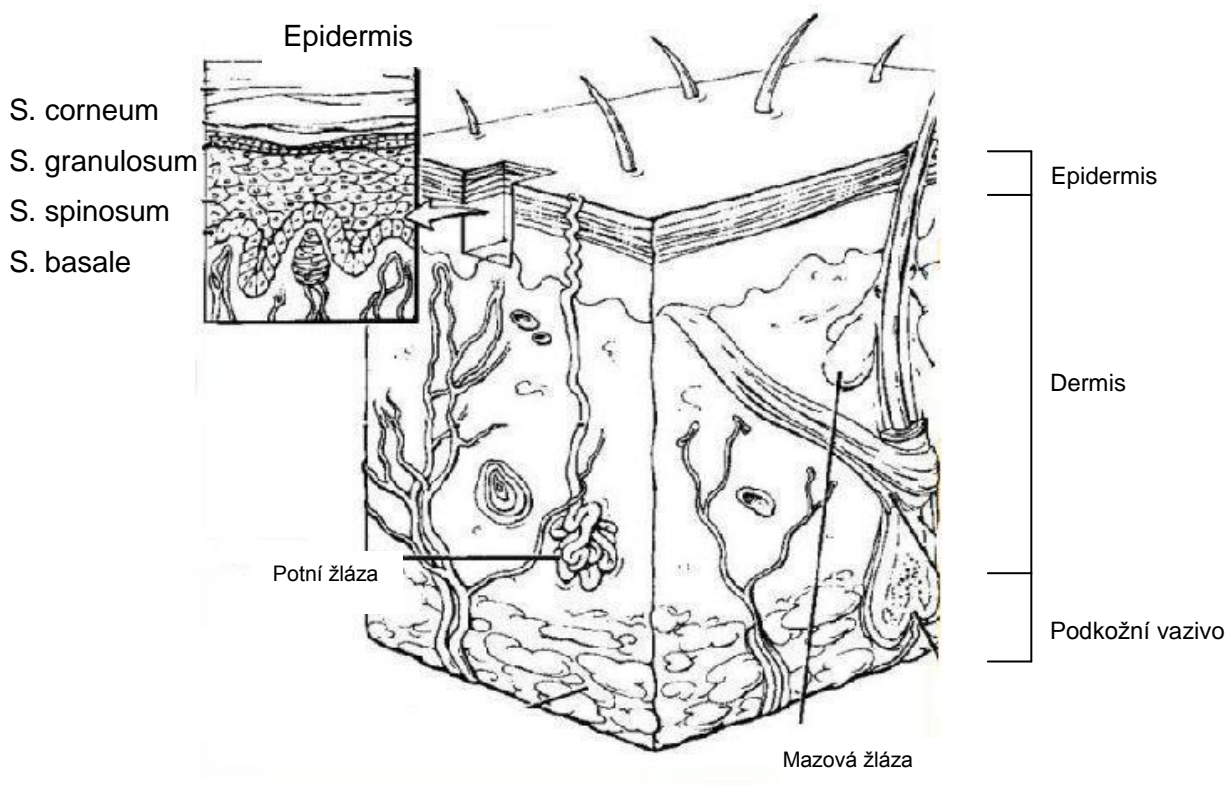
Stanovení cytotoxicity a bezpečnosti sanguinarinu a dihydrosanguinarinu v kombinaci s UVA a UVB zářením.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. KŮŽE

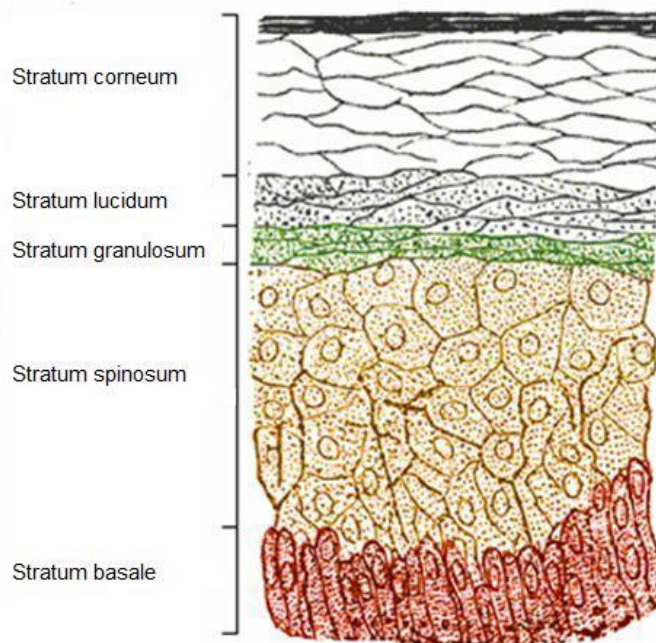
Lidská kůže je orgán pokrývající celé tělo a odděluje tak vnitřní prostředí organismu od vnějšího prostředí. Kůže dospělého člověka zaujímá plochu průměrně 1,6 – 1,8 m<sup>2</sup>. Hmotnost kůže dosahuje 3 kg, ve spojení s tukem může vážit až 20 kg. Její tloušťka se pohybuje v rozmezí 0,5 – 4 mm podle oblasti těla. Skládá se z pokožky, škály a podkožního vaziva (obr. 1).



Obr. 1 Stavba kůže (www.liposukce.cz)

#### 2.1.1. Pokožka (epidermis)

Pokožka je tvořena mnoha vrstvami buněk dlaždicového epitelu. Kromě keratinocytů, které jsou zastoupené v největším množství a nachází se v různém stupni diferenciaci v jednotlivých vrstvách pokožky (obr. 2), obsahuje i melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky.



Obr. 2 Jednotlivé vrstvy pokožky. Upraveno dle [www.exbio.com](http://www.exbio.com).

Nejhlouběji v pokožce je uložena zárodečná vrstva keratinocytů (*stratum germinativum*), u které se rozlišuje vrstva *stratum basale*, jejíž basální buňky se mitoticky dělí, a *stratum spinosum*. V dalších vrstvách keratinocytů, které směřují k povrchu kůže, dochází k charakteristickým změnám, které vedou až k odumření keratinocytů (buněčné smrti). Po vrstvě *stratum spinosum* se směrem k povrchu kůže nachází *stratum granulosum*, kde cytoplazma keratinocytů obsahuje keratohyalin, prekurzor keratinu. Po ztrátě buněčného jádra se vrstva mění ve *stratum lucidum*. Buňky této tenké vrstvy obsahují další prekurzor keratinu eleidin. *Stratum lucidum* přechází v rohovou vrstvu *stratum corneum* (dále jen SC), která tvoří hlavní bariéru organismu vůči okolí. SC je tvořeno přibližně 20 vrstvami bezjaderných keratinocytů – korneocytů. Buňky této vrstvy mají minimální obsah vody a obsahují vláknitou bílkovinu keratin, jejíž disulfidické můstky zajišťují pevnost a pružnost. Nejvrchnější vrstva korneocytů se přeměňuje na zbytky buněk (*stratum disjunctum*), které se odlupují v podobě drobných šupinek (deskvamace). Proces zrání keratinocytů se nazývá keratinizace, při čemž obměna epidermis trvá asi 1 měsíc.

Melanocyty jsou dendritické buňky v bazální vrstvě epidermis, které se nachází nejvíce v trvale osvětlených částech těla (obličej, hřbet ruky). Obsahují specializovaná tělíčka melanosomy produkující melanin. Melanosomy přechází dendritickými výběžky do okolních keratinocytů, především v zárodečné vrstvě, v nichž se hromadí kolem jádra a slouží jako ochrana genetické informace před UV zářením.

Langerhansovy buňky mají funkci v imunitním systému, konkrétně v rozpoznání a zpracování antigenu. Vyznačují se velkou citlivostí na UV záření.

Merkelovy buňky jsou součástí komplexu zvaného Merkelova ploténka (Merkelova buňka, nervová zakončení, Schwanova buňka). Z důvodu přítomnosti nervového zakončení, Merkelovy buňky zřejmě slouží jako mechanoreceptory (Čihák, 2004).

### **2.1.2. Škára (dermis, corium)**

Škára je fibroelastické kolagenní vazivo připojené k pokožce bazální membránou. Lze ji rozdělit na vrstvu papilární (*stratum papillare*) a vrstvu retikulární (*stratum reticulare*). Převládajícími typy buněk jsou fibroblasty, mastocyty a makrofágy (Riviere, 2006).

Fibroblasty mají oválné jádro a vřetenovitý tvar s výběžky. Jsou mitoticky aktivní, patří mezi kmenové buňky. Fibroblasty jsou zřejmě nejméně specializovanými buňkami pojivové tkáně, proto se mohou přeměnit na tukové buňky adipocyty, dále osteocyty, chondrocyty a svalové buňky (Alberts et al., 2008). Fibroblasty se zapojují i do procesu hojení ran.

Ve škáře jsou přítomny mazové a potní žlázy, vlasové folikuly a krevní cévy, které zásobují živinami i buňky v epidermis. V dermis se vyskytuje řada nervových vláken - Meissnerova tělíska (receptory hmatových vjemů), Ruffiniho tělíska (receptory tepla) a Krauseho tělíska (receptory chladu) (Čihák, 2004).

### **2.1.3. Podkožní vazivo (subcutis, tela subcutanea)**

Podkožní vazivo zajišťuje spojení dermis s povrchovou fascií nebo periostem (okosticí) pomocí vazivových pruhů. Mezi nimi jsou uloženy tukové buňky, které slouží jako skladiště zásobních látek, mají ochrannou, termoregulační a mechanickou funkci. Podkožní vazivo je i místem výskytu Vater-Paciniho tělísek (receptory tlaku a tahu) (Čihák, 2004).

### **2.1.4. Funkce kůže**

Nejdůležitější funkcí kůže je tvorba efektivní bariéry mezi vnějším a vnitřním prostředím organismu. Fyzikální bariéru zajišťuje rohová vrstva, mezibuněčné spojení, dermoepidermální funkce a podkožní tuková tkáň. Chemická/biochemická bariéra je tvořena z vysoce organizovaných tuků, kyselin, hydrolytických enzymů, antimikrobiálních peptidů a makrofágů. Imunologická bariéra je zajištěna humorálními a buněčnými složkami imunitního systému (Proksch et al., 2008). Všechny složky těchto bariér se podílí na ochraně organismu před alergeny, toxickými chemikáliemi a

mikroorganismy (včetně bakterií, hub, parazitů a virů) žijících ve vnějším prostředí. Chrání organismus i před UV zářením.

Přítomnost receptorů umožňuje vnímání tepla, chladu a tahu. Funkce v regulaci tělesné teploty spočívá v zúžení cév (vazokonstrikce) ve chladném prostředí, v opačném případě dochází k rozšíření cév (vazodilatace). Ztráta přebytečného tepla je usnadněna odpařením potu. Pot je sekret potních žláz, které spolu s mazovými žlázami zajišťují vylučování látek z těla a podílí se na exkreční funkci.

Díky resorpční funkci je možné přes kůži podávat léčivé přípravky v podobě mastí nebo adhesivních náplastí. K usnadnění průniku léčiv přes kůži se používají akceleranty neboli urychlovače transdermální penetrace, které slouží ke snížení bariérové vlastnosti kůže (Hrabálek et al., 1999). Kůže je schopna metabolizovat některé sloučeniny po absorpci, které se snadněji vylučují.

Stavba kůže minimalizuje ztrátu vody z organismu a brání jeho dehydrataci. Malé množství vody v kůži, kyselé pH (kolem 5) a přítomnost nepatogenních mikroorganismů ve *stratum corneum* vytváří nepříznivé podmínky pro růst patogenů (Elias, 2007).

### **2.1.5. Kožní bariéra**

Objasnění bariérové funkce je možné detailním popisem chemického složení SC. SC je tvořeno ze 75 – 85 % proteinů, 5 – 15 % lipidů, zbytek představuje další organické sloučeniny a voda. Proteiny jsou hlavně v korneocytech, buňkách vysoce nerozpustných a odolných na působení chemikálií. Mezibuněčný prostor rohové vrstvy je vyplněn směsí lipidů, tvořící lamely, které se skládají do několika dvojrstev hydrofobní částí dovnitř a hydrofilní vně. Lamely jsou složeny z ceramidů (50 %), cholesterolu (25 %), který zastává funkci stabilizátora lipidických struktur v SC, a volných mastných kyselin (10 %). V menším množství jsou zastoupeny estery cholesterolu s organickými kyselinami, cholesterol-sulfát a glukosylceramidy (Hrabálek & Vávrová, 2005). Základem ceramidu, nejdůležitější složky mezibuněčných lipidových lamel, jsou bazické alkoholy např. sfingosin, fytosfingosin a hydroxysfingosin. Propustnost ceramidových lamel je tisíckrát nižší než u fosfolipidových dvojrstev díky menší polární hlavě a delšímu hydrofobnímu řetězci (Vávrová & Hrabálek, 2006).

Zásadou tohoto složení je SC mimořádně odolná vrstva proti fyzikálním a chemickým vlivům. Přesto rohová vrstva pokožky není stoprocentně nepropustná, prochází přes ni některé tekutiny a plyny. Lze říci, že přes pokožku prochází látky s menší molekulou, při čemž platí, že lépe pronikají látky rozpustné v tucích než ve vodě (Čihák, 2004).

## 2.2. TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE

Látky mohou do vnitřního prostředí organismu přecházet přes kůži pěti možnými cestami (Hrabálek et al., 1999). Nejvíce látek prochází transcelulární cestou, tzn. přes korneocyty v rohové vrstvě a keratinocyty ve zbývajících vrstvách epidermis. Další možností přechodu je intercelulární cesta přes mezibuněčné prostory, cesta přes vlasové folikuly, mazové žlázy a vývody potních žláz (Kotingová et al., 2009).

Chemické látky prostupují kůží pasivní difuzí, která je řízena termodynamickou silou, aktivní transport nehraje žádnou roli. Difuze je popsána Fickovým zákonem podle vzorce (1), který uvádí, že tok látky membránou je přímo úměrný rozdílu koncentrací na obou stranách membrány:

$$J = -D * \frac{(\partial C)}{(\partial x)} \quad (1)$$

kde J je tok látky ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), který je definován jako množství látky přenesené difuzí za jednotku času; D je difuzní koeficient ( $\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ), který má význam rychlostní konstanty difuze;  $\delta C$  je rozdíl koncentrací ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ),  $\delta x$  je vzdálenost difuzní dráhy (cm),  $\delta C / \delta x$  je koncentrační gradient ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-4}$ ).

Pro kvantifikaci transdermální absorpce je Fickův zákon upraven na tvar vzorce (2):

$$J = \frac{D \cdot PC}{h} \Delta C * A \quad (2)$$

kde D je difuzní koeficient nebo difuzivita látky v intercelulárních lipidech SC, PC je rozdělovací koeficient látky mezi SC a aplikovanou látkou v roztoku, h je tloušťka kůže nebo aktuální délka dráhy difuze související se zakřiveností intercelulárních drah v kůži, která závisí na velikosti korneocytů, prostoru mezi buňkami a počtu buněčných vrstev,  $\Delta C$  je koncentrační gradient mezi aplikovanou dávkou a receptorovým médiem a A je aplikovaná dávka na plochu kůže. Řídící silou pro tento termodynamický proces je koncentrační gradient, který existuje mezi aplikovanou dávkou a dermálním perfuzátem nebo krví.

Koeficient propustnosti  $K_p$  ( $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$ ) je určen jako  $D \cdot PC / h$ . Kineticky je  $K_p$  rychlostní konstantou 1. řádu, která tvoří základ pro absorpční rychlostní konstantu  $K_a$  používanou ve farmakologických modelech popisujících perkutánní absorpci a transdermální podávání léčiv. Po dosažení konstantní rychlosti absorpce se ustálí průtok látky  $J_{ss}$  (steady state-flux,  $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).  $J_{ss}$  je důležitý pro určení koeficientu propustnosti, který lze určit ze vzorce (3):

$$Kp = \frac{J_{ss}}{A * C} \quad (3)$$

kde C je koncentrace aplikované látky na kůži ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) (Riviere, 2010).

Difuzivita látky závisí na molekulové hmotnosti, rozpustnosti látky ve vrstvách kůže, stupni ionizace látky a na její interakci se složkami kůže (např. vodíkové vazby a

hydrofobní interakce). Látky s molekulovou hmotností vyšší než 500 Da (např. proteiny a nanočástice) mají extrémně nízkou difuzivitu, neobyčejně dlouhou dobou do začátku pronikání látky kůží (lag time) a jejich absorpční rychlost je velmi malá (Riviere, 2010).

Podle rozsahu průniku látky do kůže se průnik rozlišuje na adsorpci, kdy se látka váže pouze v rohové vrstvě, z níž je odstraněna s odlupujícími se buňkami, a absorpci, při níž se látka dostává až do škáry, a tudíž do celého organismu. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je absorpce globální termín, který popisuje transport látky z povrchu kůže do systémové cirkulace, proto je absorpce dále rozdělena na penetraci (vstup látky do rohové vrstvy), permeaci (vstup látky do další vrstvy, která se strukturálně a funkčně liší) a resorpci (vstup látky do lymfatického a krevního systému v kůži a většinou až do systémové cirkulace).

Obecně lze rozdělit metody na měření přestupu chemických látek kůží na *in vitro* a *in vivo*. Tato diplomová práce se zabývá metodou *in vitro*. Stručné informace o testování *in vivo* jsou uvedeny pro srovnání.

### **2.2.1. Testování *in vitro***

*In vitro* metody jsou určeny pro měření penetrace chemikálie do kůže a následné permeace přes kůži. Pro určení míry penetrace a permeace se využívá zamražená i čerstvá, metabolicky aktivní kůže, která se dá také použít pro studium metabolismu látky/látek. Permeační vlastnosti SC zůstávají nezměněny po excizi z těla, tudíž pokusy *in vitro* jsou vhodné pro předpověď dermální penetrace. Při srovnávání absorpce *in vitro* a *in vivo* nebyly zjištěny významné rozdíly v naměřených hodnotách (Bronaugh & Franz, 1986; Wester et al., 1992). *In vitro* testování nabízí řadu výhod včetně širšího výběru dárců kůže, lepší reprodukovatelnosti výsledků, úspor nákladů a času (van Ravenzwaay & Leibold, 2004).

### **2.2.2. Testování *in vivo***

Hlavní výhodou *in vivo* studií je použití fyziologicky a metabolicky neporušeného systému. Studie se provádějí na laboratorních zvířatech, obvykle hlodavcích, a lidech. Dobrovolníci jsou využíváni hlavně v případě testování humánních farmaceutik, ale použití toxických chemikálií je značně omezeno. Nevýhodou využití laboratorních zvířat je odlišnost ve stavbě a propustnosti kůže ve srovnání s lidskou kůží a navíc je u nich nutné chránit místo aplikace před požitím.

Testovaná látka je aplikována ve vhodném rozpouštědle do vymezeného místa na kůži jedince. V určitých intervalech jsou odebírány tělní tekutiny (krev, moč) a exkrementy. Množství látky a/nebo jejího metabolitu je měřeno vhodnými analytickými

metodami. Další možnou technikou pro měření transdermálního transportu exogenních látek v extracelulárním prostoru pod kůží je mikrodialýza (Anderson et al., 1998).

### **2.2.3. Faktory ovlivňující transdermální absorpci**

Transdermální absorpce závisí na 1) fyzikálně-chemických vlastnostech testované sloučeniny, 2) fyzikálně-chemických vlastnostech donorové tekutiny, ve které je testovaná látka rozpuštěna, 3) interakci mezi testovanou látkou nebo donorovou tekutinou a kůží, 4) vlastnostech kůže, 5) dávce a objemu testované látky, 6) délce expozice (WHO, 2006).

#### **2.2.3.1. Druh kůže**

Z důvodu omezené dostupnosti lidské kůže je transdermální transport studován i na laboratorních zvířatech (např. myš, potkan, morče, králík), u kterých je kůže mnohem více propustná pro většinu chemikálií díky odlišné stavbě kůže. Kůže potkana je v porovnání s lidskou kůží přibližně jedenáctkrát více propustná (van Ravenzwaay & Leibold, 2004).

Vzhledem ke strukturní podobnosti lidské kůže s prasečí, zejména v oblasti ušního boltce, je prasečí kůže často v experimentech využívána pro odhad průniku látek lidskou kůží *in vitro*. Významnou roli zde hraje její poměrně snadná dostupnost (Singh et al., 2002; Sato et al., 1991; Dick et al., 1992).

Alternativou ke kůži lidské jsou ekvivalentní modely živé kůže (living skin equivalent models, LSEs) a modely lidské epidermis (human reconstructed epidermis, HRE). Obecně jsou tyto modely vytvořené z lidských buněk pěstovaných jako tkáňové kultury. LSEs obsahují epidermis, dermis a částečně diferencované SC, nicméně postrádají vlasové folikuly, mazové a potní žlázy (Netzlaff et al., 2005).

Komerčně dostupné modely lidské epidermis SkinEthic, EpiSkin a EpiDerm jsou podobné lidské tkáni z hlediska stavby, složení lipidů a biochemických markerů (Netzlaff et al., 2005; Monteiro-Riviere et al., 1997). Největším omezením těchto modelů je mnohem výraznější propustnost, proto je doporučeno jejich použití jen pro orientační testování absorpce. Modely byly označeny spíše jako pomůcky pro testování fototoxicity a dráždivých účinků kosmetických přísad (Wells et al., 2004).

#### **2.2.3.2. Místo odběru**

Struktura kůže se neliší jen mezi jednotlivci, ale také v různých anatomických oblastech v rámci jedince. Například epidermis je 13 krát silnější na chodidlech a dlaních než na očních víčkách nebo rtech (Williams, 2003). Avšak Wester & Maibach

(1992) uvádí, že rozdíl v absorpci lze vidět u míst se stejnou tloušťkou SC a stejná místa s rozdílnou tloušťkou SC vykazují podobný stupeň absorpce.

Obecně se uvádí, že úroveň dermální propustnosti klesá v pořadí genitálie, hlava a krk, trup (hrudník, břicho, záda), ruce, nohy (Williams, 2003).

#### **2.2.3.3. Věk**

Roskos et al., 1989 prokázal, že absorpce méně lipofilních sloučenin: kyseliny benzoové, salicylové a kofeinu byla výrazně nižší u starších lidí. Stejná studie potvrdila, že absorpce hydrofobních látek zůstává věkem neovlivněna. Možné vysvětlení je ve snížené hydrataci kůže a v nižší aktivitě mazových žláz, která vede k poklesu množství lipidů na povrchu kůže. Propustnost novorozenecké pokožky je vysoká (Evans et al., 1985), po 3 měsících od narození dosahuje kůže bariérové schopnosti dospělého jedince (Williams, 2003).

#### **2.2.3.4. Pohlaví**

Jedním z rozdílů mezi mužskou a ženskou kůží je velikost keratinocytů. U žen jsou o něco větší (37-46  $\mu\text{m}$ ) než u mužů (34-44  $\mu\text{m}$ ) (Williams, 2003). Muži mají větší mazové a potní žlázy, které jsou aktivnější (Giacomoni et al., 2009). Kůže žen je charakteristická vyšším pH ( $5,6 \pm 0,4$ ) než kůže mužů ( $4,3 \pm 0,4$ ) (Jacobi et al., 2005). Nicméně většina studií nepotvrdila rozdíl v propustnosti kůže mezi oběma pohlavími (Singh & Morris, 2011).

#### **2.2.3.5. Barva kůže**

Při měření absorpce kyseliny benzoové, kofeinu a kyseliny acetylsalicylové nebyly zaznamenány rozdíly mezi kůží Evropana, Afričana a Asiata. Je třeba zdůraznit, že všechny zkoumané látky byly hydrofilní (Lotte et al., 1993). Přesto jsou mezi rasami významné rozdíly v obsahu vody ve SC (Berardesca et al., 1991).

#### **2.2.3.6. Teplota kůže**

Zvýšená teplota zvyšuje rychlost průniku látek kůží, a to přímým ovlivněním procesu difuze (Scheuplein & Blank, 1971). Teplota může mít vliv také na krystalickou strukturu lipidové dvojvrstvy ve SC (Pilgram et al., 1999) a na průtok krve kůží (Cross & Roberts, 2005). Oba účinky se mohou podílet na zvýšeném průniku látek.



### **2.2.3.7. Hydratace**

SC obsahuje za normálních podmínek 5-20 % vody, po hydrataci až 50 %. Zvýšená hydratace SC vede ke zvýšené propustnosti mnoha látek (Williams, 2003). Opačný účinek byl zaznamenán u hydrofilní sloučeniny kortisolu (Buck et al., 1991).

### **2.2.3.8. Stav kůže**

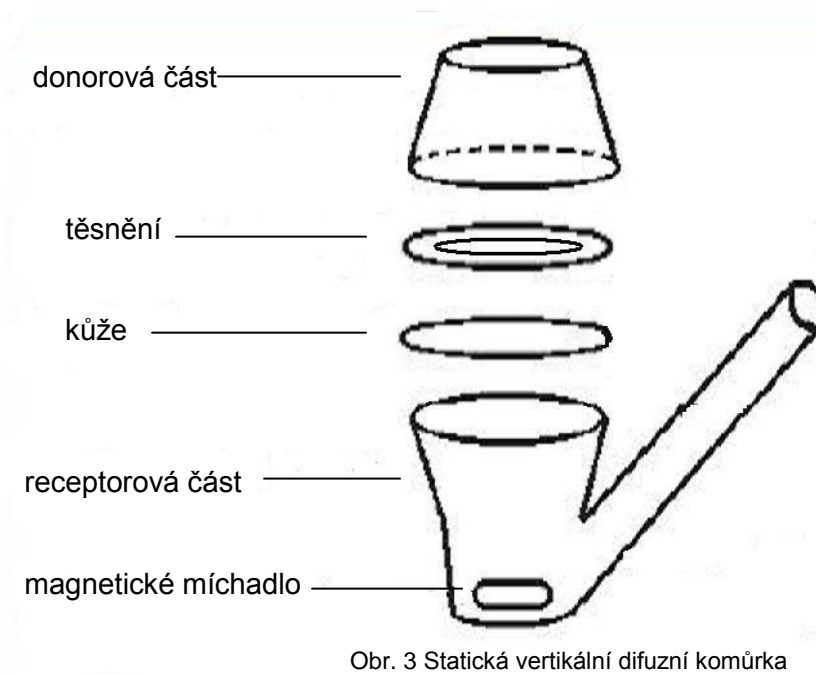
Narušení bariérové funkce kůže může mít významný vliv na penetraci a permeaci látek. Propustnost kůže může být zvýšena fyzikálními (sluneční záření, okluze, mechanické poškození, teplota a vlhkost okolního prostředí), chemickými (rozpouštědla, detergenty, kyseliny, louhy) a patologickými faktory (atopický ekzém, psoriáza, infekce) (Wiechers, 1989). Polární a nepolární rozpouštědla narušují lipidové vrstvy a masivně snižují bariérové funkce kůže.

## **2.2.4. Difuzní komůrky**

Nejběžnější metodou pro hodnocení transdermální absorpce *in vitro* je použití difuzních komůrek. Při testování je možné komůrky uspořádat vertikálně i horizontálně. V praxi se častěji využívá vertikální směr penetrace. Bývají vyrobeny ze skla a teflonu a skládají se ze dvou částí. Horní část je označována jako donorová, slouží k dávkování testované látky, spodní receptorová část se plní receptorovou tekutinou. Mezi obě části se vkládá kůže pokožkou nahoru. Rozlišujeme dva typy difuzních komůrek – statické a průtokové.

### **2.2.4.1. Statické vertikální difuzní komůrky**

Hojně využívaným typem je jednoduchá dvoukomorová statická vertikální difuzní komůrka (obr. 3), označována jako Franzova komůrka (Franz, 1975). Receptorová tekutina pod kůží je manuálně odebírána pro analýzu. Důležitým faktorem u statických difuzních systémů je rozpustnost testované látky v receptorové tekutině.



Obr. 3 Statická vertikální difuzní komůrka

#### 2.2.4.2. Průtokové vertikální difuzní komůrky

Druhým typem jsou průtokové vertikální difuzní komůrky (Bronaugh & Stewart, 1985), které jsou charakterizovány průběžným nahrazováním receptorové tekutiny pomocí peristaltické pumpy. Tato metoda je vhodná pro testování látek s velmi nízkou rozpustností v receptorové tekutině.

Ve srovnávacích studiích nebyly prokázány rozdíly při měření propustnosti kůže využitím statických a průtokových difuzních komůrek (Clowes et al., 1994).

#### 2.2.5. Testovaná látka

Existují dva režimy dávkování testované látky: nekonečná (infinite dose) a konečná dávka (finite dose).

Nekonečná dávka je definována jako množství testované látky, kdy je dosažena a udržována maximální rychlost absorpce. Aplikovaný objem musí být v nadbytku. Typické jsou dávky  $>10 \text{ mg.cm}^{-2}$  nebo  $>100 \text{ } \mu\text{l.cm}^{-2}$ . Při této dávce je stanoven ustálený stav vtoku a koeficient propustnosti.

Při dávkování konečné dávky nemusí být dosažena maximální rychlost absorpce látky nebo k jejímu dosažení dojde po delší době a nemusí být udržována. Dávka látky je aplikována v dostatečném množství k pokrytí kůže buď  $5\text{-}10 \text{ } \mu\text{l.cm}^{-2}$ , nebo  $2\text{-}5 \text{ mg.cm}^{-2}$ . Koncentrace látky se může měnit (zvýšit) v důsledku vypařování donorové tekutiny, protože difuzní komůrky jsou ponechány bez okluze. Tento stav odpovídá

expozici látky v reálném životě. Po 20-24 hodinové expozici je koncentrace v nosiči snížena na méně než 10 % počáteční koncentrace. Konečná dávka umožňuje odhad maximální rychlosti absorpce a celkové absorpce (OECD, 2004; WHO, 2006; Kotingová et al., 2009).

Látka může být aplikována čistá nebo zředěná (v ideálním případě s vodou). Pokud rozpouštědlo obsahuje komponenty, které přímo reagují s intercelulárními lipidy v SC, je pravděpodobné, že interakce způsobí zrychlení nebo zpomalení průniku (Davis et al., 2002).

### 2.2.6. Receptorová tekutina

Receptorová část komůrky je naplněna receptorovou tekutinou, která nesmí omezovat permeační proces. Používají se fyziologické pufry pro udržení životaschopnosti kůže nebo izotonické pufry, kdy již nebude testován metabolismus (v případě mrtvé nebo zmražené kůže). K receptorové tekutině je možné přidat antibakteriální látku (Bronaugh, 2000). Pokud je vyžadováno zachování životaschopnosti kůže pro testování dermálního metabolismu je vhodné použít média pro pěstování tkáňových kultur např. MEM (Eagle's minimal Essentials medium), HHBSS (Hepes-buffered Hanks' balanced salt solution) a DMPBS (Dulbecco modified phosphate-buffered saline), která jsou schopna udržet anaerobní a aerobní využití glukosy a metabolismus testosteronu a estradiolu po dobu 24 hodin (Collier et al., 1989). Lipofilní látky jsou špatně rozpustné ve většině receptorových tekutin, proto je vhodné přidat 4% hovězí sérový albumin (Hood & Bronaugh, 1999), 50% ethanol nebo <6% oleyl(poly(oxyethylen)<sub>20</sub>) pro usnadnění absorpce a napodobení výsledků testování *in vivo*, při kterém jsou lipofilní látky snadno unášeny krví.

Použití fosfátového pufru (PBS) eliminuje anaerobní a aerobní využití glukosy. Po 24 hodinách se projeví autolýza živé epidermis a dermis (Collier et al., 1989).

### 2.2.7. Příprava kůže

Lidská kůže pro *in vitro* studie bývá získávána při chirurgických operacích nebo pitvách. Z důvodu větší dostupnosti je více využívána kůže žen z oblasti trupu (Dressler, 1999). Čerstvou metabolicky aktivní kůži lze použít i na testování dermálního metabolismu a jeho vlivu na absorpční proces, avšak aktivita enzymů se po odběru snižuje (Wilkinson & Williams, 2008).

Kůže se používá v plné tloušťce až 500-1000  $\mu\text{m}$ , kdy obsahuje epidermis a dermis. Dermatomeem lze kůži seříznout na tloušťku 200-500  $\mu\text{m}$ , odstraněna je spodní část dermis. Kůže získaná s použitím dermatomu je vhodnější pro testování absorpce

lipofilních látek. Epidermis od dermis je možné oddělit tepelně ponořením do vody o teplotě 60 °C na 1 min (Bronaugh et al., 1981), enzymaticky nebo chemickými separačními technikami. Poslední možností je použití samotné rohové vrstvy vzniklé působením trypsinu na pokožku.

Kůže po odběru musí být povrchově očištěna, zbavena viditelných chlupů a podkožního tuku. Za předpokladu zmrazení kůže při normálním stavu hydratace, může být uchována v hliníkové folii až 1 rok při -20 °C (Steiling et al., 2001). Po rozmrazení při pokojové teplotě není vhodná ke studiu metabolismu z důvodu neaktivního enzymatického systému a vykazuje výrazně vyšší propustnost v porovnání s čerstvou kůží. Čím delší doba skladování, tím je kůže více propustná. Při testování se zmrazenou kůží byl zjištěn vyšší stupeň ustáleného průtoku látky (steady state flux) a kratší doba do začátku pronikání testované látky do receptorové tekutiny (lag time) (Ahlstrom, et al., 2007).

Před samotným experimentem musí být vizuálně ověřeno, zda kůže není poškozena. V případě zjištění poškození je kůže vyloučena. Po rozstříhání na potřebnou velikost je kůže položena na receptorovou část komůrky tak, aby se dotýkala receptorové tekutiny bez přítomnosti vzduchových bublin. Následuje přiložení horní části komůrky. Je doporučeno provést kontrolu integrity bariéry fyzikálními metodami měření transepidermální ztráty vody (TEWL) nebo elektrického odporu kůže (TER). Integrita kůže může být provedena také pomocí triciové metody, kdy je měřen průnik triciované vody kapalinovou scintilací (LSC) a hodnoty jsou porovnány se standardními hodnotami (Davies et al., 2004).

#### **2.2.8. Průběh testování**

Připravené difuzní komůrky jsou vloženy do vyhřívané vodní lázně. Na povrchu kůže je nutné udržovat fyziologickou teplotu  $32 \pm 1$  °C. Vlhkost vzduchu by měla být mezi 30 % a 70 % (OECD, 2004).

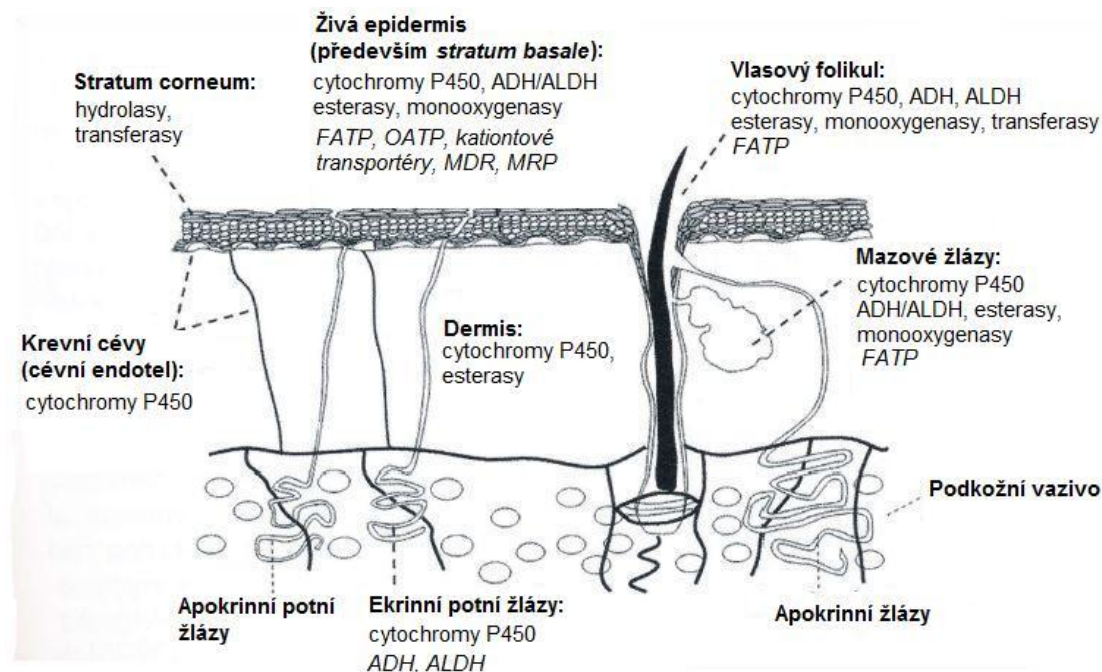
Doba expozice by měla odrážet použití v reálných podmínkách. Laboratorní testování je doporučeno v délce trvání 24 hodin. U studií trvajících déle než 24 hodin lze očekávat zhoršení integrity kůže. Avšak některé látky, zejména lipofilní, mohou do receptorové tekutiny migrovat déle. Zvýšená expozice je vhodná v případě delší lag fáze nebo u aplikace nekonečné dávky s cílem dosažení ustáleného průtoku (OECD, 2004).

## 2.2.9. Metabolismus

V kůži mohou být absorbované látky transformovány přítomnými enzymy. Biotransformace absorbované látky je významná pro sloučeniny s farmakologickými a toxikologickými účinky.

Kůže obsahuje enzymy, které katalyzují reakce jak 1. fáze (např. oxidace, redukce, hydroxylace), tak 2. fáze (konjugace) metabolismu látek. V kůži byly identifikovány biotransformační enzymy, které se nachází v játrech a ostatních tkáních (Panatier et al., 1978). Jejich specifická aktivita je v kůži nižší ve srovnání s aktivitou v játrech (0,1-28 % u 1. fáze; 0,6-50 % u 2. fáze) (Hotchkiss, 1998; Hewitt et al., 2000).

Za metabolismus absorbovaných sloučenin jsou nejvíce zodpovědné enzymy jako esterasy (Kenney et al., 1995), alkoholdehydrogenasy (Boehnlein et al., 1994) a acetyltransferasy (Kraeling et al., 1996). V menší míře jsou to mikrosomální cytochromy P-450 (Mukhtar & Bickers, 1981). Cytochrom P450 (např. CYP1A/2A) a enzymy 2. fáze metabolismu (např. glutation S-transferasa (EC 2.5.1.18)) jsou lokalizovány v buňkách epidermis, mazových žlázách a vlasových folikulech (Pedlington et al., 1994; Hotchkiss, 1998). Lipasy, proteasy, fosfatasy, sulfatasy, glykosidasy byly především identifikovány v SC, kde jsou zapojeny do procesu zrání keratinocytů a deskvamace (Howes et al., 1996). Obr. 4 shrnuje známé rozmístění enzymů v lidské kůži.



Obr. 4 Schematický přehled distribuce enzymů a transportérových proteinů v lidské kůži. ADH: alkoholdehydrogenasa; ALDH: aldehyddehydrogenasa; *FATP*: transportérový protein pro mastné kyseliny; *OATP*: transportní polypeptidy organických aniontů; *MDR*: gen kódující membránový kanál tzv. glykoprotein-P; *MRP*: membránový transportní protein. Upraveno dle Dancik et al., 2010.

Například po aplikaci benzo[a]pyrenu na kůži morčete v průtokové difuzní komůrce byl v receptorové tekutině identifikován karcinogenní metabolit benzo[a]pyrenu, látka vyvolávající rakovinu (Ng et al., 1992).

Důležitým parametrem při laboratorním testování metabolismu je plocha kůže vystavená chemickým látkám. Platí, že čím větší je použitá plocha, tím je látka či její metabolit snadněji detekovatelný. Biotransformace aplikované látky je mnohem méně významná při *in vitro* testování, protože životaschopnost kůže je za daných podmínek nedostatečná a v průběhu transdermálního transportu se snižují fyziologické funkce kůže. Transformace látek není důležitým faktorem, pokud testovaná látka je zadržena ve SC, ale stává se významná v případě lipofilních látek, které se metabolickými procesy v epidermis a dermis se stávají hydrofilními a procházejí přes SC a současně je ovlivněna jejich penetrace (OECD, 2011).

### **2.2.10. Transportéry v kůži**

Transportéry jsou transmembránové proteiny přítomné v různých tkáních, včetně kůže. Vykazují širokou substrátovou specifitu pro endogenní sloučeniny a xenobiotika a jsou zapojeny do procesu přenosu látek (vstupu a vylučování) mezi extracelulárním prostředím a buňkami. Transportéry proto mohou výrazně ovlivnit distribuci lokálně aplikovaných léčiv nebo toxických chemikálií v kůži, a tudíž i jejich farmakologický a toxický účinek. V kůži byly identifikovány transportéry z rodiny ABC (ATP binding cassette), konkrétně MDR1, MDR3 (multidrug resistance proteins) způsobující mnohočetnou rezistenci k lékům a MRP1, MRP3, MRP5-9 (resistance-associated proteins). Z rodiny SLC (solute carrier) transportérů byly v kůži nalezeny transportní proteiny PEPT1, MCT1, OCT 1 a 3, OCTN1 a 2, OAT2, CTN 1 - 3, ENT 1, 2 a 4, PGT a OATP-B, -D, -E, -H (Dancik et al., 2010).

### **2.2.11. Zpracování výsledků**

#### Vyhodnocení po aplikaci konečné dávky

Analyzovány by měly být všechny komponenty testovacího systému. Zahrnuje kůži, receptorovou tekutinu, receptorovou část komůrky, donorovou část komůrky, roztok použitý na opláchnutí povrchu kůže a veškeré použité pomůcky.

Testovaná látka nalezena v mycím roztoku po omytí kůže a pomůcek je označena jako biologicky nedostupná. Stejný případ platí pro množství adsorbované látky do SC, které může být stanoveno metodou „tape-stripping“. Buňky rohové vrstvy jsou postupně odstraňovány pomocí adhezivní pásky, která je následně analyzována pomocí analytických metod (provádí se 15-25 stržení) (OECD, 2004). Ve zbývajících

pokožce a škáře je látka identifikována jako absorbovaná a v receptorové tekutině jako proniknutá. Vzhledem k prokrvení dermis a její úzké vazbě na živou dermis, tedy bez rohové vrstvy, jsou látky nalezeny v těchto vrstvách, pokládány za dostupné krevnímu oběhu. Samozřejmě k nim patří látky z receptorové tekutiny a také do těla se mohou dostat i látky objeveny v kožních adnex jako jsou mazové a potní žlázy a vlasové folikuly (Steiling et al., 2001).

Výsledným parametrem je celková absorpce, při čemž je nutné získat z analyzovaných vzorků 90-110 % (OECD, 2004) nebo 85-115 % (SCCNFP, 2003) testované látky. Zahrnuto je množství omyté z povrchu kůže, spojené s kůží a v receptorové tekutině.

Při použití značených testovaných látek je analýza provedena scintigrafií, v opačném případě je vhodná vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) nebo jiným vhodným detektorem.

Hodnota dermální absorpce by měla být vyjádřena v absolutní výši ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) nebo může být vypočtena jako procento aplikované dávky změřením penetrace testované látky do receptorové tekutiny a množství látky zadržené v kůži (OECD, 2011).

#### Vyhodnocení po aplikaci nekonečné dávky

V případě aplikace nekonečné dávky se stanovuje úroveň ustáleného průtoku ( $J_{ss}$ ) a koeficient propustnosti ( $K_p$ ). Koeficient propustnosti ( $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$  nebo  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) je počítán jako podíl ustáleného průtoku ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a koncentrace testované látky ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) aplikované na kůži (Bronaugh et al., 1999).

## 2.3. BENZO[C]FENANTRIDINOVÉ ALKALOIDY

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy (KBA) jsou poměrně malou skupinou přírodních látek široce rozšířených v rostlinných druzích čeledi makovitých (Papaveraceae), zemědýmovitých (Fumariaceae) a routovitých (Rutaceae) (Dostál & Slavík, 2000). Hlavními zdroji je *Sanguinaria canadensis*, *Chelidonium majus*, *Dicranostigma lactucoides*, *Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa* a určité druhy *Bocconia* a *Zanthoxylum*. Základní strukturu tvoří N-methylbenzo[c]fenantridinový kationt tvořený ze čtyř aromatických jader obsahující dusík v pozici 5, nesoucí methylovou skupinu a pozitivní náboj. Jednotlivé KBA se liší různými kombinacemi substituentů, zvaných methoxy- (-OCH<sub>3</sub>) a methylendioxy- (-OCH<sub>2</sub>O-) skupiny. Nejvíce reaktivním místem molekuly je iminová vazba mezi atomy N5 a C6, která podléhá nukleofilnímu ataku a je spojena se změnami ve struktuře a fyzikálních vlastnostech (Dostál & Slavík 2000).

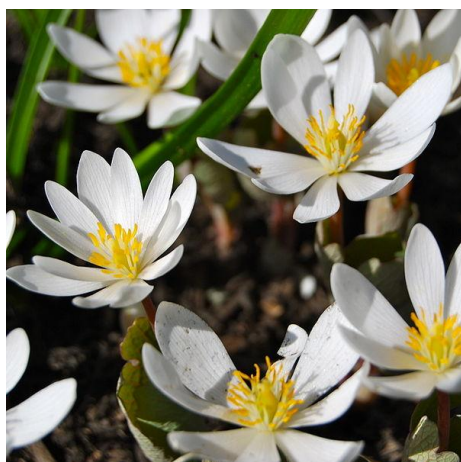
Specifickou vlastností KBA je tvorba volných bází. Pojem volná báze (free base) je používán pro produkt s bazickými vlastnostmi, který vzniká alkalizací soli alkaloidu a v kyselém prostředí se vrací zpět na sůl, jedná se tedy o reverzibilní acidobazickou reakci. Obě formy se nemohou vyskytovat současně v rostlinných tkáních. Přirozenou formou KBA je iminová sůl, která je zodpovědná za typické pestré barvy rostlinných orgánů, latexu a alkoholových extraktů z rostlin.

Mezi dva nejznámější a komerčně dostupné KBA patří sanguinarin a chelerythrin.

### 2.3.1. Sanguinarin

Sanguinarin (SG) je rostlinný alkaloid přítomný v *Sanguinaria canadensis* (krevnice kanadská), *Bocconia frutescens* (bokonie květnatá), *Poppy fumaria*, *Macleaya cordata* a *Chelidonium majus* (vlaštovičnick větší) (Mackraj at al., 2008). SG byl objeven v roce 1827 v *S. canadensis*. Jeho strukturu objasnili v roce 1931 chemici Spath a Kuffner (Dostál & Slavík, 2000). *S. canadensis* (obr. 5), bíle kvetoucí rostlina původem ze Severní Ameriky, dosahuje výšky 20-50 cm. Roste ve vlhkých lesích a houštinách, často v záplavových oblastech a na březích potoků. Při poranění roní červený latex, proto je lidově nazývána krvavý kořen (bloodroot). V naší zemi obsahuje SG ve větším množství jen vlašovičnick větší (obr. 6), který při poranění roní hustý oranžový latex, jehož barva je výsledkem kompozice červeného sanguinarinu, žlutého chelerythrinu, dále oranžového koptisinu a žlutého berberinu, patřících do skupiny protoberbenových alkaloidů (Dostál & Slavík, 2000).





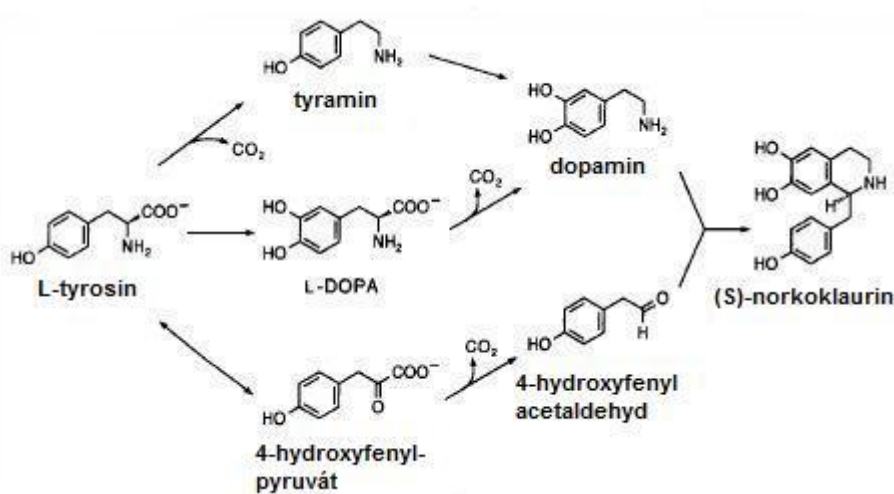
Obr. 5 *Sanguinaria canadensis*. Převzato z [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org).



Obr. 6 Vlaštovičník větší. Převzato z [www.commonswikimedia.org](http://www.commonswikimedia.org).

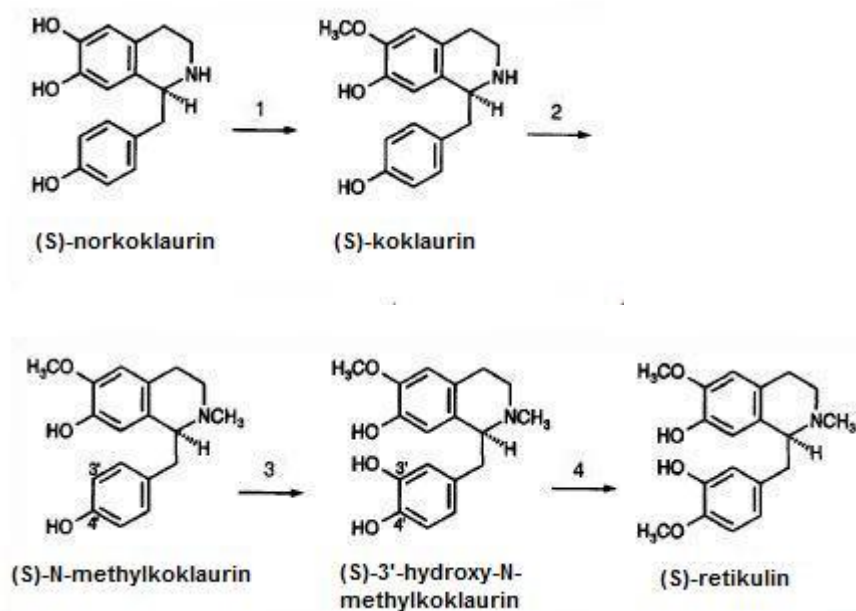
### 2.3.1.1. Biosyntéza sanguinarinu

Biosyntéza SG vychází z aromatické aminokyseliny L-tyrosinu, který je přeměňován na (S)-norkoklaurin (obr. 7). (S)-norkoklaurin vzniká kondenzací dopaminu a 4-hydroxyfenylacetaldehydu. Enzym katalyzující tuto reakci se nazývá (S)-norkoklaurinsyntasa (EC 4.2.1.78).



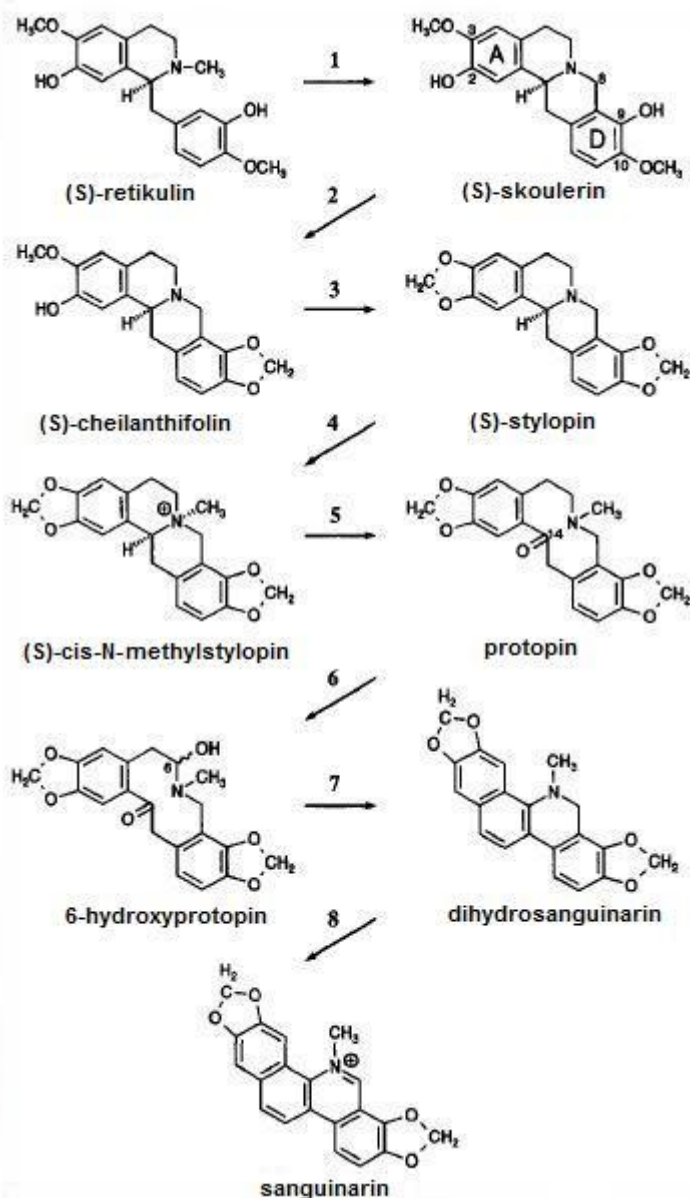
Obr. 7 Vznik benzyloisochinolinového alkaloidu (S)- norkoklaurinu z L-tyrosinu. 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) Převzato z Kutchan, 1996.

Další část dráhy vede z (S)-norkoklaurinu na (S)-retikulin prostřednictvím série hydroxylací, O-methylací a N-methylací (obr. 8). (S)-retikulin je centrálním meziproduktem biosyntézy mnoha tříd isochinolinových alkaloidů.



Obr. 8 Enzymaticky ověřená dráha z (S)-norkoklaurinu na (S)-retikulín. Norkoklaurin-6-O-methyltransferasa (1), koklaurin-N-methyltransferasa (2), fenolasa (3), (S)-3'-hydroxy-N-methylkoklaurin-4'-O-methyltransferasa (4). Upraveno dle Kutchan, 1996.

(S)-retikulín je převeden na (S)-skoulerin působením enzymu (S)-retikulinoxidoreduktasy (BBE) (EC 1.21.3.3), která katalyzuje tvorbu methylenového můstku. (S)-skoulerin je oxidován na (S)-stylopin dvěma enzymy patřící do skupiny cytochrom P450 oxidas. Následná N-methylace (S)-stylopinu je katalyzována enzymem N-methyltransferasou, který využívá jako donor methylovou skupinu S-adenosyl-L-methioninu a vznikající (S)-cis-methylstylopin obsahuje dvě methylendioxy skupiny a je přeměňován na protopin působením enzymu methyltetrahydroprotoberberin-14-monooxygenasy (EC 1.14.13.37). Z protopinu vzniká nestabilní 6-hydroxyprotopin, který se spontánně přeměňuje na dihydrosanguinarin (DHSG). DHSG je oxidován na SG enzymem dihydrobenzofenanthridinoxidasou (DHBO) (EC 1.5.3.12) (Kutchan, 1996). Biosyntéza od (S)-retikulínu na konečný SG je uvedena na obr. 9.



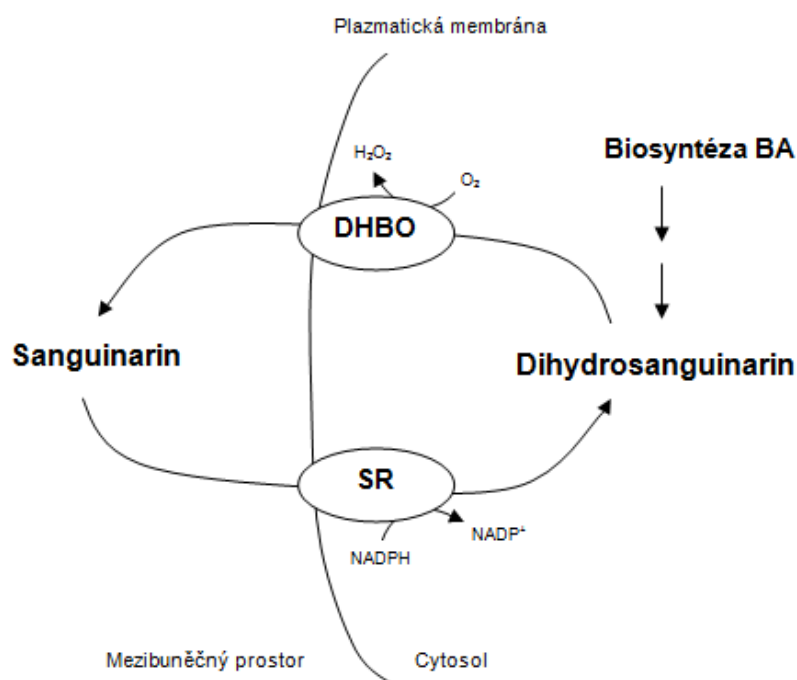
Obr. 9 Biosyntetická dráha vzniku sanguinarinu (SG) z (S)-retikulinu. BBE (1), (S)-chelanthiofolinsyntasa (2), (S)-stylopinsyntasa (3), adenosyl-L-methionin: (S)-tetrahydroprotoberberin-(cis)-N-methyltransferasa (4), (S)-(cis)-N-methylstylopin-14-hydroxylasa (5), protopin-6-hydroxylasa (6), spontánní reakce (7), dihydrobenzofenantridinoxidasa (8). Převzato z Kutchan, 1996.

Z lokalizace biosyntetických enzymů je pravděpodobné, že k syntéze dochází ve vezikulách (Amann et al., 1986) odvozených z endoplazmatického retikula a v cytosolu. SG je syntetizován v buňkách celé rostliny do vzniku netoxického DHSG. K přeměně DHSG na SG dochází jen v přítomnosti elicitorů (Facchini et al., 1996) biotického (houbové glykoproteiny a bakteriální lipoproteiny) nebo abiotického původu. Elicitory jsou signály indukující expresi obranných genů, které spouští syntézu sekundárních metabolitů fytoalexinů, které chrání rostlinu před patogeny (Namdeo, 2007). SG patří

mezi účinné fytoalexiny díky schopnosti interkalovat do dsDNA, pronikat membránami, interagovat s proteiny a enzymy, které obsahují SH-skupiny. V obranném systému rostlin na biotický a abiotický stres hraje roli i lipooxygenasová dráha, ve které vznikají z kyseliny linoleové signální sloučeniny, kyselina jasmonová a její derivát methyljasmonát (Blée, 1998). Methyljasmonát byl vedle glykoproteinu z kvasnic, umělého okyselení a slabého osmotického stresu použit k úspěšnému zvýšení produkce SG v buněčné suspenzi *Eschscholtzia californica* (Färber et al., 2003).

Oxidaci DHSG na SG katalyzuje enzym DHBO obsahující měď, který působí na DHSG za současné redukce molekuly kyslíku na peroxid vodíku (Arakawa et al., 1992). Vzniklý SG je transportován do extracelulárního prostoru (obr. 10). Čímž je zabezpečena obrana rostliny před parazity z vnějšího prostředí a zároveň ochrana obsahu buňky před působením toxického SG.

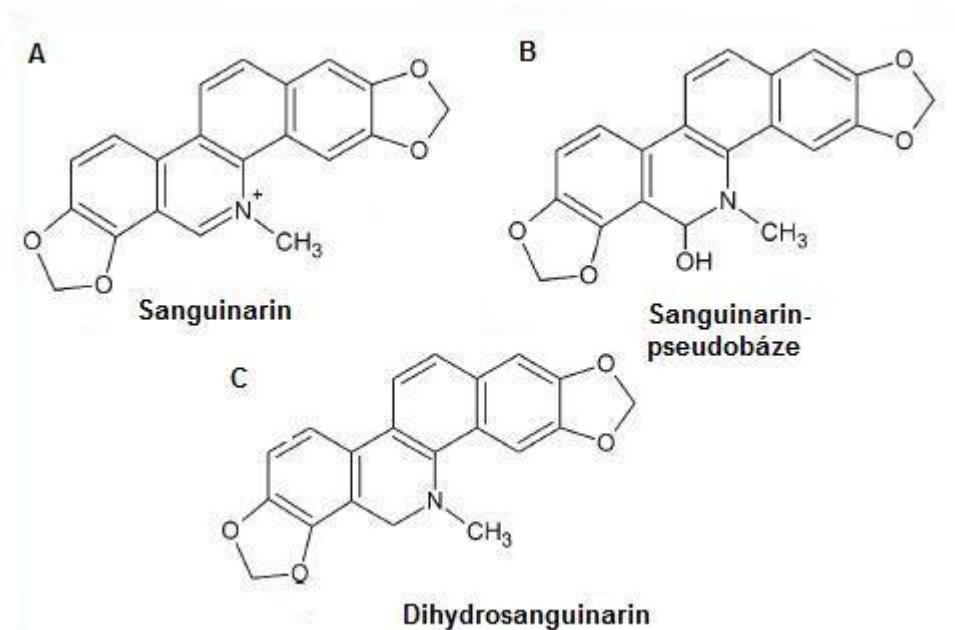
Většina SG je vstřebána a následně intracelulárně redukována na DHSG působením enzymu sanguinarinreduktasy (SR), kdy donorem vodíku je NADPH. Redukce katalyzována enzymem SR není vratná zvyšující se koncentrací produktu, i při stonásobném přebytku  $\text{NADP}^+$ . Transportní mechanismy přes plazmatickou membránu nebyly dosud objasněny. Akumulace SG ve vnějším prostředí a DHSG ve vnitřním prostředí naznačuje spojení přenosu s redoxní reakcí. Konverze SG SR pravděpodobně vytváří hnací sílu vstřebání SG zachováním koncentračního gradientu mezi extracelulárním prostředím a buňkou (Weiss et al., 2006).



Obr. 10 Schéma posledního kroku syntézy sanguinarinu a jeho zpětná konverze na zásobní dihydrosanguinarin. Dihydrobenzofenantridinoxidasa (DHBO), sanguinarinreduktasa (SG) Upraveno dle Weiss et al., 2006.

### 2.3.1.2. Chemické vlastnosti

Sanguinarin (SG) je 13-methyl[1,3]benzodioxo[5,6,-c]-1,3-dioxo[4,5-i]phenanthradinium (Obr. 11A).



Obr. 11 Vzorec sanguinarinu (A), sanguinarin pseudobáze (B), vzorec dihydrosanguinarinu (C). Upraveno dle Janovská et al., 2009.

Biologická aktivita SG *in vivo/in vitro* souvisí se dvěma formami tohoto alkaloidu, které se současně nachází v biologickém systému. V kyselém prostředí se vyskytuje ve formě kvartérního kationtu SG. V zásaditém prostředí při nukleofilním ataku na iminiovou vazbu C=N<sup>+</sup> kvartérního kationtu vzniká adicí hydroxidového aniontu neutrální 6-hydroxy-dihydroderivát (pseudobáze, SGOH) (obr. 11B). Reakce je vratná, působením kyseliny na SGOH vzniká zpět SG. Obě formy (SG a SGOH) se liší svými vlastnostmi. Kvartérní forma je výrazně barevná, polární a rozpustná ve vodě, zatímco neutrální hydroxyadukt ztrácí barvu, je nepolární a ve vodě nerozpustný. Dynamická rovnováha mezi nimi v extra- a intracelulárním prostředí je ovlivněna koncentrací H<sup>+</sup> a interagujících molekul (proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy, atd.).

Rovnováha mezi kvartérním heterocyklickým kationtem SG a terciární pseudobází SGOH závisící na pH je zpravidla formulována jako acidobazická reakce:  $SG + H_2O \rightleftharpoons SGOH + H^+$ . Reverzibilní rovnováha je popsána konstantou  $pK_{R+}$ , která je analogická k  $pK_a$  Brönstedovy kyseliny:  $K_{R+} = [SGOH].[H^+] / [SG]$ . Rovnovážná konstanta udává hodnotu pH, při které jsou iminiový kationt a hydroxidový adukt přítomné ve stejné koncentraci. Pro SG je konstanta stanovena na hodnotu 8,05 (Kovář et al., 1985).

Pseudobáze je schopna pronikat buněčnou membránou a uvnitř buňky přechází zpět na kvartérní formu. K detoxikační reakci v organismu dochází při redukci iminiové vazby v kationové formě SG na DHSG (obr. 11C). Takto vzniklý DHSG může být dále přeměněn na polární konjugáty v 1. a 2. fázi detoxikace. Struktury konjugátů nebyly zcela objasněny, ale bylo prokázáno, že se tvoří z jejich prekursoru DHSG, základní sloučeniny v metabolismu SG (Psotová et al., 2006).

### **2.3.1.3. Fluorescence**

Zřetelnou fluorescenci vykazuje SG, SGOH i DHSG (Janovská et al., 2009). Chromofory zodpovědnými za fluorescenci jsou kondenzovaná aromatická jádra substituovaná -OCH<sub>2</sub>O- a OH-skupinami (Slaninová et al., 2008). Z důvodu překrývání jejich spekter je omezeno využití technik založených na fluorescenční spektroskopii/mikroskopii. DHSG má excitační maximum při vlnové délce 327 nm a emisní maximum 446 nm. SGOH má excitační/emisní spektra s maximem v 327/418 nm a SG v 475/590 nm). Fluorescenční spektra SG silně závisí na pH. Rovnovážná konstanta mezi SG a SGOH je pK<sub>a</sub>=8,06. Isoemisní bod byl stanoven na hodnotu 538 nm, při které se obě formy SG projevují stejnou intenzitou fluorescence (Janovská et al., 2009).

### **2.3.1.4. Metabolická transformace v živočišných buňkách**

Sanguinarin je redukován látkami s nízkou molekulovou hmotností (NADH, NADPH) a/nebo nespecifickými reduktasami (Psotová et al., 2006). Vzniklý dihydrometabolit (DHSG) je v 1. fázi biotransformace oxidován cytochromem P450 za vzniku O-demethyl- a hydroxymetabolitů. Ve 2. fázi metabolity s hydroxylovou skupinou (skupinami) podléhají konjugaci sulfotransferasami nebo glukuronyltransferasami. Ve vodě rozpustné konjugáty (glukuronidy) jsou vylučovány močí. Reakce jsou reverzibilní, katalyzované enzymy oxidoreduktasou a 3-katechol-O-methyltransferasou (3-KOMT) (EC 2.1.1.6), které transformují dihydro- a O-demethylované metabolity zpět na původní alkaloid.

Kosina et al. (2011) studoval redukční a oxidační dráhy metabolismu alkaloidů v lidských hepatocytech pomocí HPLC/ESI-MS. Po 1 hod inkubace bylo 21 % SG redukováno na jeho dihydrometabolit. Stejný trend byl pozorován po 2 hod, ale redukce byla méně zřetelná. Zjištění, že redukce v lidských hepatocytech nebyla plně kvantitativní lze vysvětlit reverzibilní přeměnou. Byl hodnocen potenciál peroxidasy katalyzovat oxidaci dihydrometabolitů. Laktoperoxidasa (LPO) (EC 1.11.1.7) v přítomnosti peroxidu vodíku účinně oxidovala DHSG na SG. Dynamická konverze

mezi alkaloidy a dihydrometabolity v buňkách vede ke vzniku rovnovážného stavu. *In vitro* experiment s SG ukázal, že glutathion (GSH) a L-askorbová kyselina (AA) se nemohou podílet na redukci alkaloidů jako NAD(P)H.

### **2.3.1.5. Biologická aktivita**

SG projevuje široké spektrum biologické aktivity. SG vykazuje zřetelný antimikrobiální, antimykotický, antiplakový, analgetický a protizánětlivý účinek (Dostál & Slavík, 2000). DHSG se obecně vyznačuje menší biologickou účinností.

#### Antimikrobiální a antimykobakteriální aktivita

SG se vyznačuje bakteriostatickým a bakteriocidním účinkem proti  $G^+$  a  $G^-$  bakteriím, plísním a kvasinkám (Zdařilová et al., 2006). Při testování minimální inhibiční koncentrace SG byla zjištěna 98% inhibice růstu mikrobiálních izolátů z lidského dentálního plaku do koncentrace 16  $\mu\text{g/ml}$  (Dzink & Socransky, 1985). Dokonce i DHSG působí antimikrobiálně vůči  $G^+$  bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus faecalis*,  $G^-$  bakteriím *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* a houbám *Candida albicans* (Navarro & Delgado, 1999). Významná antimykobakteriální aktivita byla demonstrována na *Mycobacterium aurum*, *M. bovis* a *M. smegmatis* (Newton et al., 2002).

#### Protizánětlivá aktivita

Pravděpodobným mechanismem protizánětlivého účinku SG je inhibice jaderného transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který se podílí na regulaci genů zapojených v zánětlivé reakci a také ve virové replikaci a buněčné proliferaci. SG blokuje TNF-dependentní fosforylaci a následně dochází k degradaci I $\kappa$ -B $\alpha$ , inhibiční podjednotky NF- $\kappa$ B, inhibující translokaci podjednotky p65 k jádru. SG inhibuje aktivaci NF- $\kappa$ B vyvolanou nejen tumor nekrotizujícím faktorem  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ale také interleukinem-1, formolmyristylacetátem a kyselinou okadaovou (Chaturvedi et al., 1997).

#### Toxický účinek

Toxicita SG vychází ze dvou strukturních prvků: (1) jako planární heteroaromatický kationt interkaluje do dsDNA, tudíž inhibuje transkripci a replikaci DNA (Bajaj et al. 1990), (2) váže se na negativně nabitý povrch membrány (Schmeller et al., 1997), a reaguje s SH-skupinami proteinů, čímž inhibuje jak cytosolární, tak membránové proteiny a enzymy, např. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasu (Scheiner-Bobis, 2001) a lipooxygenasu (Vavrečková et al., 1996).

## Cytotoxicita

U všech buněčných modelů se projevuje závislost cytotoxicity na koncentraci SG a době expozice. SG působí cytotoxicky na nádorové i nenádorové buněčné linie v mikromolárních koncentracích (Tab. 1). DHSG je uváděn jako méně respektive netoxický k buňkám.

Tab. 1: Cytotoxicita sanguinarinu k vybraným buňkám (Zdařilová et al., 2006).

Typ buněk	μM
<b>Normální buňky</b>	
Lidské fibroblasty	1,6
Lidské gingivální fibroblasty (HGF-1)	10,9
Lidské keratinocyty (HaCaT)	0,3
Lidské epidermální keratinocyty (NHEKs)	> 10
<b>Nádorové buňky</b>	
Lidské buňky melanomu (M4Beu)	1,8
Lidské buňky karcinomu kůže (A431)	2

Při rozdílných koncentracích SG dochází k jiným typům buněčné smrti (Ding et al., 2002). Nižší koncentrace vede k apoptóze doprovázené aktivací kaspasy-3 a štěpením substrátu kaspasy-3 enzymu poly(ADP-ribose)polymerasa (PARP). Vyšší koncentrace způsobuje onkózu, která se vyznačuje otokem, vakuolizací, zpuchřováním, poruchou plazmatické iontové pumpy, náhodnou fragmentací DNA, denaturací bílkovin a jejich následnou hydrolýzou (Kopřiva, 2005).

## Apoptóza

Apoptóza je nejběžnější typ programované buněčné smrti (PCD), kdy dochází k procesu eliminace poškozených a nepotřebných buněk. Probíhají změny v aktivitě řady enzymů, v cytoskeletu, ve tvaru cytoplazmatické membrány a pozdním znakem je degradace DNA v oblasti nukleozomů (Vokurka et al., 2006). Vzniklé fragmenty (apoptotická tělíčka) jsou fagocytovány bez doprovodu zánětlivé reakce a tím se liší od nekrózy. Existují dvě cesty aktivace apoptózy. Vnitřní cesta je spuštěna uvolněním cytochromu c z mitochondrií přes kanály v membráně ze speciálních molekul MAC (mitochondria apoptosis-induced channel). MAC kanály jsou mimo jiné proteiny ovlivňovány i antiapoptickým proteinem Bcl-2. Bylo prokázáno, že SG tento protein inhibuje a dochází tak k deaktivaci kaspasy-3 (Weerasinhe et al., 2001). Vnější cesta začíná navázáním určité látky na TNF (Tumor necrosis factor) receptory v cytoplazmatické membráně, což vede k aktivaci proteolytických enzymů kaspas.

U SG byl prokázán silnější účinek vyvolání selektivní apoptózy v nádorových buňkách kůže linie A431 ve srovnání s normálními lidskými keratinocyty (NHEKs)



z epidermis, při použití stejných dávek aplikované látky (Ahmad et al., 2000). SG zapříčinil blokaci buněčného cyklu v G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> fázi a apoptózu karcinogenních buněk prostaty (Adhami et al., 2004).

### 2.3.1.6. Využití SG

Díky uvedeným účinkům je SG součástí mnoha komerčně dostupných výrobků. SANGUIRITRIN (extrakt z *Macleaya cordata*) obsahující SG a chelerythrin (CHE) je přidáván do mastí určených k léčbě infekčních zánětů kůže a mukózních membrán, nehojivých ran a vředů, hnisavého onemocnění kůže (pyodermie), stomatitidy, dermatomykózy a onychomykózy (Semkina, 2005). Spolu s další směsí SANGUINARIA (extrakt ze *S. canadensis*) je součástí přípravků ústní hygieny. Obě směsi jsou obsažené ve výrobku SANTOIN (zubní pasta, ústní voda) chráněném patentem (Šimánek et al., 1995). Extrakt z nadzemní části *M. cordata* je obsažen v produktu SANGROVIT. Jedná se o aditivum do krmiva hospodářských zvířat, které podporuje růst zvířat a nahrazuje používání antibiotik (Psotová et al., 2006).

Rostliny obsahující SG, především *S. canadensis*, *Macleaya cordata* a *Chelidonium majus*, mají významné postavení v tradiční medicíně.

### SG v léčbě rakoviny

Extrakt z *S. canadensis* je přidáván do mnoha přípravků, které jsou pacienti často vyhledávány jako alternativní léčba dermatologických problémů jako např. vředy, ale i bazocelulární karcinomy (BCC - nádor vznikající z bazálních buněk kůže a patří mezi nemelanomové nádory). Stovky let se používá „černá masť“ (Black salve, tzv. rakovinová masť) a je známo několik druhů této masti. Základní složkou masti je vedle *S. canadensis* chlorid zinečnatý. Obě tyto látky mají deskvamaci účinek, po aplikaci dochází k nekróze tkáně. Ostatní složky zřejmě mají antikarcinogenní, antioxidační a keratolytické vlastnosti. Přestože je uváděna ohromná selektivita černé masti, se kterou působí pouze na rakovinové buňky, je potvrzeno, že dochází i k poškození nedotčené zdravé okolní tkáně (Saltzberg et al., 2009). Na trhu je dostupná i „žlutá masť“ (tzv. hojivá), která bývá používána současně s černou mastí, ale ta již sanguinarin neobsahuje (Osswald et al., 2005). Komerčními produkty, obsahující *S. canadensis*, jsou Cansema, HerbVeil8 (McDaniel S. & Goldman, 2002) a Can-X (Jellinek & Maloney, 2005), lišící se jen přídatnými složkami.

Snaha samoléčby BCC je doprovázena i nežádoucími účinky např. bolestí, vznikem velkých nekrotických vředů, delší dobou hojení a vznikem jizev. V nejhorších případech může dojít k úplné ztrátě tkáně (obr. 12), na kterou byly tyto žíravé přípravky aplikovány (Saltzberg et al., 2009; McDaniel & Goldman, 2002).



Obr. 12 Ztráta levého křídla nosní chrupavky po léčbě „černou mastí“. Převzato ze Saltzberg et al., 2009.

Ačkoliv konvenční léčba nemelanomových nádorů kůže je velmi úspěšná, narůstá poptávka po alternativních přístupech bez chirurgické léčby. V mnoha případech bývají tyto přípravky neoznačené, mohou být vyráběny se špatnou kontrolou kvality a obsahovat širokou škálu potenciálně nebezpečných chemických složek, proto je nutné tyto přípravky používat s velkou obezřetností.

## 2.4. Sluneční záření

Sluneční záření představuje zdroj energie většiny procesů na zemském povrchu a v atmosféře. Je součástí elektromagnetického záření a jeho spektrum lze rozdělit na ultrafialové záření (UV; vlnová délka  $> 400$  nm), viditelné záření (VIS; 400 - 750 nm) a infračervené záření (IR;  $< 750$  nm).

UV záření se podle vlnové délky dělí na dlouhovlnné UVA (400-320 nm), středněvlnné UVB (320-280 nm) a krátkovlnné UVC (280-200 nm), které je absorbováno již v zemské atmosféře. Zbylé dvě složky UV záření (kompletní UVA a 5 % UVB) dopadají až na zemský povrch a působí i na lidskou kůži. Její ochranu zajišťuje tmavý pigment pokožky melanin, který absorbuje UV záření a přeměňuje ho na neškodné infračervené záření. Přesto ve větším množství slunečního záření hrozí poškození genetické informace kožních buněk, které může vést až ke vzniku rakoviny kůže (Hořejší & Prah, 1996). Přestože UVB záření je z větší části absorbováno ozonovou vrstvou a na zemský povrch ho dopadá méně než UVA, je UVB považováno za složku, která je zodpovědná za genotoxický potenciál slunečního záření, protože je absorbována přímo molekulami DNA. UVA, které tvoří 95 % dopadajícího UV záření,

je absorbováno tzv. fotosenzitiéry, které po aktivaci interagují s kyslíkem a produkují reaktivní formy kyslíku, které oxidačně modifikují DNA a ostatní biomolekuly (Pattison & Davies, 2006).

#### **2.4.1. Fototoxicita**

Fototoxicita je toxická reakce, k níž dochází vystavením kůže světlu nebo UV záření, které interaguje s chemickými látkami v kůži. Chromofor přítomný v látce absorbuje záření, dochází k uvolnění energie a fototoxické reakci s následným poškozením buněk. Test fototoxicity *in vitro* se využívá ke zjištění bezpečnosti látek používaných v léčivých přípravcích, ale třeba i v prostředcích denní hygieny. Test je založen na porovnání toxicity látky v přítomnosti a nepřítomnosti UV záření. Vhodným zdrojem simulujícím sluneční záření jsou solární simulátory s filtry, které propouští záření o požadované vlnové délce, např. UVA záření (Bark et al., 2010).

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

##### 3.1.1. Alkaloidy

SG byl izolován z extraktu nadzemní části *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.

DHSG byl připraven v 99% čistotě z přečištěného alkaloidového extraktu Sanguiritrinu jeho redukcí pomocí  $\text{NaBH}_4$  v methanolu a separací pomocí flash chromatografie na koloně se silikagelovou stacionární fází. K eluci DHSG byl použit chloroform (Vičar et al., 2010).

##### 3.1.2. Kůže

Kůže byla získána při chirurgických operacích od dobrovolných dárců na Oddělení plastické a estetické chirurgie Fakultní nemocnice Olomouc, kteří podepsali informovaný souhlas. Odběr a zpracování kůže bylo prováděno s povolením Etické komise FN Olomouc v souladu s českou legislativou. Kůže z oblasti břicha a prsou byla získána od žen. Kůže byla po operaci vložena do transportního roztoku obsahujícího antibiotika a následně využita pro transdermální transport, izolaci fibroblastů nebo byla zamražena.

##### 3.1.3. Buňky

Pro pokusy byly použity primární kultury lidských kožních fibroblastů, které byly izolovány z nadbytečné kůže. (Izolace a příprava dle kapitoly 3.3.1).

#### 3.2. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, ROZTOKY, OSTATNÍ MATERIÁL

##### 3.2.1. Chemikálie

Agarosa (typ I a typ VII), dihydráthydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), dihydrofluorescein acetát, dimethylsulfoxid (DMSO), disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), disodná sůl redukovaného  $\beta$ -nikotinamidadeninukleotidu (NADH), dodekahydrát fosforečnanu disodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), ethidium bromid, fetální hovězí sérum (FBS), formaldehyd, hovězí sérový albumin (BSA), hydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), chlorid sodný (NaCl), chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ ), kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), methanol, neutrální červeň 0,1%, pyruvát sodný, roztok trypanové modři (0,4%), roztok trypsin-EDTA (0,25%), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Triton X-100 byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) bylo koupeno od firmy

Invitrogen/Gibco. Pierce® BCA Protein Assay Reagent A a Pierce® BCA Protein Assay Reagent B od firmy ThermoScientific.

### 3.2.2. Přístroje

Centrifuga *Labofuge 400-Set* (Heraeus, Německo)  
Dotykový teploměr *DOT 150* (Volkraft, Německo)  
Chlazená centrifuga *Mikro 22R* (Hettlich Zentrifugen, Německo)  
Elektromagnetická míchačka *RH BASIC KT/C* (IKA®-Werke, Německo)  
Elektroforetická vana pro horizontální elektroforézu (Bio-Rad Laboratories, USA)  
Fluorescenční mikroskop (Olympus, USA)  
Fotometr pro měření absorbance *Infinite M200 Pro* (Tecan, Rakousko)  
HPLC *Dionex UltiMate 3000* (Dionex Corp., USA)  
Homogenizátor *Ultra Turax T25 Basic* (Ika®-Werke, Německo)  
Horizontální vana pro elektroforézu *Sub Cell® Model 192* (Bio-Rad, USA)  
Chromatografická kolona *Eclipse XDB-CN* (Agilent, USA)  
Inkubátor *MCO-17AIC* (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)  
Laminární box *CLF* (Schoeller Instruments, ČR)  
Mikroskop (Olympus, USA)  
pH metr *inoLab pH level 1* s elektrodou *SenTix41* (WTW, Německo)  
Sonikátor *UP 200* s (Dr. Hielscher, Německo)  
Solární simulátor *SOL-500* (Dr. Hönle UV technology, Německo)  
Sušárna *HS 121 A* (Labsystem, ČR)  
Termomixer *Comfort* (Eppendorf, Německo)  
Ultrazvuková termostatová vodní lázeň *UCC4* (Powersonic, Slovensko)  
UVA-metr (Dr. Hönle UV technology, Německo)  
UVB-metr (Dr. Hönle UV technology, Německo)  
Váhy *AX105 DeltaRange* (Mettler Toledo, Švýcarsko)  
Váhy *Sartorius 4503 Micro* (Sartorius, Německo)  
Vařič *RT 10 Power* (Ika®-Werke, Německo)  
Zdroj pro elektroforézu *PowerPac 200* (Bio-Rad Laboratories, USA)

### 3.2.3. Roztoky

Mobilní fáze A: HCl (1 % v/v), methanol

Mobilní fáze B: kyselina octová (1 % v/v), vodný roztok methanolu (10 % v/v)

PBS: Zásobní roztok fosfátového pufru: NaCl (137 mmol/l), KCl (2,68 mmol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (90 mmol/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15 mmol/l), pH = 7,4, před použitím byl zásobní roztok 10x naředěn sterilní vodou

Pufr pro měření aktivity LDH: hydrogenfosforečnan sodný (50 mmol/l), pyruvát sodný (1,22 mmol/l), NADH (0,4 mmol/l) pH = 7,5

Roztok ethidium bromidu: ethidium bromid (2 % m/v)

Roztoky pro kultivaci fibroblastů:

Médium se sérem: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetální bovinní sérum (FBS; 10 %), penicilin (100 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml)

Médium bez séra: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), penicilin (100 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml)

Roztok pro transport kůže: pracovní roztok PBS, amphotericin B (1,25 µg/ml), penicilin (500 U/ml) a streptomycin (0,5 mg/ml)

Roztoky pro metodu SCGE:

Elektroforetický pufr: NaOH (300 mmol/l), EDTA (1 mmol/l)

Lyzační roztok: NaCl (2,5 mol/l), EDTA (100 mmol/l), Tris (10 mmol/l), pH = 10, před použitím byl k roztoku přidán Triton X-100 (1 % v/v)

Neutralizační roztok: Tris (0,4 mol/l), pH = 7,5

Zastavovací roztok: PBS, fetální hovězí sérum (10 % v/v)

Roztoky pro měření životnosti pomocí NČ:

Extrakční roztok: CH<sub>3</sub>COOH (1 % v/v) v methanolu

Roztok k fixaci buněk: CaCl<sub>2</sub> (1 % v/v), formaldehyd (0,5 % v/v), roztoky smíchaný 1:1

Roztok neutrální červeně: neutrální červeň (0,1% v/v) v CH<sub>3</sub>COOH, před použitím roztok naředěn PBS 3:8

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

#### **3.2.4. Ostatní materiál**

Mikroskopická podložní sklíčka (76x26 mm), krycí sklíčka (15x15 mm)

Plastové mikrozkušavky 0,5; 1,5; 2 ml

Sterilní kultivační 6, 12, 24, 96-jamkové desky, sterilní kultivační lahve (75 cm<sup>2</sup>), sterilní plastové Petriho misky, laboratorní parafilm

### 3.3. METODY

#### 3.3.1. Kultivace fibroblastů

Kožní tkáň byla opláchnuta sterilním roztokem PBS a rozřezána na kousky o ploše asi 1 cm<sup>2</sup>. Kousky kůže byly položeny na zdrsňené dno Petriho misky a zality kultivačním médiem tak, aby nebyly převrstveny. Petriho misky byly uloženy v inkubátoru při teplotě 37 °C a atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Každé 2 – 3 dny bylo médium vyměňováno. Po pokrytí dna Petriho misky fibroblasty byly kousky tkáně přeneseny na nové Petriho misky a překryty médiem. Vrstva buněk v Petriho miskách byla opláchnuta PBS a buňky byly uvolněny trypsinem. K buňkám bylo přidáno kultivační médium se sérem a následovala centrifugace při 328 x g po dobu 10 min. Pelet byl rozsuspodován ve 20 ml kultivačního média se sérem. Vzniklá směs byla přenesena do kultivační lahve s plochou 75 cm<sup>2</sup> a kultivována v inkubátoru. Po dosažení konfluencie (monovrstvy) byly buňky po uvolnění trypsinu rozděleny do více lahví pro další experimenty. Pro experimenty byly použity buňky mezi 2-4 pasáží.

#### 3.3.2. Příprava fibroblastů pro experimenty

Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu se sérem v kultivačních lahvích v inkubátoru při teplotě 37 °C a atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Po dosažení monovrstvy buněk v lahvích bylo kultivační médium se sérem slito, buňky byly omyty PBS a uvolněny 1 ml trypsinu. Poté bylo přidáno kultivační médium se sérem, aby došlo k deaktivaci trypsinu. Buňky byly přeneseny do plastové zkumavky k centrifugaci při 328 x g po dobu 10 min. Pelet byl rozsuspodován v 10 ml kultivačního média. Počet buněk byl stanoven nabarvením trypanovou modří a počítáním v Bürkerově komůrce. Po zjištění počtu buněk byla jejich suspenze naředěna kultivačním médiem se sérem na koncentraci buněk tak, aby po vysetí na příslušnou kultivační desku byla jejich koncentrace 1.10<sup>5</sup> buněk na ml. Objem a koncentrace suspenze potřebné pro dosažení koncentrace 1.10<sup>5</sup> buněk/cm<sup>2</sup> je uvedena v Tab. 2. Po vysetí buněk následovala 24 hod inkubace v inkubátoru.

Tab. 2 Objem a koncentrace buněk pro jednotlivé kultivační desky.

Typ desky	Plocha (cm <sup>2</sup> )	Objem (ml)	Koncentrace buněk/ml
6 – jamek	9,45	1,5	6,3.10 <sup>5</sup>
24 – jamek	1,9	0,5	3,8.10 <sup>5</sup>
96 – jamek	0,32	0,2	1,6.10 <sup>5</sup>
Petriho miska	64	10	6,4.10 <sup>5</sup>

### 3.3.3. Nanesení látek na buňky

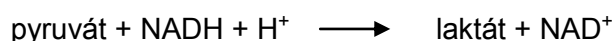
Zásobní roztoky alkaloidů (SG: 1,005 mM, DHSG: 10,05 mM v DMSO) byly ředěny DMSO na koncentrace v rozmezí u SG: 0,025 mM – 1,005 mM a DHSG: 0,078 mM – 10,05 mM. Připravené roztoky v DMSO byly smíchány s médiem bez séra v poměru 1:200, aby výsledná koncentrace DMSO v kultivačním médiu bez séra byla max. 0,5 %. Kultivační médium se sérem, ve kterém byly buňky kultivovány, bylo nahrazeno médiem bez séra s testovanými látkami o požadovaných koncentracích SG (výsledné koncentrace SG se pohybovaly v rozmezí 0,125 – 5  $\mu$ M a DHSG v rozmezí 0,388 – 50  $\mu$ M). Kontrola obsahovala stejný alikvot DMSO. Následovala inkubace buněk v inkubátoru při 37 °C.

### 3.3.4. Cytotoxicita alkaloidů

Buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s alkaloidy o různé koncentraci 24 hod, pak bylo médium odebráno pro stanovení aktivity LDH v médiu a bylo provedeno stanovení životnosti buněk pomocí neutrální červeně (NČ). Cytotoxicitu alkaloidů bylo nutno stanovit pro další experimenty.

#### 3.3.4.1. Měření cytotoxicity stanovením aktivity LDH v médiu

Laktátdehydrogenasa LDH (EC.1.1.1.27) je stabilní cytoplazmatický enzym přítomný ve všech buňkách, který při poškození buňky je uvolňován ven. Tento test je rychlou, jednoduchou a levnou metodou pro stanovení změn v plazmatické membráně způsobených inkubací s toxickými látkami. Enzym redukuje pyruvát na laktát oxidací NADH na NAD<sup>+</sup> a měří se změna absorbance při 340 nm.



K 50  $\mu$ l vzorku média odebraného po 24 hodinové inkubaci s alkaloidy/či bez bylo přidáno 150  $\mu$ l pufru pro měření aktivity LDH a byla sledována změna absorbance při 340 nm po dobu 3 min.

#### 3.3.4.2. Měření cytotoxicity pomocí neutrální červeně

Podstatou testu s NČ je fakt, že jen živé buňky jsou schopné NČ absorbovat do lysozomů, u poškozených či mrtvých buněk se tato schopnost snižuje. Množství akumulovaného barviva je tak přímo úměrné počtu živých buněk.

Po odsátí média bylo na buňky aplikováno 40  $\mu$ l roztoku neutrální červeně. Po 3 hodinové inkubaci při 37 °C byly buňky omyty 200  $\mu$ l fixačního roztoku. Následně bylo přidáno 200  $\mu$ l extračního roztoku. Po rozpuštění barviva byla změřena



absorbance při 540 nm a stanovena hodnota IC<sub>50</sub>, odpovídající koncentraci testované látky, při které přežívá 50 % buněk.

### 3.3.5. Fototoxicita alkaloidů

#### 3.3.5.1. Ozáření buněk

Principem testu fototoxicity je inkubace buněk se studovanými látkami a následné ozáření buněk netoxickou dávkou UVA záření. Po aplikaci UVA záření je sledován nárůst toxicity. Toxicita se sleduje měřením životnosti buněk pomocí inkorporace neutrální červeně. Výsledky fototoxicity se srovnávají s toxicitou samotných látek. Pokud je pozorován nárůst toxicity, látka má fototoxické vlastnosti. Protože sluneční záření obsahuje také UVB složku, byla testována fototoxicita vyvolaná i netoxickými dávkami UVB záření.

Po 24 hodinové inkubaci s látkami bylo médium odstraněno, buňky byly opláchnuty PBS (3 krát) a na buňky byl aplikován roztok PBS. Objem PBS byl poloviční, než je obvyklý objem média při kultivaci buněk. Buňky byly ozářeny netoxickými dávkami UVA (2,5 J/cm<sup>2</sup>) nebo UVB (25, 50, 100 mJ/cm<sup>2</sup>) záření pomocí solárního simulátoru SOL-500 po dobu vypočítanou podle vzorce (4). Doby ozáření pro UVA při průměrné intenzitě 5,3 J/cm<sup>2</sup> nebo UVB záření při průměrné intenzitě 1 J/cm<sup>2</sup> jsou uvedeny v Tab. 3.

$$\text{doba ozáření (min)} = \frac{\text{dávka (J/cm}^2\text{)} * 1000}{\text{naměřená intenzita (J/cm}^2\text{)} * 60} \quad (4)$$

Tab. 3 Doby ozáření buněk UVA nebo UVB zářením.

Dávka UVA záření (J/cm <sup>2</sup> )	Naměřená intenzita (J/cm <sup>2</sup> )	Doba ozáření
2,5	5,3	7 min 52 s
Dávka UVB záření (J/cm <sup>2</sup> )	Naměřená intenzita (J/cm <sup>2</sup> )	Doba ozáření
25	1	25 s
50	1	50 s
100	1	1 min 40 s

Při ozařování byly desky chlazeny, aby se předešlo přehřátí buněk. Paralelně byl prováděn experiment, kdy buňky nebyly ozařovány UVA nebo UVB zářením. Kontrolní buňky byly v době ozařování inkubovány v PBS a uloženy v inkubátoru. Všechny

manipulace byly shodné. Po ozáření byly buňky inkubovány v médiu bez séra 0 – 4 hod a následně bylo provedeno měření příslušných parametrů (životnost buněk pomocí NČ, hladiny reaktivních forem kyslíku, poškození DNA pomocí jednobuněčné gelové elektroforézy, biodostupnost a biotransformace SG a DHSG).

### **3.3.6. Stanovení reaktivních forem kyslíku**

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou reaktivní molekuly obsahující kyslík, jejichž reaktivita je způsobena přítomností nepárového elektronu ve valenční vrstvě. Pro měření ROS je používána fluorescenční sonda dihydrofluorescein acetát, který proniká do buňky, kde dochází k hydrolýze acetátu intercelulárními esterasami. Vzniklý dihydrofluorescein reaguje s oxidanty uvnitř buňky, dochází k jeho oxidaci na fluorescein, jehož fluorescenci lze detekovat (Hempel et al., 1999).

K preinkubovaným buňkám na 6-jamkových deskách s testovanými látkami (výsledná koncentrace SG: 1  $\mu\text{M}$  a DHSG: 1  $\mu\text{M}$ ) a ozářených UVA zářením o dávce 2,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , byl po 0, 1, 2, 3, 4 hodině od ozáření aplikován pracovní roztok fluorescenční sondy dihydrofluoresceinu acetátu v PBS o výsledné koncentraci 5  $\mu\text{M}$ . Po 15 min inkubaci v inkubátoru, kde byly chráněny před světlem, bylo médium se sondou odsáto a buňky byly opláchnuty nesterilním PBS. Po přidání PBS byly buňky seškrabány a sonikovány na ledu (10 – 15 impulsů). Následovala centrifugace při 1250 x g, po dobu 5 min a teplotě 4 °C. U supernatantu byla změřena fluorescence (excitace při 500 nm a emise při 525 nm) pro stanovení ROS a změřena koncentrace proteinu.

#### **3.3.6.1. Stanovení proteinů bicinchoninovou metodou (BCA)**

Bicinchoninová metoda je založena na redukci měďnatého iontu na měďný, se kterým vytváří kyselina bicinchoninová purpurový komplex (Smith et al., 1985).

Pro stanovení proteinů bylo k 10  $\mu\text{l}$  supernatantu přidáno 200  $\mu\text{l}$  směsi činidla A s činidlem B v poměru 50:1. Následovala inkubace 15 – 30 min. Absorbance byla měřena při 562 nm. Pro každý zásobní roztok barviva je nutno připravit kalibrační křivku – závislost vzrůstající koncentrace sérového hovězího albuminu (do 0,4 mg/ml) ku  $A_{562}$ .

### **3.3.7. Transformace SG a DHSG**

Po dosažení monovrstvy buněk na Petriho miskách byly přidány látky (výsledná koncentrace SG: 0,5  $\mu\text{M}$  a DHSG: 0,5  $\mu\text{M}$ ). Následovala 24 hodinová inkubace (37 °C,

5% CO<sub>2</sub>), po které byly buňky opláchnuty dvakrát PBS a ozářeny UVA zářením o dávce 2,5 J/cm<sup>2</sup> v PBS. Po ozáření bylo PBS nahrazeno médiem. Po 0, 1, 2, 3, 4 hodinové inkubaci bylo z buněk odsáto médium, buňky byly opláchnuty PBS, seškrabány do 1 ml PBS a centrifugovány (150 x g, 5 min, 4 °C). Supernatant byl odlit a pelet rozsuspendován v PBS, centrifugace (150 x g, 5 min, 4 °C). Po centrifugaci byl supernatant odsát a buněčný pelet rozpuštěn v 200 µl mobilní fáze A vortexováním (1 min), sonikováním (2 min) a následným vortexováním (1 min). Poté byl homogenát centrifugován při 14 000 x g při pokojové teplotě (3 min). Supernatant byl následně analyzován pomocí HPLC/ESI-MS dle kapitoly 3.3.11.

### **3.3.8. Jednobuněčná gelová elektroforéza**

Gelová elektroforéza jednotlivých buněk (SCGE - single cell gel electroforesis) je elektroforetická metoda pro zjištění poškození DNA v jednotlivých buňkách. Buňky jsou imobilizovány v agaróze na mikroskopických sklíčkách a lyzovány v mírně alkalickém roztoku, jehož působením jsou z buněk odstraněny membrány a cytoplazma. Následně je DNA denaturována elektroforetickým puřem. Při samotné elektroforéze migruje poškozená DNA rychleji, proto po obarvení fluorescenčním barvivem poškozená DNA připomíná kometu (Dvořák & Matějovičová, 2008).

Mikroskopická podložní sklíčka byla vyvařena v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v poměru 1:4 s H<sub>2</sub>O) a potažena 1% standardní agarózou rozpuštěné v destilované vodě. Po uschnutí agarózy byla skla vložena na 30 min při 60 °C do sušárny, aby došlo k zapečení agarózy. Na sklíčko potažené agarózou bylo nanášeno 85 µl 1% standardní agarózy (HMP) v PBS, která byla ihned přikryta krycím sklíčkem. Po ztuhnutí bylo krycí sklíčko odstraněno.

Buňky po inkubaci s testovanými látkami byly opláchnuty PBS, k buňkám bylo přidáno 50 µl trypsinu a po jejich uvolnění bylo přidáno 50 µl fetálního séra pro zastavení štěpící reakce (zastavovací roztok). Po naředění suspenze PBS byly buňky centrifugovány 5 min, při teplotě 4 °C a 160 x g. Supernatant byl odstraněn a pelet rozsuspendován v 200 µl PBS. Ze vzorků buněk v PBS bylo odebráno 20 µl a smícháno s 85 µl 1% nízkotuhnoucí agarózy (LMP – low melting point) v PBS. Na podložní sklíčko bylo napipetováno 85 µl směsi agarózy a buněk (koncentrace buněk na sklíčko by měla být 10<sup>4</sup> – 2.10<sup>4</sup>) a směs byla přikryta krycím sklíčkem.

Po ztuhnutí gelu s buňkami bylo krycí sklíčko staženo a skla vložena na 1 hod do vychlazeného lyzačního roztoku. Po lýze buněk následovalo alkalické rozleptání, kdy sklíčka s buňkami v agarózovém gelu byla umístěna do elektroforetické vany a přelita vychlazeným elektroforetickým puřem. Samotná horizontální elektroforéza probíhala

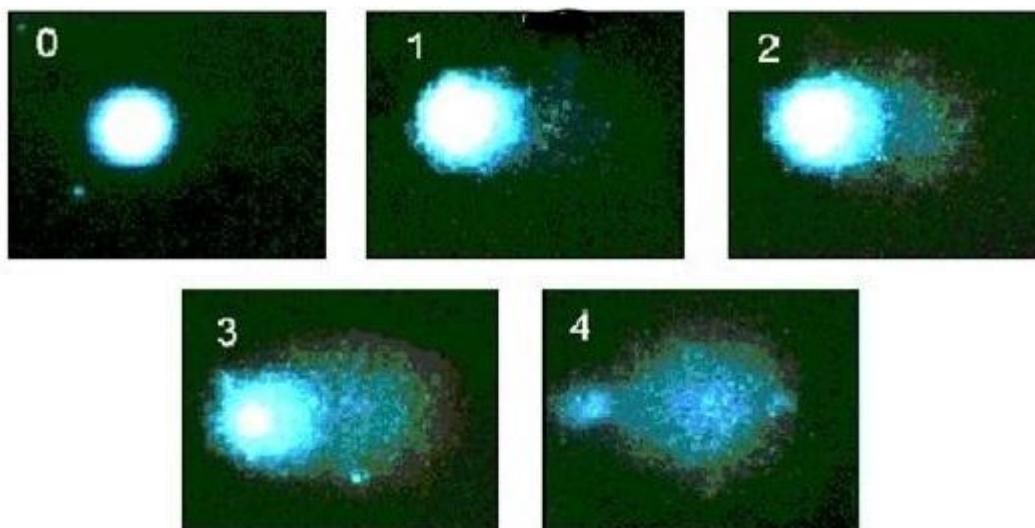
20 min při napětí 20 V. Po skončení byla sklíčka propláchnuta 3 x 5 min vychlazeným neutralizačním roztokem, opláchnuta destilovanou vodou a nechána volně uschnout.

### 3.3.8.1. Vyhodnocení

Poškození DNA buněk bylo analyzováno pomocí fluorescenčního mikroskopu. Vizualizace komet byla provedena fluorescenčním barvivem ethidium bromid. Na plochu s buňkami bylo aplikováno 20  $\mu$ l barviva a překryto krycím sklíčkem. U každého vzorku bylo hodnoceno 100 buněk, které byly manuálně kategorizovány do 5 tříd podle rozsahu poškození DNA (Obr. 13). Podle uvedeného vzorce (5) bylo vypočítáno celkové poškození DNA, které nabývá hodnot od 0 do 400.

$$\text{Celkové poškození} = 0 \cdot N_0 + 1 \cdot N_1 + 2 \cdot N_2 + 3 \cdot N_3 + 4 \cdot N_4 \quad (5)$$

$N_0, N_1, N_2, N_3, N_4$  = množství buněk v jednotlivých kategoriích



Obr. 13 Pět tříd pro vizuální hodnocení rozsahu poškození DNA buněk (0 – nepoškozená buňka, 1 – mírně poškozená buňka, 2 – středně poškozená buňka, 3 – silně poškozená buňka, 4 – úplně poškozená buňka).

### 3.3.9. Stanovení životnosti pomocí mitochondriálního potenciálu

Mitochondriální potenciál ( $\psi$ ) je napětí mezi vnitřní a vnější membránou v mitochondriích. Pokles  $\psi$  vede k otevření kanálů ve vnitřní mitochondriální membráně pro nízkomolekulární látky, což má za následek uvolnění cytochromu c a dalších proapoptických proteinů iniciujících buněčnou smrt.

K preinkubovaným buňkám na 96-jamkových deskách s testovanými látkami (výsledná koncentrace SG a DHSG: 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5  $\mu$ M) a ozářenými UVA zářením

o dávce  $2,5 \text{ J/cm}^2$  byl 4 hodiny od ozáření aplikován pracovní roztok fluorescenční sondy tetramethylrhodamin ethyl ester v DMSO o výsledné koncentraci  $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ . Po inkubaci 15 – 30 min bylo medium se sondou odsáto, buňky byly opláchnuty PBS a v objemu  $0,1 \text{ ml}$  PBS byla změřena fluorescence buněk.

### **3.3.10. Transdermální transport**

Základním laboratorním zařízením pro testování transdermálního transportu chemických látek *in vitro* jsou difuzní komůrky (Kotingová et al., 2009).

Použité komůrky jsou vyrobeny ze skla a skládají se ze dvou částí. Horní část je označována jako donorová, spodní část jako receptorová. Kůže po rozmrazení nebo čerstvá byla upevněna mezi tyto dvě části pokožkou nahoru. Spodní vrstva kůže (dermis) ležela na hladině receptorové tekutiny, kterou byl fosfátový pufr (PBS) nebo médium o objemu  $9 \text{ ml}$ .

Na plochu pokožky v komůrce ( $1,7 \text{ cm}^2$ ) byly aplikovány  $2 \text{ ml}$  roztoku SG nebo DHSG o výsledné koncentraci  $100 \text{ }\mu\text{M}$  ve fosfátovém pufru o pH  $6,8$  a  $8,5$  (donorová tekutina). Jako kontrola byl aplikován pufr bez testovaných látek. Současně byl sledován vliv změny polaroty prostředí na transdermální transport studovaných látek přidávkem ethanolu ( $20$  a  $45 \%$ ). Tekutina v receptorové části byla neustále míchána pomocí magnetického míchadla. V průběhu experimentu byly komůrky uloženy ve vodní lázni o teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , což zajišťuje přibližnou normální teplotu kůže lidského těla ( $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Donorová část a plnicí otvor receptorové části komůrky byly přikryty parafilmem.

Po 20 hodinách byla kůže vyjmuta z komůrky a nastříhána na tenké proužky, které byly zafixovány do arabské gummy. Po ztuhnutí gummy byla kůže nařezána pomocí kryostatu na tenké řezy, které po přenesení na mikroskopické podložní sklíčko a zalití fosfátovým pufrem byly překryty krycím sklíčkem. Preparáty kůže byly okamžitě pozorovány fluorescenčním mikroskopem, do které vrstvy kůže látky penetrovaly.

Pomocí HPLC/ESI-MS byl testován obsah SG a případných jeho metabolických produktů v kůži, původním vzorku nanášeném na kůži, v receptorové tekutině a v roztoku, kterým byla kůže po ukončení transdermálního transportu opláchnuta ( $2 \text{ ml}$  PBS). Kůže byla homogenizována v mobilní fázi A v poměru  $1:3$ , homogenizovaná směs byla centrifugována ( $2383 \times g$ ,  $10 \text{ min}$ ), supernatant a další vzorky byly naředěny mobilní fází A v poměru  $1:1$ . Naředěné vzorky byly centrifugovány ( $2383 \times g$ ,  $10 \text{ min}$ ) a analyzovány pomocí HPLC/ESI-MS.

### 3.3.11. HPLC/ESI-MS

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická metoda, při které jsou separovány jednotlivé složky vzorku pro zjištění jejich přítomnosti a koncentrace. Vzorek je aplikován do proudu mobilní fáze protékající kolonou, v níž je stacionární fáze o velikosti několika mikrometrů.

Analýzy byly provedeny na HPLC systému vybaveném odplyňovacím zařízením (SRD-3400, 4 DEGASSER CH), binární pumpou pro vytváření vysokotlakého gradientu (HPG-3400SD), autosamplérem (WPS-3000 TSL ANALYTICAL), kolonovým termostatem (TCC-3000RS) a detektorem s diodovým polem - DAD (DAD-3000, 190-400 nm).

K separaci byla použita chromatografická kolona (150 mm × 2,1 mm, 5 μm). Na kolonu byly aplikovány vzorky v mobilní fázi A, lineární gradientová eluce probíhala dle programu (% v): 0-9 min (10-55 % B), 9-12 min (55-60 % B), 12-12,1 min (60-10 % B), 12,1-16 min (10 % B). Průtok mobilní fáze B činil 0,4 ml.min<sup>-1</sup>, teplota autosampléru byla udržována na 10 °C a teplota kolony byla 30 °C. Chromatografický systém byl napojen na ESI-MS systém.

Pro MS analýzy byl použit přístroj LCQ Fleet vybavený lineární iontovou pastí. Vzorky byly ionizovány elektrosprejem v pozitivním módu s následujícími parametry: napětí spreje (4,75 kV), teplota kapiláry (375 °C) a napětí kapiláry 30 V. Dusík byl použit jako sušící plyn, jeho průtok byl 50, 5 a 1 relativních jednotek. Jako kolizní plyn bylo použito hélium. Měřena byla intenzita MS<sup>2</sup> fragmentů s použitím kolizně indukované disociace (CID), intenzita CID byla 35 % maximální intenzity. Sledována byla fragmentace m/z 332 → pro sanguinarin a 334 → pro dihydrosanguinarin.

### 3.3.12. Statistická analýza

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

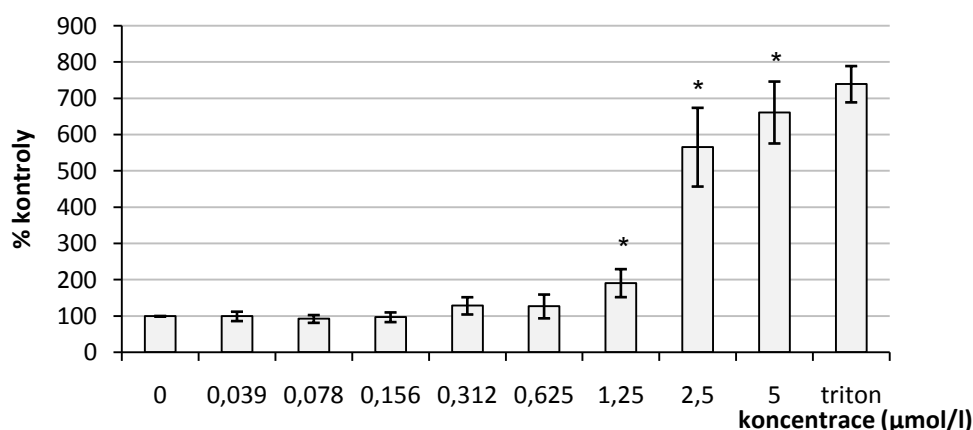
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Toxicita sanguinarinu (SG), dihydrosanguinarinu (DHSG) na lidských kožních fibroblastech měřená změnou aktivity laktátdehydrogenasy (LDH) v médiu

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

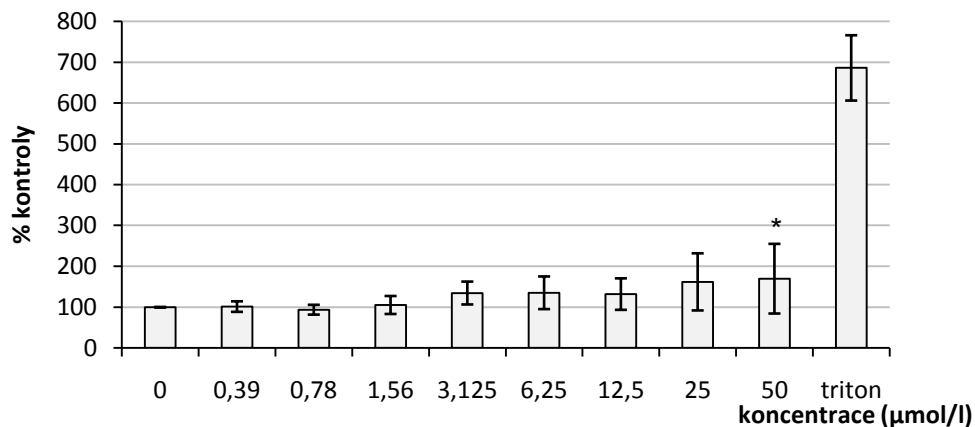
Po 24 hodinové inkubaci buněk s různými koncentracemi testovaných látek, SG a DHSG byla sledována aktivita LDH uvolněného do kultivačního média. Změna aktivity LDH byla měřena jako pokles absorbance  $\Delta A_{340}/\text{min}$ , který byl způsoben oxidací NADH. Triton byl použit jako pozitivní kontrola (maximální poškození buněk).

Nárůst aktivity LDH v médiu byl pozorován u SG v koncentraci 1,25  $\mu\text{mol/l}$  (191 % kontroly), k výraznému nárůstu došlo u koncentrace 2,5  $\mu\text{mol/l}$  a 5  $\mu\text{mol/l}$  (566, resp. 661 % kontroly) (obr. 14).



Obr. 14 Vliv různých koncentrací SG na aktivitu LDH v kultivačním médiu. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od kontroly ( $p < 0,05$ ).

U buněk inkubovaných s DHSG o koncentraci v rozmezí 0,39 - 50  $\mu\text{mol/l}$  nebyla pozorována změna aktivity LDH v médiu (obr. 15). DHSG má v porovnání s SG výrazně nižší toxicitu.



Obr. 15 Vliv různých koncentrací DHSG na aktivitu LDH v kultivačním médiu. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od buněk inkubovaných s tritonem ( $p < 0,05$ ).

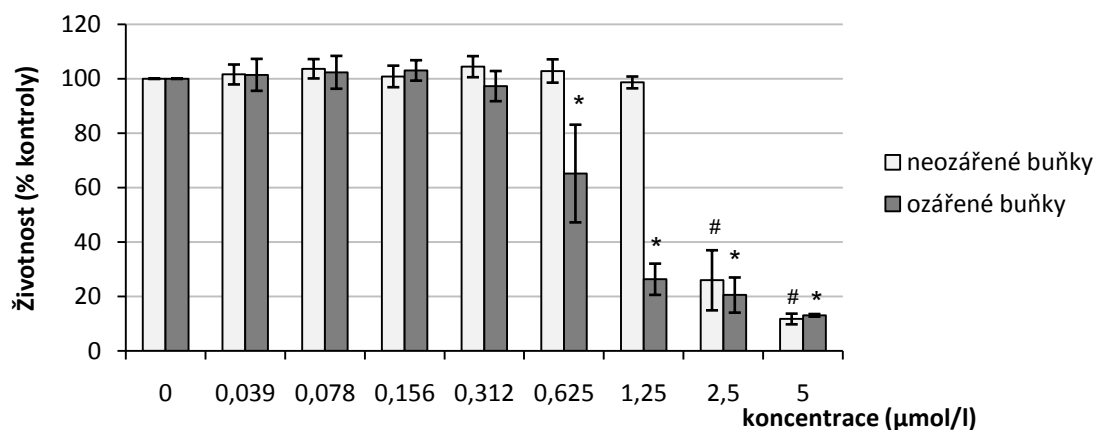
## 4.2. Fototoxicita SG, DHSG vyvolaná složkami UV záření na lidských kožních fibroblastech měřená inkorporací neutrální červeně

Po 24 hodinové inkubaci lidských kožních fibroblastů s SG (0-5 µmol/l) a DHSG (0-50 µmol/l) byly buňky ozářeny netoxickými dávkami UVA (2,5 J/cm<sup>2</sup>) nebo UVB (25, 50, 100 mJ/cm<sup>2</sup>) a po 4 hod inkubaci při 37 °C bylo sledováno poškození buněk měřením inkorporace NČ do buněk. Neozářené a ozářené buňky bez studovaných alkaloidů byly použity jako kontroly životnosti buněk a netoxické dávky příslušného UV záření.

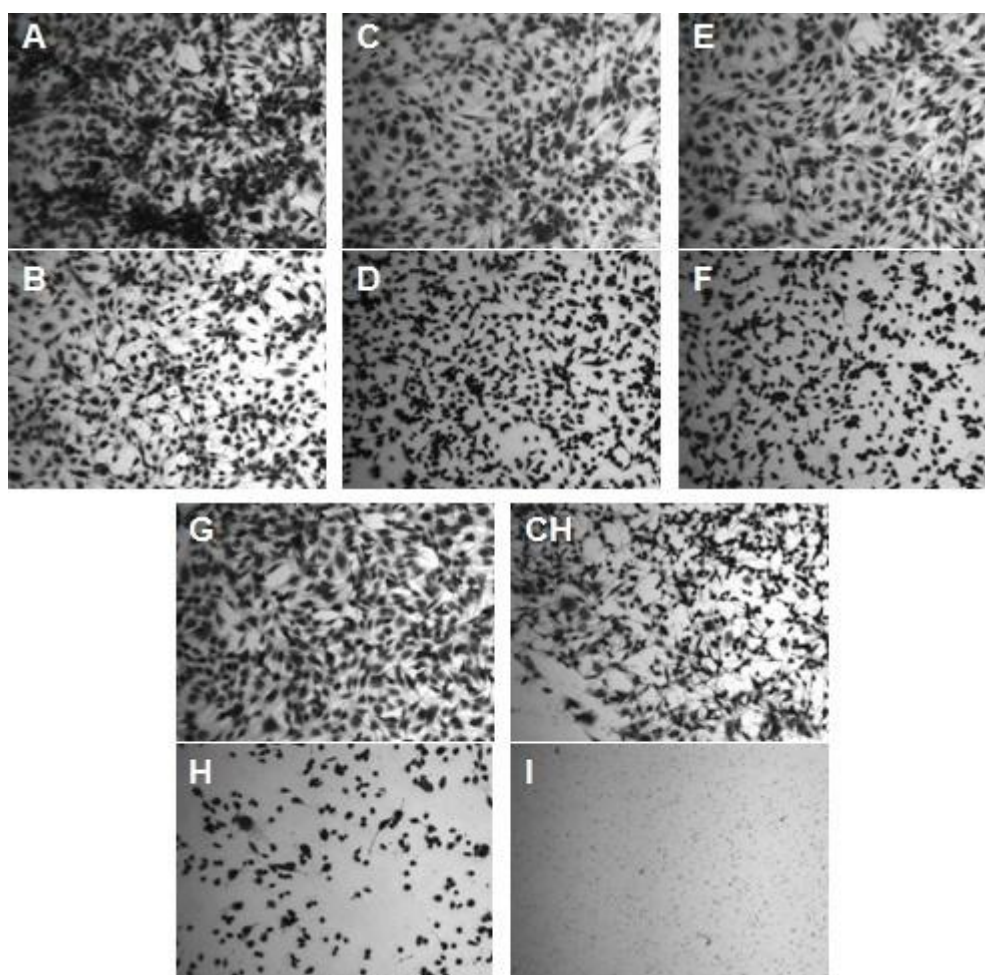
### 4.2.1. Fototoxicita vyvolaná UVA zářením

Vlivem UVA došlo k prohloubení toxicity samotného SG (Obr. 16 a 17). IC<sub>50</sub> samotného SG měla hodnotu 1,94 µmol/l, působením UVA záření o dávce 2,5 J/cm<sup>2</sup> hodnota IC<sub>50</sub> klesla na 0,865 µmol/l, dochází tedy k 2,25x vyššímu nárůstu toxicity. Tento nárůst toxicity není považován za dostačující, abychom mohli prohlásit látku za fototoxickou.



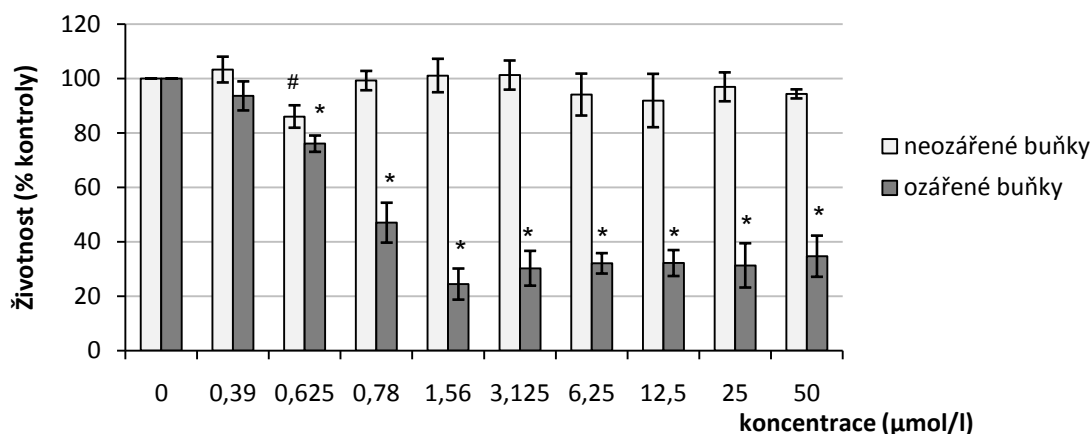


Obr. 16 Poškození fibroblastů působením SG a v kombinaci s UVA zářením o dávce  $2,5 \text{ J/cm}^2$  sledované inkorporací neutrální červeně. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ( $p < 0,05$ ). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly ( $p < 0,05$ ).

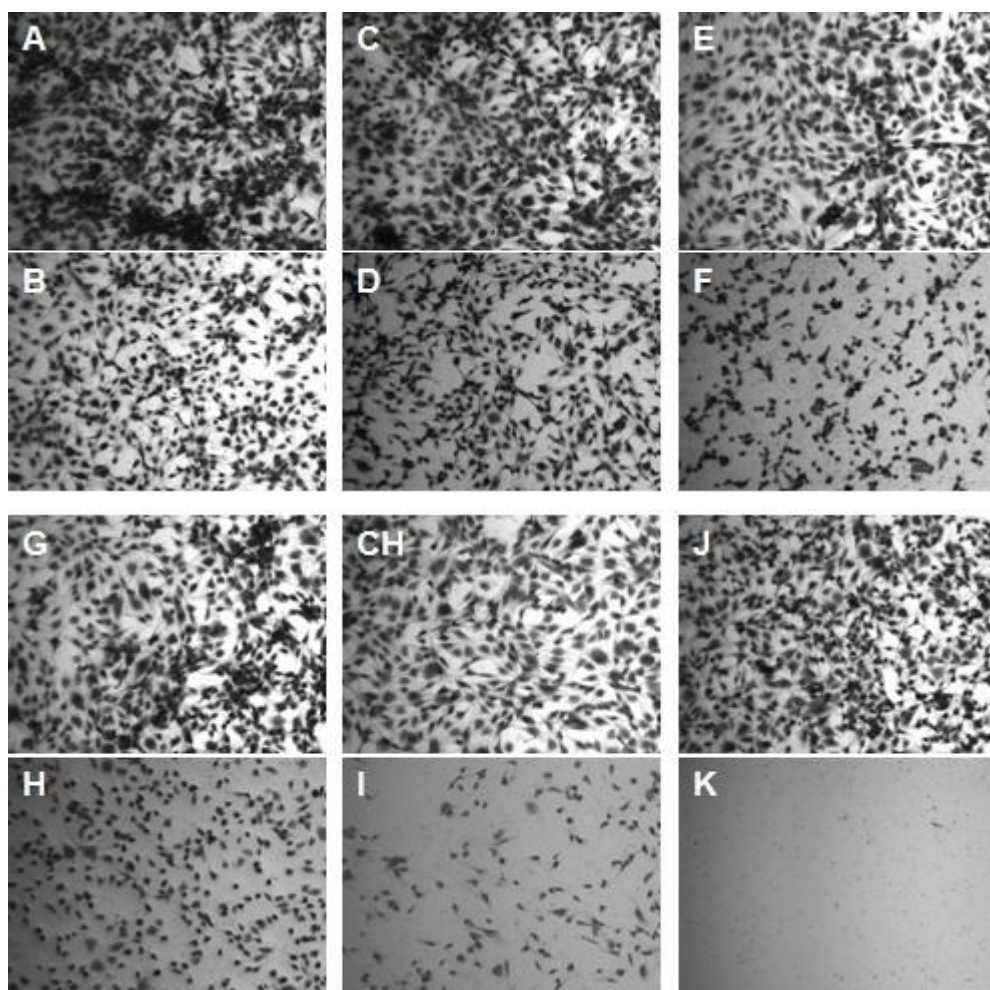


Obr. 17 Poškození fibroblastů po inkubaci s různými koncentracemi SG 4 hod po ozáření UVA a bez ozáření. (A) Kontrolní buňky, (B) UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (C) SG ( $0,315 \text{ µmol/l}$ ), (D) SG ( $0,315 \text{ µmol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (E) SG ( $0,625 \text{ µmol/l}$ ), (F) SG ( $0,625 \text{ µmol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (G) SG ( $1,25 \text{ µmol/l}$ ), (H) SG ( $1,25 \text{ µmol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (CH) SG ( $2,5 \text{ µmol/l}$ ), (I) SG ( $2,5 \text{ µmol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ). Zvětšeno 100x. Buňky byly barveny krystalovou violetí.

Toxický účinek samotného DHSG nebyl zaznamenán ani při dávce 50  $\mu\text{mol/l}$ . Působení UVA záření vyvolalo výrazný nárůst toxicity (obr. 18 a 19). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  DHSG v kombinaci s UVA záření o dávce 2,5  $\text{J/cm}^2$  dosáhla hodnoty 0,625  $\mu\text{mol/l}$ . I když nebylo možné zjistit přesnou hodnotu  $\text{IC}_{50}$  samotného DHSG ( $> 50 \mu\text{mol/l}$ ), je nárůst toxicity minimálně 80-ti násobný. DHSG je tedy možné považovat za fototoxický.



Obr. 18 Poškození fibroblastů působením DHSG a v kombinaci s UVA zářením o dávce 2,5  $\text{J/cm}^2$  pomocí inkorporace neutrální červeně. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ( $p < 0,05$ ). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly ( $p < 0,05$ ).



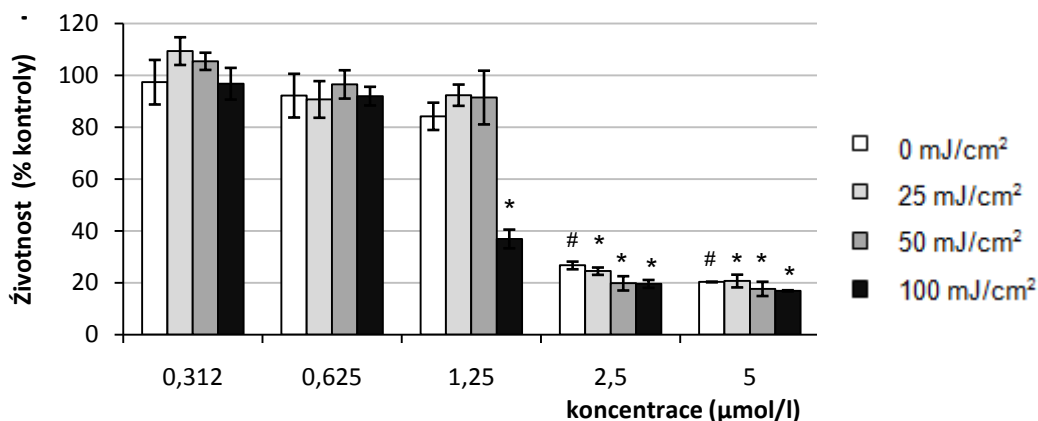
Obr. 19 Poškození fibroblastů inkubovaných s různými koncentracemi DHSG 4 hod po ozáření UVA a bez ozáření. (A) Kontrolní buňky, (B) UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (C) DHSG ( $0,39 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ), (D) DHSG ( $0,39 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (E) DHSG ( $1,56 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ), (F) DHSG ( $1,56 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (G) DHSG ( $3,125 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ), (H) DHSG ( $3,125 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (CH) DHSG ( $6,25 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ), (I) DHSG ( $6,25 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ), (J) DHSG ( $50 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ), (H) DHSG ( $50 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ). Zvětšeno 100x. Buňky byly barveny krystalovou violetí.

#### 4.2.2. Fototoxicita vyvolaná UVB zářením

UVB záření je v porovnání s UVA toxicitější složkou slunečního záření, protože přímo reaguje s biomolekulami, hlavně s bazemi nukleových kyselin a poškozuje je.

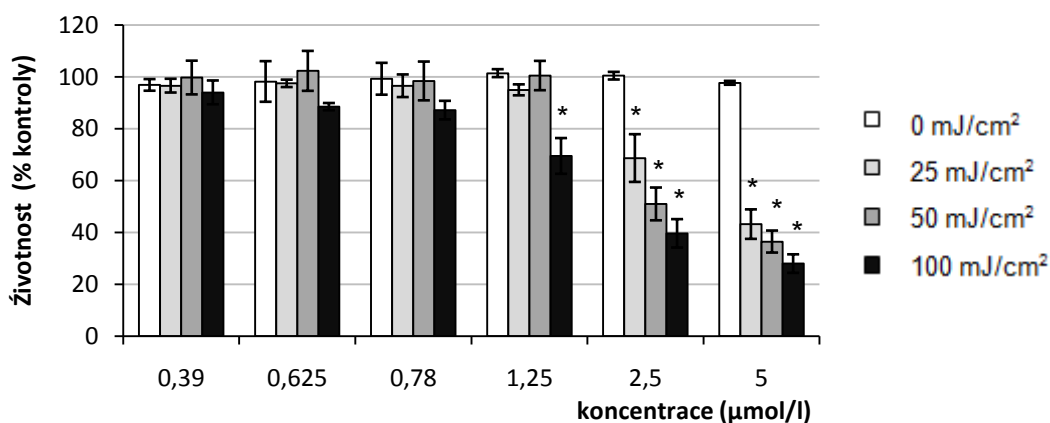
Za stejného experimentálního uspořádání jako při testování fototoxicity vyvolané UVA zářením bylo provedeno testování fototoxicity vyvolané netoxickými dávkami UVB záření ( $25, 50, 100 \text{ mJ/cm}^2$ ). Vlivem nejvyšší dávky UVB záření ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ) došlo v porovnání s nižšími dávkami UVB ( $25, 50 \text{ mJ/cm}^2$ ) k výraznému prohloubení toxicity alkaloidu už při koncentraci SG  $1,25 \text{ } \mu\text{mol/l}$  (obr. 20). Dávky UVB záření  $25 \text{ mJ/cm}^2$  a  $50 \text{ mJ/cm}^2$  v kombinaci s různými koncentracemi SG vykazují téměř srovnatelné výsledky a nárůst toxicity nebyl pozorován. Při vyšších dávkách SG  $2,5$  a  $5 \text{ } \mu\text{mol/l}$  je

samotný alkaloid už tak toxický, že při současném působení UVB záření nedochází k nárůstu toxicity.



Obr. 20 Stanovení poškození buněk působením SG a v kombinaci s UVB zářením o dávce 25 mJ/cm<sup>2</sup>, 50 mJ/cm<sup>2</sup>, 100 mJ/cm<sup>2</sup> pomocí inkorporace neutrální červeně. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly (p < 0,05). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly (p < 0,05).

Při studiu fototoxicity DHSG vyvolané UVB zářením byl při dávce UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup> pozorován postupný nárůst toxicity DHSG. Při koncentracích DHSG 2,5 a 5 µmol/l bylo pozorováno na dávce závislé prohloubení toxicity při použití všech dávek UVB záření (obr. 21).



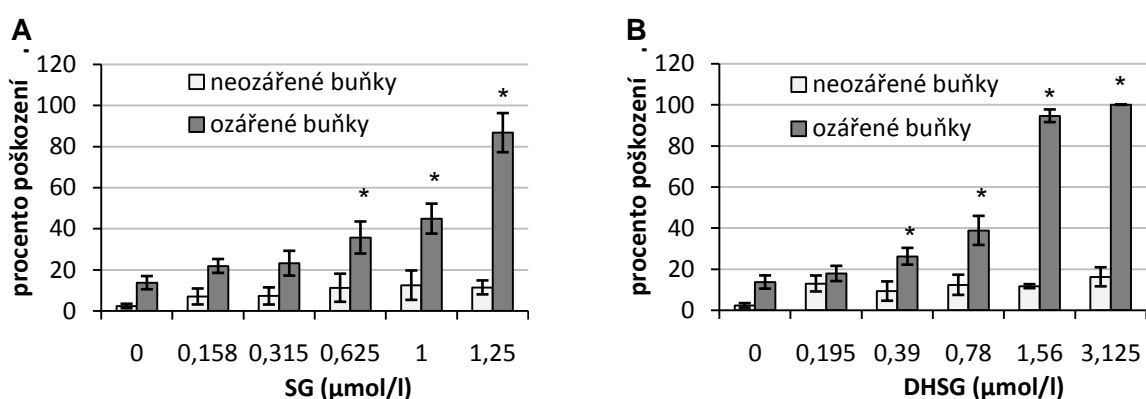
Obr. 21 Stanovení poškození buněk působením DHSG a v kombinaci s UVB zářením o dávce 25 mJ/cm<sup>2</sup>, 50 mJ/cm<sup>2</sup>, 100 mJ/cm<sup>2</sup> pomocí inkorporace neutrální červeně. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly (p < 0,05).

### 4.3. Poškození DNA fibroblastů po působení SG, DHSG a v kombinaci s UV zářením metodou SCGE

Samotné alkaloidy, SG a DHSG, jsou schopny od určité koncentrace vyvolávat poškození DNA. UVA na rozdíl od UVB záření, které je schopno přímo interagovat s bazemi nukleových kyselin, vyvolává poškození DNA až při vyšší dávce. Fibroblasty byly inkubovány s vybranými koncentracemi SG (0,158 - 1,25  $\mu\text{mol/l}$ ) a DHSG (0,195 - 3,125  $\mu\text{mol/l}$ ) po dobu 24 hod a po ozáření UV byly inkubovány další 4 hodiny při 37 °C. Poté bylo studováno poškození DNA (jednovláčenné zlomy) pomocí jednobuněčné gelové elektroforézy za alkalických podmínek (SCGE). Míra poškození DNA byla zjištěna po rozřazení buněk do 5 tříd (obr. 13) a dle vzorce (5) bylo vypočítáno celkové poškození DNA nabývající hodnot od 0 do 400. Hodnota 400 představuje 100% poškození buněk.

#### 4.3.1. Fototoxicita vyvolaná UVA zářením

Poškození DNA fibroblastů působením samotných alkaloidů SG, DHSG a při kombinaci alkaloidů s netoxickou dávkou UVA záření (2,5  $\text{J/cm}^2$ ) zachycuje obr. 22. Míra poškození DNA vlivem nízkých koncentrací SG (< 1,25  $\mu\text{mol/l}$ ) a DHSG (< 3,125  $\mu\text{mol/l}$ ) bez ozáření UVA nepřesahuje 12-15 %. Samotným UVA zářením došlo k nárůstu poškození asi o 14 %. UVA záření výrazně zvýšilo toxicitu obou alkaloidů. Téměř 100% poškození DNA bylo dosaženo při koncentraci 1,25  $\mu\text{mol/l}$  SG a 1,56  $\mu\text{mol/l}$  DHSG v kombinaci s UVA zářením o dávce 2,5  $\text{J/cm}^2$ . UVA záření výrazně zvyšuje poškození DNA vyvolané oběma alkaloidy. UVA prohlubuje genotoxický potenciál obou alkaloidů, především DHSG.



Obr. 22 Poškození DNA vyvolané SG, DHSG a jejich kombinace s UVA zářením o dávce 2,5  $\text{J/cm}^2$  metodou SCGE. (A) - SG, (B) - DHSG. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření.

\* Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ( $p < 0,05$ ).

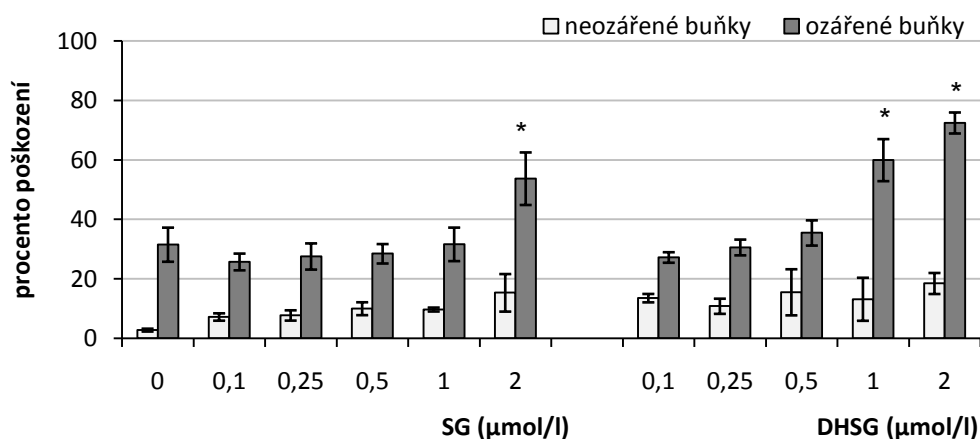
### 4.3.2. Fototoxicita vyvolaná UVB zářením

Vliv UVB záření na toxicitu alkaloidů SG a DHSG měřenou jako poškození DNA kožních buněk bylo testováno při dávce UVB záření 100 mJ/cm<sup>2</sup>.

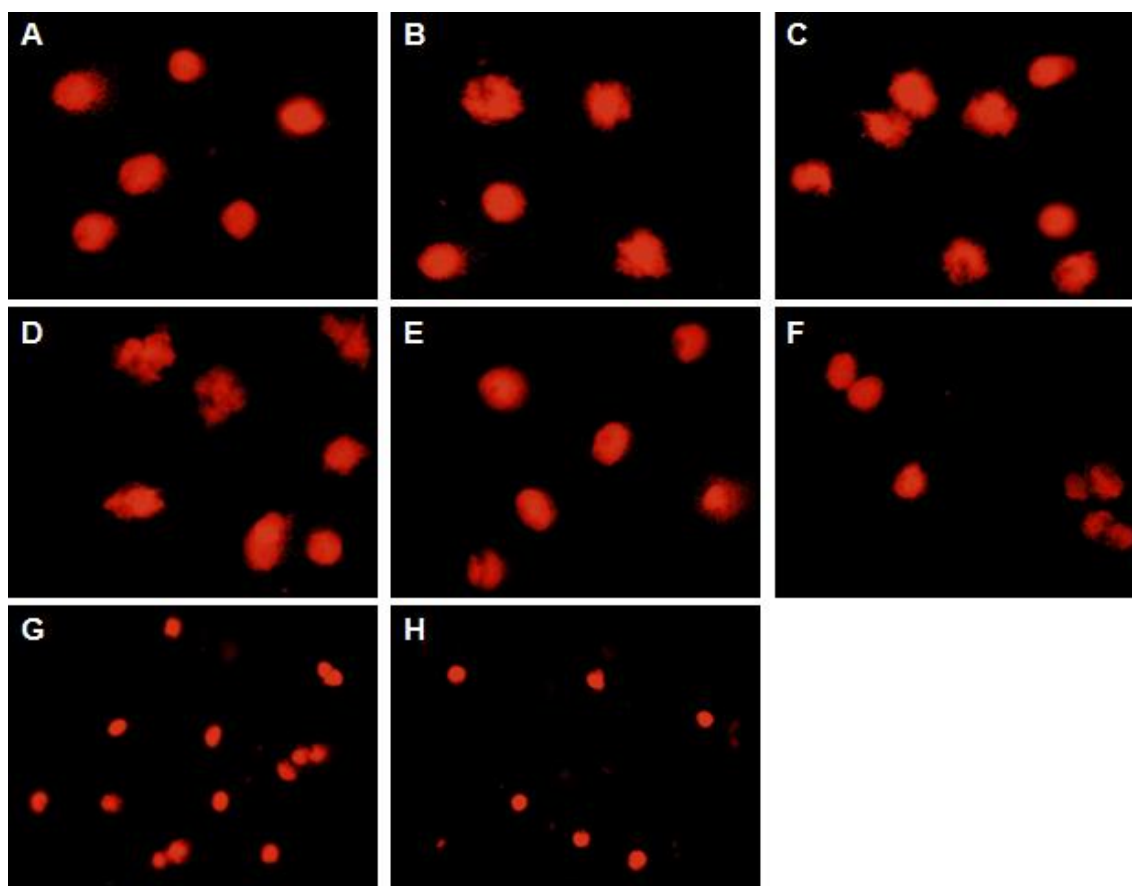
Samotná dávka UVB záření (100 J/cm<sup>2</sup>) měla výraznější toxický účinek na buňky kůže než UVA o dávce 2,5 J/cm<sup>2</sup> (obr. 23). Zvolená dávka UVB způsobila nárůst toxicity o 28 %.

Samotný SG vykazoval mírný nárůst poškození se vzrůstající koncentrací. DHSG, který je výrazně méně toxický vzhledem ke zjištěné hodnotě IC<sub>50</sub>, byl toxičtější než SG při zvolených koncentracích, ale toxicita nevykazuje koncentrační závislost.

Pokud byly buňky ozářeny UVB zářením bylo kromě nepoškozených jader a kometek možné pozorovat vznik jader s narušeným okrajem, které ale neměly charakter typických kometek. Tato jádra byla počítána do nižší škály poškození (třída 1). Kombinace SG s UVB zářením vedla k nárůstu toxicity při koncentraci 2 μmol/l. U DHSG UVB záření zvýšilo toxicitu už při nižší koncentraci 1 μmol/l.



Obr. 23 Poškození DNA vyvolané SG, DHSG a jejich kombinace s UVB zářením o dávce 100 mJ/cm<sup>2</sup> sledované metodou SCGE. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly (p < 0,05).



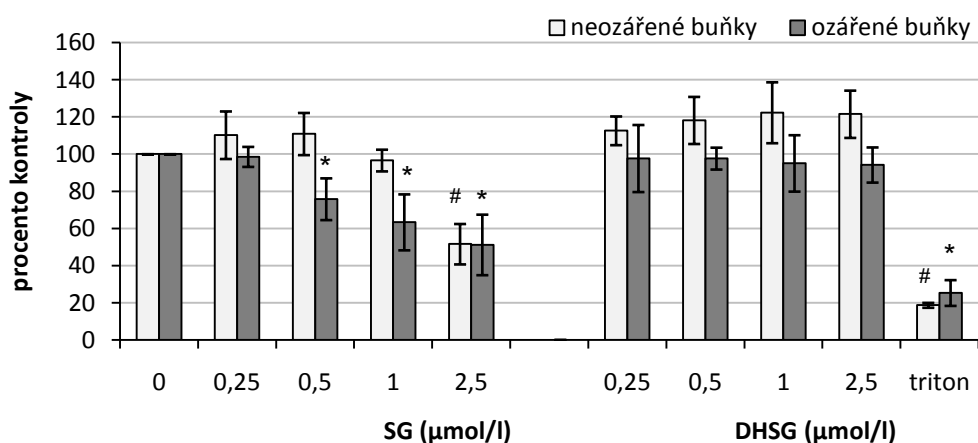
Obr. 24 Stanovení poškození DNA působením různých koncentrací SG a DHSG v kombinaci s UVB zářením o dávce  $100 \text{ mJ/cm}^2$ . (A) UVB ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ), zvětšeno 400x, (B) SG ( $0,158 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVB ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ), zvětšeno 400x, (C) SG ( $0,625 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVB ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ), zvětšeno 400x, (D) SG ( $1 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVB ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ), zvětšeno 400x, (E) SG ( $1,25 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVB ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ), zvětšeno 400x, (F) DHSG ( $0,39 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVB ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ) zvětšeno 400x, (G) DHSG ( $1,56 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) + UVB ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ), zvětšeno 200x, (H) DHSG ( $3,125 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) zvětšeno 200x.

#### 4.4. Stanovení fototoxicity SG a DHSG měřením mitochondriálního potenciálu

Pro sledování toxicity/fototoxicity bylo využito měření změn potenciálu vnitřní mitochondriální membránu ( $\Delta\psi$ ), k čemuž byla použita fluorescenční sonda ethyl ester tetramethylrhodaminu (TMRE). Fluorescenční molekula se hromadí v matrix mitochondrií živých buněk a v případě ztráty  $\psi$  dochází k poklesu intenzity fluorescence (Scaduto & Grotyohann, 1999).

Buňky inkubované s testovanými látkami SG a DHSG ( $1,0$ ;  $1,25$ ;  $1,5$ ;  $2,0$ ;  $2,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) byly ozářeny netoxickou dávkou UVA záření o dávce  $2,5 \text{ J/cm}^2$  a po 4 hodinách byla aplikována fluorescenční sonda TMRE v DMSO o výsledné koncentraci  $0,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$ . Fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce  $556 \text{ nm}$  a emisní vlnové délce  $577 \text{ nm}$ .

Po změření fluorescence představují kontrolní buňky 100 % kontroly. Bylo zjištěno, že SG (2,5  $\mu\text{mol/l}$ ) snižuje úroveň mitochondriálního potenciálu na polovinu v porovnání s kontrolními buňkami, v případě ozáření UVA dochází k poklesu  $\psi$  již při koncentraci 0,5  $\mu\text{mol/l}$  a dále klesá v závislosti na koncentraci (obr. 25). Nicméně působením UVA na nejvyšší testovanou koncentraci SG (2,5  $\mu\text{mol/l}$ ) nedochází ke změně potenciálu, protože výsledná hodnota je shodná s hodnotou bez ozáření. Toto zjištění je možné vysvětlit tím, že samotný SG snižuje  $\psi$  a při dávce 2,5  $\mu\text{mol/l}$  je pokles  $\psi$  tak výrazný, že UVA neprohloubí jeho toxický účinek. U všech použitých koncentrací DHSG nebyl pozorován jeho toxický účinek, naopak došlo k zvýšení  $\psi$ , působení UVA nezvýšilo výrazně toxicitu, i když došlo k poklesu  $\psi$  asi o 20%. Při žádné testované koncentraci alkaloidu či jejich kombinace s UVA nedošlo k poklesu až na hodnotu 100% toxicity (buňky lyzované tritonem).



Obr. 25 Stanovení životnosti buněk pomocí mitochondriálního potenciálu působením různých koncentrací SG, DHSG a v kombinaci s UVA zářením o dávce 2,5  $\text{J/cm}^2$ . Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ( $p < 0,05$ ). # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly ( $p < 0,05$ ).

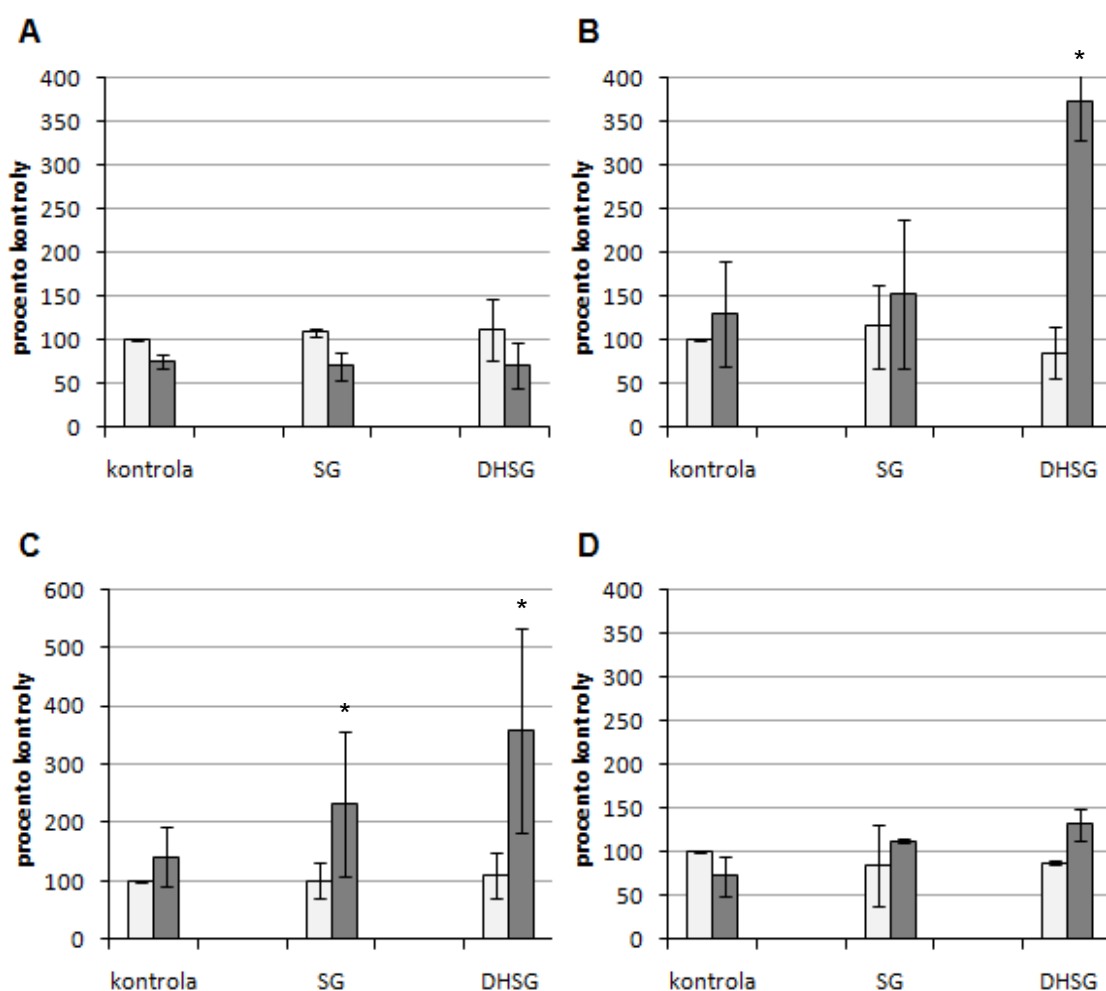
#### 4.5. Produkce ROS při UVA- a UVB-fototoxické reakci vyvolané studovanými alkaloidy

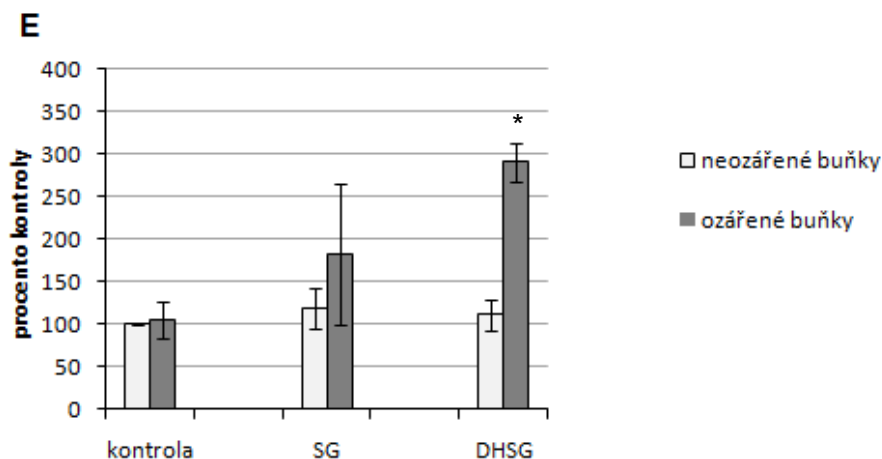
Buňky byly s SG (1  $\mu\text{mol/l}$ ) a DHSG (1  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubovány 24 hod, po ozáření UVA (2,5  $\text{J/cm}^2$ ) a UVB (100  $\text{mJ/cm}^2$ ) byly inkubovány 0, 1, 2, 3, 4 hod při 37 °C. Ke sledování produkce ROS byla použita fluorescenční sonda acetát dihydrofluoresceinu, která po reakci s ROS přechází na fluorescein. Po inkubaci buněk se sondou byla změřena fluorescence při excitaci 500 nm, emisi 525 nm a stanoveny proteiny bicinchoninovou metodou.



#### 4.5.1. UVA záření

Samotné UVA záření nevyvolávalo významnou tvorbu ROS ve fibroblastech (130 a 143 % kontroly). Pokud však byly buňky preinkubovány s alkaloidy nedošlo ihned po ozáření UVA k produkci ROS (obr. 26 A). Tvorba ROS byla pozorována 1. a 2. hod po ozáření. Největší množství ROS bylo zjištěno zejména u buněk inkubovaných s DHSG (374 % kontroly 1. hod po UVA, 356 % kontroly 2. hod po UVA) a méně po aplikaci SG (153 % kontroly 1. hod po UVA, 233 % kontroly 2. hod po UVA) (obr. 26 B, C). Při měření produkce ROS působením SG a DHSG a UVA opakovaně nedocházelo k vzniku ROS 3 hod po ozáření (Obr. 26 D), ale 4 hod od ozáření UVA se opět zvyšuje produkce ROS (SG 182 % kontroly a DHSG 291 % kontroly), ale toto množství je menší než množství ROS, které vznikalo za 1 a 2 hodiny od ozáření.

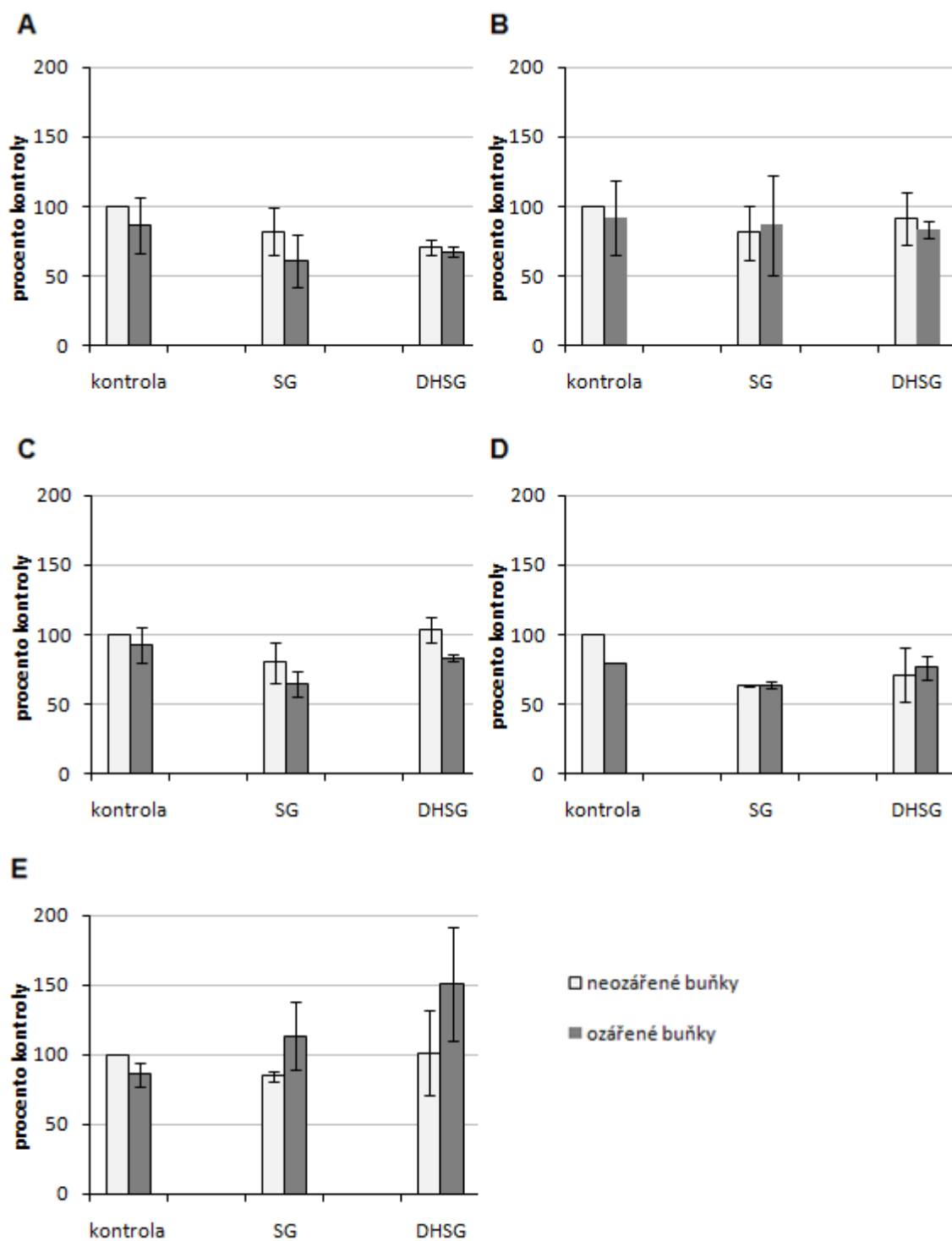




Obr. 26 Stanovení ROS s odlišnou dobou inkubace po ozáření UVA dávkou 2,5 J/cm<sup>2</sup>. (A) 0 hod po ozáření; (B) 1 hod po ozáření; (C) 2 hod po ozáření; (D) 3 hod po ozáření; (E) 4 hod po ozáření. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od ozářené kontroly ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.2. UVB záření

Mechanismus poškození buněk UVB zářením je jiný než při působení UVA, u kterého jeden z hlavních mechanismů zahrnuje vznik ROS. Zvolená dávka UVB záření nevyvolává tvorbu ROS a pokud byly buňky před ozářením inkubovány s alkaloidy, nebyla pozorována produkce ROS, spíše naopak byl pozorován pokles fluorescence (1-3 hod) (obr. 27). Avšak 4 hod od ozáření byl pozorován velmi mírný nárůst fluorescence, který je výraznější u DHSG a mohl by být způsoben vznikajícími ROS.



Obr. 27 Stanovení ROS s odlišnou dobou inkubace po ozáření UVB dávkou  $100 \text{ mJ/cm}^2$ . (A) 0 hod po ozáření; (B) 1 hod po ozáření; (C) 2 hod po ozáření; (D) 3 hod po ozáření; (E) 4 hod po ozáření. Data představují průměr hodnot ze tří nezávislých měření.

#### 4.6. Transformace SG a DHSG

Na lidských kožních fibroblastech byla testována biodostupnost alkaloidů a zda jsou kožní buňky schopny metabolizovat SG, podobně jako hepatocyty (Vrublová, 2010). Dále jsme se zaměřili na sledování vlivu UVA záření na obsah alkaloidů v buňce.

Studované látky (SG, DHSG; 0,5  $\mu\text{mol/l}$ ) byly aplikovány na buňky a po 24 hod inkubaci byly buňky: A) ozářeny UVA zářením o dávce 2,5  $\text{J/cm}^2$ ; B) nebyly ozářeny. Poté bylo na buňky aplikováno médium. Obsah alkaloidů SG a DHSG byl sledován ihned po ozáření a 1, 2 a 4 hod po ozáření metodou HPLC/ESI-MS.

Zjištěný obsah obou alkaloidů byl přepočítán na procenta (tab. 4). Z naměřených dat vyplynulo, že 87 - 90 % SG se přeměňuje na DHSG. Po ozáření UVA přechází zmetabolizovaný méně toxický DHSG zpět na toxický SG (77 % SG a 23 % DHSG). 1 hod po ozáření se obsah SG snížil na 47 % a 53 % SG se přeměnilo na DHSG. Podobný výsledek byl zaznamenán i 2 hod po ozáření (49 % SG a 51 % DHSG). Po 4 hodinové inkubaci po ozáření došlo k dalšímu mírnému poklesu obsahu SG (59 % DHSG).

DHSG se nacházel z 93 - 95 % ve formě DHSG. Působením UVA však došlo k oxidaci DHSG na SG (80 % SG, 20 % DHSG). Během 1 hod po ozáření se obsah toxického SG v buňkách snížil z 80 % na 50 %. Po 2 a 3 hodinové inkubaci po UVA dochází k další zpětné konverzi SG na DHSG. Po 4 hod od ozáření bylo v buňkách inkubovaných s DHSG zjištěno 43 % ve formě SG a 57 % ve formě DHSG.

Z výsledků také vyplynulo, že v buňkách je SG přeměňován na DHSG. Po ozáření buněk preinkubovaných s SG či DHSG dochází v buňkách k vytvoření rovnováhy mezi SG a DHSG. Kožní buňky spontánně ekatalyzují konverzi netoxického DHSG na výrazně toxičtější SG.

Tab. 4 Metabolizace SG a DHSG lidskými kožními fibroblasty a konverze DHSG na SG vyvolaná UVA zářením.

		SG (%) ± SD (%)	DHSG (%) ± SD (%)
0 hod	SG	11 ± 2,9	89 ± 2,9
	SG + UVA	77 ± 1,2	23 ± 1,2
	DHSG	5 ± 0,8	95 ± 0,8
	DHSG + UVA	80 ± 1,4	20 ± 1,4
1 hod	SG	11 ± 3,1	89 ± 3,1
	SG + UVA	47 ± 0,8	53 ± 0,8
	DHSG	6 ± 1,4	94 ± 1,4
	DHSG + UVA	50 ± 1,2	50 ± 1,2
2 hod	SG	13 ± 1,1	87 ± 1,1
	SG + UVA	49 ± 9,8	51 ± 9,8
	DHSG	7 ± 2,5	93 ± 2,5
	DHSG + UVA	38 ± 2,0	62 ± 2,0
4 hod	SG	10 ± 4,5	90 ± 4,5
	SG + UVA	41 ± 2,0	59 ± 2,0
	DHSG	7 ± 0,4	93 ± 0,4
	DHSG + UVA	43 ± 1,0	57 ± 1,0

Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

## 4.7. Transdermální transport

Ke studiu transdermálního transportu přes lidskou kůži *in vitro* byly použity statické vertikální Franzovy difuzní komůrky ze skla. Byl sledován vliv pH (fosfátový pufr o pH = 6,8 a 8,5) a obsah organických látek (20 % a 45 % ethanolu) v donorovém roztoku na transdermální transport alkaloidů, který byl hodnocen mikroskopicky a následně HPLC/ESI-MS.

Kůže byla použita jak čerstvá, metabolicky aktivní, tak kůže zmrazena při - 20 °C, která byla před experimentem rozmrazena a ponechána při pokojové teplotě alespoň 1 hod. V průběhu experimentu byly komůrky vyhřívány ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 20 hod. Poté byla kůže vyjmuta, část byla použita na přípravu homogenátu pro HPLC/ESI-MS analýzu a část byla nakrájena kryostatem a použita pro mikroskopickou analýzu.

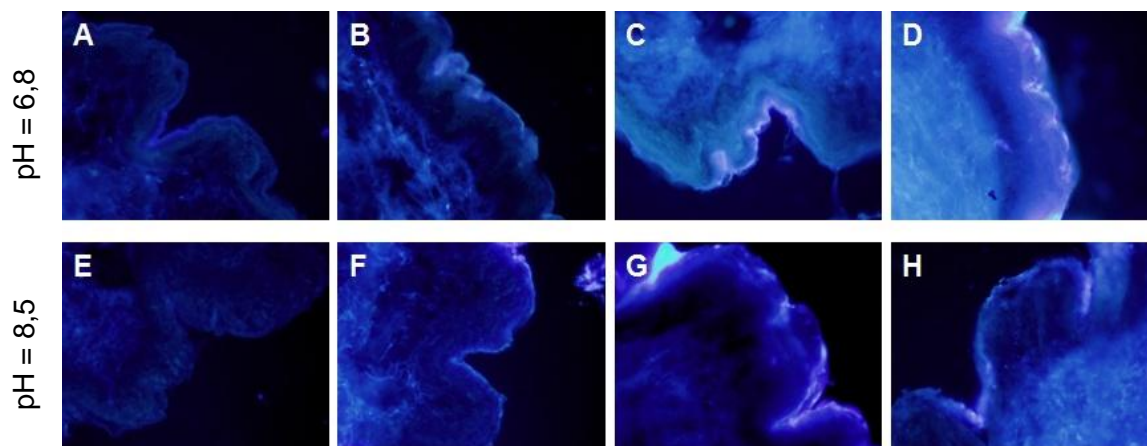
### 4.7.1. Transdermální transport SG

Na fotografiích z fluorescenčního mikroskopu (obr. 28) jsou shrnuty výsledky metabolicky aktivní i neaktivní kůže po aplikaci SG v difuzních komůrkách. Vyplývá z nich, že i samotná nejvrchnější vrstva epidermis SC a hlubší vrstvy vykazují autofluorescenci zejména u rozmrazené kůže (obr. 28A, 28E). U rozmrazené kůže lze pozorovat nárůst fluorescence v SC po aplikaci SG v obou testovaných pufrech o pH 6,8 a 8,5. Po přidání ethanolu (25 a 40 %) byla pozorována fluorescence i v hlubších vrstvách epidermis, přičemž vyšší fluorescence je viditelná v kyselém prostředí (pH = 6,8).

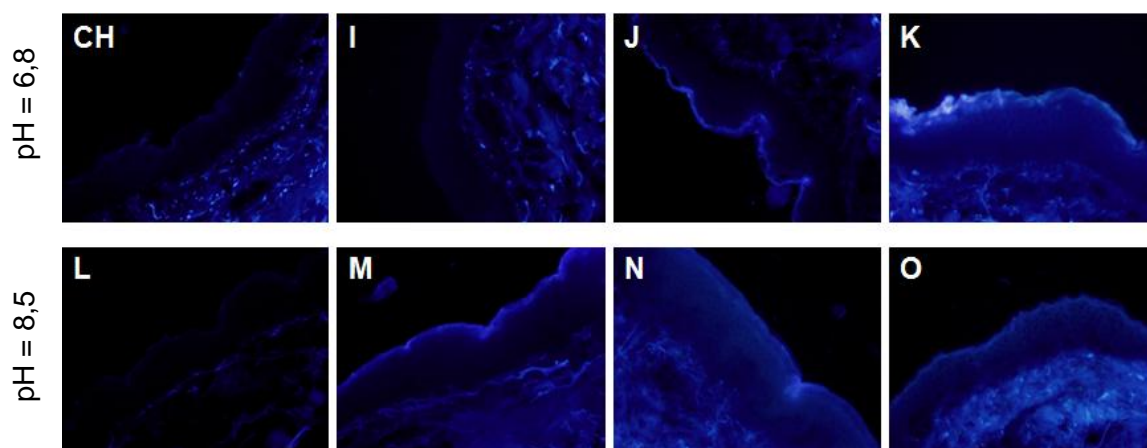
Obdobný trend byl pozorován u čerstvé kůže, avšak s výrazně nižší intenzitou fluorescence (obr. 28CH - 28O). Výraznější fluorescence SG v kůži byla pozorována po aplikaci SG v donorovém roztoku o pH = 8,5. Při použití donorového roztoku o pH = 8,5 s přídavkem ethanolu nedošlo k nárůstu fluorescence. Opačný výsledek je pozorován v kyselém prostředí, ve kterém se zvyšuje fluorescence v závislosti na koncentraci ethanolu.

Kontrolní kůže	100 $\mu$ M SG	100 $\mu$ M SG + 20 % C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	100 $\mu$ M SG + 45 % C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH
----------------	----------------	---	---

### Rozmrazená kůže



### Čerstvá kůže



Obr. 28 Řezy kůže po transdermálním transportu SG ve statických difuzních komůrkách. (A) kontrolní kůže, pH = 6,8, rozmrazená kůže, (B) SG, pH = 6,8, rozmrazená kůže, (C) SG, 20 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 6,8, rozmrazená kůže, (D) SG, 45 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 6,8, rozmrazená kůže, (E) kontrolní kůže, pH = 8,5, rozmrazená kůže, (F) SG, pH = 8,5, rozmrazená kůže, (G) SG, 20 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 8,5, rozmrazená kůže, (H) SG, 45 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 8,5, rozmrazená kůže, (CH) kontrolní kůže, pH = 6,8, čerstvá kůže, (I) SG, pH = 6,8, čerstvá kůže, (J) SG, 20 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 6,8, čerstvá kůže, (K) SG, 45 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 6,8, čerstvá kůže, (L) kontrolní kůže, pH = 8,5, čerstvá kůže, (M) SG, pH = 8,5, čerstvá kůže, (N) SG, 20 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 8,5, čerstvá kůže, (O) SG, 45 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 8,5, čerstvá kůže. Zvětšeno 200x.

Po transdermálním transportu SG na živé kůži byl využitím HPLC/ESI-MS stanovován obsah SG a případných jeho metabolických produktů v kůži, v receptorové tekutině a v roztoku, kterým byla kůže po ukončení transdermálního transportu opláchnuta.

V receptorové tekutině nebylo zjištěno žádné množství SG, což znamená, že SG neprochází přes vrstvy kůže a následně do krevního oběhu. Roztok po oplachu kůže obsahoval stopy SG, které nebylo možné kvantifikovat. V homogenátu z kůže byl zjištěn SG a DHSG (tab. 5). Zjištěné množství SG a DHSG v kůži znamená, že oba alkaloidy se v kůži zadržují, jejich koncentrace je uvedeno v tab. 5. Vzhledem k malému množství DHSG byla zjištěna nižší konverze SG na DHSG, než to bylo pozorované v samotných fibroblastech. Tento výsledek potvrzuje, že SG se váže v horní vrstvě kůže. Ethanol snížil množství vázaného SG do čerstvé kůže při obou pH.

Tab. 5 Distribuce SG a DHSG v kůži po transdermálním transportu SG.

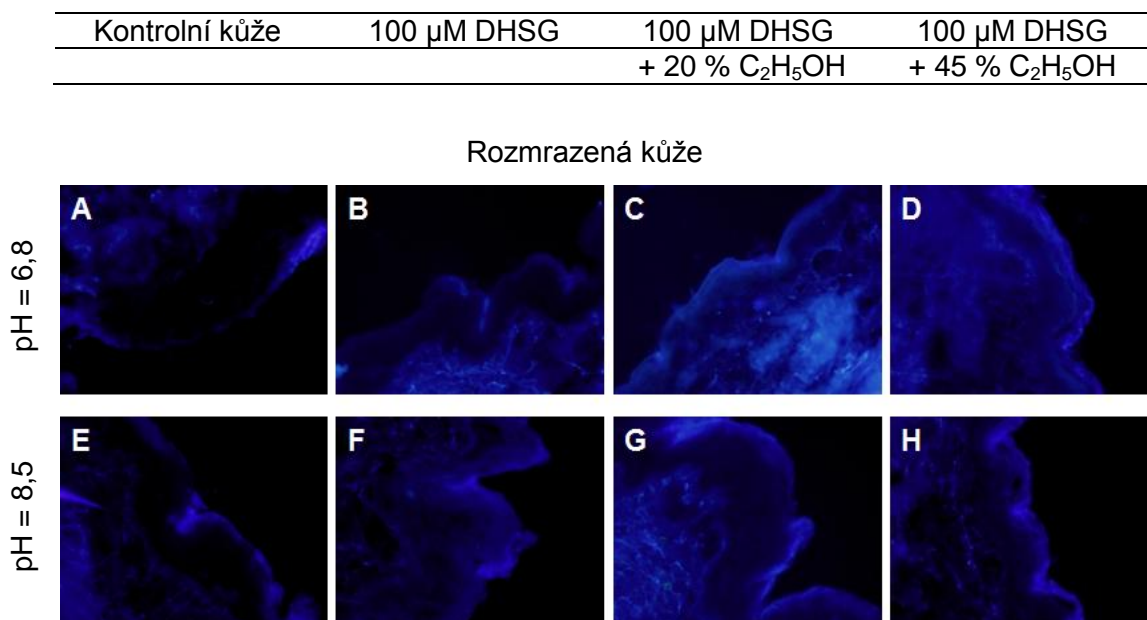
		Kůže	
		SG (mg/l) ± SD	DHSG (mg/l) ± SD
pH=6,8	Kontrola	0	0
	SG	4,984 ± 1,274	0,108 ± 0,085
	SG + 20 % ethanolu	4,938 ± 0,834	1,290 ± 1,734
	SG + 45 % ethanolu	4,285 ± 1,389	0,780 ± 0,987
pH=8,5	Kontrola	0	0
	SG	5,637 ± 0,435	0,151 ± 0,139
	SG + 20 % ethanolu	4,506 ± 1,188	0,303 ± 0,355
	SG + 45 % ethanolu	3,568 ± 0,018	0,503 ± 0,546

Hodnoty jsou průměrem ze dvou reprezentativních měření.



#### 4.7.2. Transdermální transport DHSG

Transdermální transport DHSG byl proveden pouze na rozmrazené kůži. Opět byla pozorována nízká autofluorescence SC a hlubokých vrstev kůže (obr. 29A, 29E). DHSG fluoreskuje v SC nepatrně více při pH = 8,5 v porovnání s pH = 6,8. Ethanol v donorovém roztoku zvyšuje fluorescenci, jak v kyselém, tak v zásaditém pH.



Obr. 29 Řezy kůže po transdermálním transportu DHSG ve statických difuzních komůrkách. (A) kontrolní kůže, pH = 6,8, (B) DHSG, pH = 6,8, (C) DHSG, 20 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 6,8, (D) DHSG, 45 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 6,8, (E) kontrolní kůže, pH = 8,5, (F) DHSG, pH = 8,5, (G) DHSG, 20 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 8,5, (H) DHSG, 45 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pH = 8,5. Zvětšeno 200x.

## 5. DISKUSE

Díky resorpční funkci kůže je možné transdermálně podávat léčiva v podobě mastí. Výhodou topické aplikace je hlavně lokální působení účinné látky na postižené místo, která nezatěžuje gastrointestinální trakt a celý organismus (Hrabálek et al., 1999). Používání mastí je také hojně rozšířené v alternativní medicíně při aplikaci přírodních látek, směsí, rostlinných extraktů a frakcí. Použití mnohých přírodních látek v alternativním léčitelství vychází z dlouhodobé tradice a zkušeností. Bohužel, ne vždy je známa bezpečnost použití těchto látek. Některé z nich mohou v kombinaci se slunečním zářením vyvolávat dráždění, fotoalergické a fototoxické reakce na kůži (Bark et al., 2010).

Alkaloid SG je známý tím, že má protizánětlivý, antibakteriální, antimykotický, antiplakový a analgetický účinek a je používán v tradičním léčitelství, ale i v přípravcích ústní hygieny a mastích. Jeho toxicita je však stále středem diskuse (Cienki & Zaret, 2010). Doposud nejsou známá žádná fakta o jeho prostupnosti do kůže, případné metabolizaci v kůži a o bezpečnosti jeho použití v kombinaci s UV zářením. Protože SG je metabolizován hepatocyty především na DHSG (Vrublová, 2010), byl do experimentů vzat kromě SG také DHSG.

Z literatury je známo, že SG je toxický k buňkám. Metodou inkorporace neutrální červeně do fibroblastů jsme stanovili  $IC_{50}$  na hodnotu 1,94  $\mu\text{mol/l}$ , která je přibližně srovnatelná s publikovanou hodnotou na lidských fibroblastech  $IC_{50} = 1,6 \mu\text{mol/l}$  (Debiton et al., 2003). Tyto hodnoty mezi sebou korelují, i když byly použity různé doby inkubace a metody stanovení. Toxicita SG na normální lidské fibroblasty je nižší než na lidské keratinocyty (HaCaT), ale vyšší než k lidským gingiválním fibroblastům (HGF - 1) a epidermálním keratinocytům (NHEKs) (Zdařilová et al., 2006).

Fototoxická reakce je nežádoucí reakce kůže po společném působení chemických látek a UV nebo viditelného záření. Takové látky se označují jako fotosenzitiéry (Bark et al., 2010). Vliv UV záření byl studován na oba alkaloidy. Výsledné hodnoty  $IC_{50}$  pro SG a DHSG jsou shrnuty v tabulce 6.

Tab. 6 IC<sub>50</sub> pro SG a DHSG u lidských fibroblastů.

		IC <sub>50</sub> (μmol/l)			
		+ UVA (2,5 J/cm <sup>2</sup> )	+ UVB (25 mJ/cm <sup>2</sup> )	+ UVB (50 mJ/cm <sup>2</sup> )	+ UVB (100 mJ/cm <sup>2</sup> )
SG	1,94	0,865	2,77	2,21	1,0
DHSG	> 50	0,625	3,96	2,49	2,17

Toxicita SG v kombinaci s UVA se prohloubila pouze 2,25x, a tudíž SG nepovažujeme za fototoxický. Při aplikaci vzrůstajících dávek UVB (25-100 mJ/cm<sup>2</sup>) dochází k prohloubení toxicity SG až při dávce 100 J/cm<sup>2</sup>. Nižší dávky UVB (25 a 50 mJ/cm<sup>2</sup>) toxicitu SG nezvýšily, hodnoty se pohybují mírně nad IC<sub>50</sub> samotného SG. Na rozdíl od UVB SG pohlcuje výrazněji UVA (záření o delší vlnové délce), čímž dochází k tvorbě ROS a prohloubení toxicity. Protože sluneční záření obsahuje hlavně UVA složku (95 %) a pouze 5 % UVB (Pattison & Davies, 2006), efekt UVA tak hraje výraznější podíl ve fototoxicitě vyvolané slunečním zářením. I když UVB představuje velmi malou část UV záření, nejvyšší námi testovaná dávka UVB byla SG pohlcována, čímž se prohloubila toxicita.

DHSG nebyl toxický ani při dávce 50 μmol/l, avšak aplikace UVA i UVB záření vyvolala výrazný nárůst toxicity. UVA má vhodnou vlnovou délku, která je alkaloidem snadno absorbovatelná. DHSG je tak lepším chromoforem v porovnání s SG. UVB zvyšuje toxicitu DHSG méně.

Toxicita SG a DHSG v kombinaci s UVA je srovnatelná. U DHSG je IC<sub>50</sub> mírně nižší, což může být vysvětleno produkcí ROS při konverzi DHSG na SG, které se podílí na nárůstu toxicity. Jak se prokázalo, ROS vznikají po ozáření buněk inkubovaných s DHSG UVA zářením. Produkce ROS je vyšší než u buněk, které byly inkubovány se SG. K produkci ROS při inkubaci s oběma alkaloidy přispívá také skutečnost, že alkaloid SG reaguje s SH-skupinami bílkovin, ale také nízkomolekulárního antioxidantu glutathionu (Debiton et al., 2003). Pokles tohoto antioxidantu snižuje schopnost buněk se chránit při nadprodukci ROS v průběhu konverze DHSG na SG slunečním zářením.

Vzhledem k tomu, že alkaloidy vstupují do DNA (Urbanová et al., 2009) jsme chtěli zjistit, zda při fototoxické reakci dochází k prohloubení genotoxicity obou alkaloidů. Můžeme potvrdit, že UVA zvyšuje poškození DNA buněk inkubovaných s SG i DHSG. Zvolená dávka UVB záření vyvolala měřitelné poškození buněk, což ovlivnilo měření fototoxického potenciálu alkaloidů. Na základě zvýšení toxicity SG v kombinaci s UVB při koncentraci 2 μmol/l a případě DHSG již při koncentraci 1 μmol/l, můžeme znovu potvrdit vyšší fototoxický potenciál DHSG, avšak použití nižší dávky UVB by

mohlo lépe zachytit fotogenotoxické působení alkaloidů. Bohužel tento experiment již nemohl být proveden a bude předmětem dalšího studia.

Překvapivě u buněk inkubovaných s DHSG a následně ozářených UVA ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ) nedošlo k výraznému snížení  $\psi$  ani při koncentracích, které v kombinaci s UVA byly již toxické. Na rozdíl od DHSG samotný SG snižuje  $\psi$  v závislosti se zvyšující se koncentrací SG a účinkem UVA došlo ještě ke snížení  $\psi$ . Samotný DHSG ( $2,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) neovlivňuje  $\psi$  a nezpůsobuje depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány. Z naměřených hodnot vyplývá, že pouze SG aktivuje vnitřní cestu aktivace apoptózy, která souvisí právě s mitochondriemi. Stejný pokles potenciálu jako u SG byl očekáván i u buněk inkubovaných s DHSG a ozářených UVA. Při ozáření buněk s DHSG dochází k produkci ROS a současně k přeměně DHSG na SG, což by se mělo projevit snížením  $\psi$ . Tento výsledek jsme nezaznamenali, proto studium ovlivnění  $\psi$  DHSG bude předmětem dalšího studia.

Protože je známo, že SG je přeměňován v lidských hepatocytech na DHSG (Vrublová, 2010), chtěli jsme prokázat, zda SG prostupuje do kožních fibroblastů a je v nich metabolizován.

Experimenty prokázaly, že SG i DHSG do fibroblastů vstupují a DHSG je hlavním metabolickým produktem přeměny SG. Po 24 hodinové inkubaci bylo 89 % SG redukováno na DHSG. V případě buněk inkubovaných s DHSG bylo nalezeno 95 % ve formě DHSG a zbylých 5 % by mohly být další metabolity, které jsme nebyly schopni zidentifikovat. Z experimentů vyplynulo, že UVA záření je schopno vyvolat zpětnou konverzi intracelulárního DHSG zpět na SG, která je spojena s produkcí ROS. Tato konverze je reverzibilní a po přeměně DHSG na SG jsou metabolicky aktivní buňky schopné katalyzovat zpětnou konverzi na méně toxický DHSG. Tento jev je podobný obranné reakci rostlin, v nichž DHSG, který je uložen v zásobních organelách, je v přítomnosti elicitorů biotického nebo abiotického původu přeměňován na SG. Ten je zpětně přeměňován reduktasou na méně toxický DHSG. To znamená, že i kožní fibroblasty jsou schopné přeměňovat toxický SG na netoxický DHSG mechanismem, kterého se zřejmě účastní nespecifické reduktasy (Psotová et al., 2006).

Toto zjištění doplňuje a vysvětluje změny toxicity SG a DHSG po ozáření UVA. Naším cílem bylo zjistit, zda oba alkaloidy mohou překonat kožní bariéru a dostat se po topické aplikaci do krevní cirkulace.

Vzhledem k tomu, že vlastnosti KBA jsou ovlivňovány hodnotou pH (při pH nižším než 7,0 se vyskytují ve formě kvartérního kationtu; při pH vyšším než 7 dochází k adici hydroxidového aniontu za vzniku neutrální formy, tzv. pseudobáze) (Dostál

et al., 2000), byl transdermální transport studován při pH = 6,8 a 8,5. pH donorových tekutin výrazně neovlivnilo absorpci alkaloidů do kůže. Taktéž nebyl prokázán vliv obsahu ethanolu v donorové tekutině na schopnost alkaloidů prostupovat do hlubších vrstev kůže při obou pH. Bariéra čerstvé kůže je vyšší než při použití zmrazené. Tento fakt je nutno brát v úvahu, a proto je vhodné pro tyto experimenty upřednostňovat využití čerstvé, nerozmrazené kůže.

Při použití vertikálních difúzních komůrek bylo prokázáno, že SG i DHSG jsou v kůži zadrženy. Protože v receptorové tekutině nebylo zaznamenáno žádné množství alkaloidu, zjistili jsme, že alkaloidy kožní bariéru nepřekonají. SG nebyl v kůži přeměňován na DHSG tak intenzivně jako ve fibroblastech. Z tohoto výsledku nepřímo usuzujeme, že SG je zachycen v metabolicky málo respektive neaktivních buňkách SC a nedostává se do hlubších vrstev kůže. Kdyby se alkaloidy dostávaly do hlubších vrstev kůže s metabolicky aktivními buňkami, přeměna by mohla být intenzivnější. Ke zmíněné redukci může přispět i např. NADH bez účasti enzymu (Kovář et al., 1985). A DHSG, který se nachází ve vrstvě SC, by mohl být také spontánně oxidován na SG. Všechny tyto faktory se mohou podílet na ustavení rovnováhy mezi oběmi alkaloidy.

Při použití lidské kůže je nutné brát v úvahu i fakt, že každý člověk má kůži jinak tlustou, která je v průběhu života vystavována odlišné zátěži, a proto je nutné pro experimenty použít kůži několika dárců a nejlépe z jedné oblasti těla.

Aplikace SG na kůži může být bezpečná, pokud je aplikována na oblast kůže, která je zdravá, nepoškozená a tedy nedochází k jeho penetraci do hlubších vrstev kůže, kde by mohl být SG přeměňován na DHSG. Pokud dojde k přeměně SG na DHSG, dochází v kombinaci se slunečním zářením k fototoxické reakci, která je nežádoucí. Na druhou stranu tohoto jevu může být cíleně využito např. v terapii kožních nádorů, kdy se využívá toxické a fototoxické reakce. Díky těmto skutečnostem by se mělo nakládat s přípravky pro topickou aplikaci obsahujícími tyto alkaloidy velmi obezřetně.

## 6. ZÁVĚR

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že:

- cytotoxicita SG na lidských kožních fibroblastech je výrazně vyšší v porovnání s DHSG. Hodnota  $IC_{50}$  pro SG je 1,94  $\mu\text{mol/l}$ , u DHSG nebyl prokázán toxický účinek do koncentrace 50  $\mu\text{mol/l}$ .
- UVA záření (2,5  $\text{J/cm}^2$ ), které samo nevyvolává toxicitu (měřením životnosti použitím neutrální červeně), zvyšuje toxicitu SG. Hodnota  $IC_{50}$  SG v kombinaci s UVA je 0,865  $\mu\text{mol/l}$ . UVB záření v dávce 100  $\text{mJ/cm}^2$  zvyšuje toxicitu SG, nižší dávky UVB, 25 a 50  $\text{mJ/cm}^2$ , toxicitu SG nezvyšují.
- UVA záření (2,5  $\text{J/cm}^2$ ) výrazně zvyšuje toxicitu DHSG. Hodnota DHSG  $IC_{50}$  při aplikaci UVA záření klesla na 0,625  $\mu\text{mol/l}$ . UVB (25, 50 a 100  $\text{mJ/cm}^2$ ) taktéž zvyšuje toxicitu DHSG. DHSG má výraznou fototoxicitu.
- metodou jednobuněčné elektroforézy (SCGE) bylo prokázáno poškození DNA vyvolané SG, ale především DHSG v kombinaci s UVA zářením, výsledky měření jsou srovnatelné s metodou měřením inkorporace neutrální červeně.
- SG o koncentraci 2,5  $\mu\text{mol/l}$  způsobuje snížení membránového potenciálu v mitochondriích na 50 %. UVA ovlivňuje  $\psi$  již při koncentraci 0,5  $\mu\text{mol/l}$  SG a  $\psi$  klesá v závislosti na zvyšující se koncentraci SG. Avšak DHSG v kombinaci s UVA neovlivňuje  $\psi$  do koncentrace 2,5  $\mu\text{mol/l}$ .
- vlivem UVA (2,5  $\text{J/cm}^2$ ) dochází v buňkách inkubovaných s SG a DHSG (1  $\mu\text{mol/l}$ ) k zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), nejvíce 1 a 2 hod od ozáření. V buňkách inkubovaných s SG a DHSG (1  $\mu\text{mol/l}$ ) a ozářených UVB o dávce 100  $\text{mJ/cm}^2$  nedochází k nárůstu produkce ROS.
- SG i DHSG se akumulují v kožních fibroblastech.
- toxický SG je přeměňován na méně toxický DHSG.
- netoxický DHSG je působením UVA záření přeměňován na toxický SG.
- SG i DHSG penetrují v průběhu transdermálního transportu pouze do zrohovatělé vrstvy epidermis SC. Zvýšení obsahu ethanolu (25-45 %) v donorovém roztoku s alkaloidy nezvýšilo jejich obsah v SC.
- zvýšení obsahu alkaloidů v SC v rozmrazené kůži v porovnání s kůží čerstvou je způsobeno narušením její integrity v průběhu zamrazování.
- v čerstvé kůži po transdermálním transportu nebyla pozorována tak výrazná konverze SG na netoxický metabolit DHSG, což nepřímo potvrzuje, že SG penetruje jen do rohové vrstvy, kde jsou již odumřelé či méně metabolicky aktivní buňky.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adhami V.M., Aziz M.H., Reagan-Shaw S.R., Nihal M., Mukhtar H., Ahmad N. (2004) Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 933-40.

Ahlstrom L.A., Cross S.E., Mills P.C. (2007) The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **30**, 456-463.

Ahmad N., Gupta S., Husain M.M., Heiskanen K.M., Mukhtar H. (2000) Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1524-8.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) Molecular biology of the cell, fifth edition, Garland Science, USA.

Amann M., Wanner G., Zenk M.H. (1986) Intracellular compartmentation of two enzymes of berberine biosynthesis in plant cell cultures. *Planta* **167**, 310–320.

Anderson C., Andersson T., Boman A. (1998) Cutaneous microdialysis for human in vivo dermal absorption studies. In: Roberts M.S., Walters K.A. eds. Dermal absorption and toxicity assessment., Vol. 91 Drugs and the Pharmaceutical Sciences, pp. 231–244 New York, USA.

Arakawa H., Clark W.G., Psenak M., Coscia C.J. (1992) Purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from elicited *Sanguinaria canadensis* cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 1–7.

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

Bark K.M., Heo E.P., Han K.D., Kim M.B., Lee S.T., Gil E.M., Kim T.H. (2010) Evaluation of the phototoxic potential of plants used in oriental medicine, *J. Ethnopharm.* **127**, 11-18.

Berardesca E., de Rigel J., Leveque J.L., Maibach H.I. (1991) In vivo biophysical characterization of skin physiological differences in races. *Dermatologica* **182**, 89-93.

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

Boehnlein J., Sakr A., Lichtin J.L., Bronaugh R.L. (1994) Metabolism of retinyl palmitate to retinol (vitamin A) in skin during percutaneous absorption. *Pharm. Res.* **11**, 1155-1159.

Bronaugh R.L. (2000), In Vitro Percutaneous Absorption Models. *Ann. of the New York Academy of Sciences* **919**, 188-191.

Bronaugh R.L., Congdon E.R. Scheuplein R.J. (1981) The effect of cosmetic vehicles on the penetration of N-nitrosodiethanolamine through excised human skin. *J. Invest. Dermatol.* **76**, 94-96.

Bronaugh R.L., Franz T.J. (1986) Vehicle effects on percutaneous absorption: in vivo and in vitro comparisons with human skin. *Br. J. Dermatol.*, **115**, 1-11.

Bronaugh R.L., Hood H.L., Kraeling M.E.K., Yourick J.J. (1999) Determination of percutaneous absorption by *in vitro* techniques. In: Bronaugh R.L., Maibach H.I. eds. *Percutaneous absorption: drugs–cosmetics–mechanisms–methodology*, 3rd ed., Vol. 97 *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, pp 229–233, Marcel Dekker, New York, USA.

Bronaugh R.L., Stewart R.F. (1985) Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies IV: the flow-through diffusion cell. *J. Pharm. Sci.* **74**, 64–67.

Bucks D., Guy R., Maibach H. (1991) Effects of occlusion. In: Bronaugh R.L., Maibach H.I. eds. *In vitro percutaneous absorption: principles, fundamentals, and applications*, pp 85–114, Boca Raton, FL, CRC Press, USA.

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

Clowes H.M., Scott R.C., Heylings J.R. (1994) Skin absorption: Flow-through or static diffusion cells. *Toxicol In Vitro* **8**, 827–830.



Collier S.W., Sheikh N.M., Sakr A., Lichtin J.L., Stewart R.F., Bronaugh R.L. (1989), Maintenance of skin viability during in vitro percutaneous absorption/metabolism studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **99**, 522-533.

Cross S.E., Roberts M.S. (2005) Effects of dermal blood flow, lymphatics and binding as determinants of topical absorption, clearance and distribution. In: Riviere J.E. ed. *Dermal absorption models in toxicology and pharmacology*, pp. 249–279, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA.

Čihák R. (2004) *Anatomie 3*, pp. 559-573, Grada Publishing, Praha, Česká republika.

Dancik Y., Thomson C., Krishnan G., Roberts M.S. (2010) Cutaneous Metabolism and Active Transport in Transdermal Drug Delivery, In: Monteiro-Riviere N.A.. *Toxicology in skin*, Vol 29, pp.69-82, Informa Healthcare, New York, USA.

Davies D.J., Ward R.J., Heylings J.R. (2004) Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicol In Vitro* **18**, 351–358.

Davis A.F., Gyurik R.J., Hadgraft J., Pellett M.A., Walters K.A. (2002) Formulation strategies for modulating skin permeation. In: Walters KA ed. *Dermatological and transdermal formulations*, Vol 119, pp. 271–317. New York, USA.

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

Dick I.P., Scott R.C. (1992) Pig ear skin an in-vitro model for human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 640-645.

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

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

Dressler W.E. (1999) Hair dye absorption. In: Bronaugh R.L., Maibach H.I. eds. *Percutaneous absorption: drugs–cosmetics–mechanisms–methodology*, 3rd ed., Vol. 97 *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, pp 685–716, New York, Marcel Dekker, USA.

Dvořák M., Matějovičová M. (2008) Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA. *Chem. Listy* **102**, 977-983.

Dzink J.L., Socransky S.S. (1985), Comparative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 663-665.

Elias P.M. (2007) The skin barrier as an innate immune element. *Semin. Immunopathol.* **29**, 3-14.

Evans N.J., Rutter N., Hadgraft J., Parr G. (1985) Percutaneous administration of theophylline in the preterm infant. *J. Pediatr.* **107**, 307-311.

Facchini P.J., Johnson A.G., Poupart J., De Luca V. (1996) Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiology* **111**, 687-697.

Färber K., Schumann B., Miersch O., Roos W. (2003) Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochem.* **62**, 491-500.

Franz T.J. (1975) Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* **64**, 190–195.

Giacomoni P.U., Mammone T., Teri M. (2009) Gender-linked differences in human skin. *J. Dermatol. Sci.* **55**, 144-149.

Hempel S.L., Buettner G.R., O'Malley Y.Q., Wessels D.A., Flaherty D.M. (1999) Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and rhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 146-159.

Hewitt P.G., Perkins J., Hotchkiss S.A.M. (2000) Metabolism of fluroxypyr, fluroxypyr methyl ester, and the herbicide fluroxypyr methylheptyl ester. II: In rat skin homogenates. *Drug. Metab. Dispos.* **28**, 755–759.

Hood H.L., Bronaugh R.L. (1999) A comparison of skin viability assays for in vitro skin absorption/metabolism studies. *In vitro Mol. Toxicol.* **12**, 3-9.

Hotchkiss S.A.M. (1998) Dermal metabolism. In: Roberts M.S., Walter K.A. eds. *Dermal absorption and toxicity assessment*, Vol. 91 Drug and the Pharmaceutical Sciences, pp. 43–101, New York, Marcel Dekker, USA.

Howes D., Guy R., Hadgraft J., Heylings J., Hoeck U., Kemper F, Maibach H., Marty J.P., Merk H., Parra J., Rekkas D., Rondelli I., Schaefer H., Täuber U., Verbiese N. (1996) Methods for assessing percutaneous absorption. *Altern. Lab. Anim.* **24**, 81–106.

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

Hrabálek A., Vávrová K. (2005) Lze překonat kožní bariéru?. *Praktické lékárenství*, 8-11.

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

Jacobi U., Gautier J., Sterry W., Lademann J. (2005) Gender-related differences in the physiology of the stratum corneum. *Dermatology* **211**, 312-317.

Janovská M., Kubala M., Šimánek V., Ulrichová J. (2009) Fluorescence of sanguinarine: fundamental characteristics and analysis of interconversion between various forms. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 235-240.

Jellinek N., Maloney M.E. (2005) Escharotic and other botanical agents for the treatment of skin cancer: A review. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**, 487-495.

Kenney G.R., Sakr A., Lichtin J.L., Chou H., Bronaugh R.L. (1995) In vitro skin absorption and metabolism of padimate-O and a nitrosamine (NMPABAO) formed in padimate-O-containing cosmetic products. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **46**, 117–127.

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

Kosina P., Vacek J., Papoušková B., Stiborová M., Stýskala J., Cankař P., Vrublová E., Vostálová J., Šimánek V., Ulrichová J. (2011) Identification of benzo[c]phenanthridine metabolites in human hepatocytes by liquid chromatography with electrospray ion-trap and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatograph. B* **879**, 1077-1085.

Kotingová L., Borská L., Fiala Z. (2009) Testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*. *Chem. Listy* **103**, 533-539.

Kovář J., Šimek K., Kožoušková E., Klukanová H. (1985) Fluorescence properties of some isoquinoline alkaloids. *Collect Czech Chem. Commun.* **50**, 1312-1328.

Kraeling M.E.K., Lipicky R.J., Bronaugh R.L. (1996) Metabolism of benzocaine during percutaneous absorption in the hairless guinea pig: acetylbenzocaine formation and activity. *Skin Pharmacol.* **9**, 221–230.

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

Lotte C., Wester R.C., Rougier A., Maibach H.I. (1993) Racial differences in the in vivo percutaneous absorption of some organic compounds: a comparison between black, Caucasian and Asian subjects. *Arch. Dermatol. Res.* **284**, 456–459.

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

McDaniel S., Goldman G.D. (2002) Consequence of using escharotic agents as primary treatment for nonmelanoma skin cancer. *Arch. Dermatol.* **138**, 1593-1596.

Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Snider T.H., Blank J.A., Hobson D.W. (1997) Comparison of an vitro skin model to normal human skin for dermatological research. *Microsc. Res. Tech.* **37**, 172-179.

Mukhtar H., Bickers D. (1981) Drug metabolism in skin. *Drug Metab. Dispos.* **9**, 311-314.

Namdeo A.G. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review, *Phcog. Rev.* **61**, 69-79.

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

Netzlaff F., Lehr C.M., Wertz P.W., Schaefer U.F. (2005) The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**, 167-178.

Newton S.M., Lau C., Gurcha S.S., Besra G.S., Wright C. (2002), The evaluation of fortythree plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 57-67.

Ng K.M.E., Chu I., Bronaugh R.L., Franklin C.A., Somers D.A. (1992) Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: Comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 216-223.

OECD (2004) Guideline for the testing of chemicals, Skin Absorption: in vitro Method, 428, Paris.

OECD (2011) Guidance notes on dermal absorption, 156, Paris.

Osswald S.S., Elston D.M., Farley M.F., Alberti J.G., Cordero S.C., Kalasinski V.F. (2005) Self-treatment of a basal cell carcinoma with „black and yellow salve“. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**, 509-511.

Pannatier A., Jenner P., Testa B., Etter J.C. (1978) The skin as a drug-metabolizing organ. *Drug. Metab. Rev.* **8**, 319–343.

Pattison D. I., Davies M. J. (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS* **96**, 131-157.

Pendlington R.U., Williams D.L., Naik J.T., Sharma R.K. (1994) Distribution of xenobiotic metabolising enzymes in skin. *Toxicol. In Vitro* **8**, 525–527.

Pilgram G.S., Engelsma-van Pelt A.M., Bouwstra J.A., Koerten H.K. (1999) Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 403–409.

Proksch E., Brandner J.M., Jensen J.-M. (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **17**, 1063-1072.

Psotová J., Večeřa R., Zdaňilová A., Anzenbacherová E., Kosina P., Svobodová A., Hrbáč J., Jirovský D., Stiborová M., Lichnovský V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J. (2006) Safety assessment of sanguiritrin, alkaloid fraction of *Macleaya cordata*, in rats. *Veterinarni Medicina* **51**, 145–155.

Riviere J.E. (2006) Dermal absorption models in toxicology and pharmacology, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Riviere J.E. (2010) Basic Principles Involved in Quantifying the Dermal Absorption of Topically Applied Chemicals, In: Monteiro-Riviere N.A. Toxicology of the Skin, pp.43-54, Informa Healthcare, New York, USA.

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

Sato K., Sugibayashi K., Morimoto Y. (1991) Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *J. Pharm. Sci.* **80**, 104-107.

Scaduto R.C., Grotyohann L.W., (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J.* **76**, 469-477.

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

Shi Y. (2001) A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 394-401.

Scheiner-Bobis G. (2001) Sanguinarine induces K<sup>+</sup> outflow from yeast cells expressing mammalian sodium pumps. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **363**, 203–208.

Scheuplein R.J., Blank I.H. (1971) Permeability of the skin. *Physiol Rev*, **51**, 702–747.

Schmeller T., Latz-Brüning B., Wink M. (1997) Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* **44**, 257–266.

Singh I., Morris A.P., (2011) Performance of transdermal therapeutic systems: Effects of biological factors. *Int. J. Pharma. Investig.* **1**, 4-9.

Singh S., Zhao K., Singh J. (2002) In vitro permeability of hydrocarbons in pig ear and human abdominal skin. *Drug Chem. Toxicol.* **25**, 83-92.

Slaninová I., Slanina J., Táborská E. (2008) Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chem. Listy* **102**, 427-433.

Slaninová I., Táborská E., Bochořáková H., Slanina J. (2001) Interaction of benzo[c]phenanthridine and protoberberine alkaloids with animal and yeast cells. *Cell Biol. and Toxicol.* **17**, 51–63.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goetze N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.

Steiling W., Kreutz J., Hofer H. (2001) Percutaneous penetration/dermal absorption of hair dyes in vitro. *Toxicol. In Vitro* **15**, 565–570.

Šimánek V., Černá H., Vičar J., Jezdinský J., Válka I. (1995) CZ 279327.

Urbanová J., Lubal P., Táborská E., Táborský P. (2009) Interakce benzo[c]fenantridinových kvartérních alkaloidů s DNA. *Chem. Listy* **103**, 207-211.

van Ravenzwaay B & Leibold E (2004) A comparison between in vitro rat and human and in vivo rat skin absorption studies. *Hum. Exp. Toxicol.* **23**, 421–430.

Vavrečková C., Gawlik I., Müller K. (1996) Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; I. Inhibition of 5- and 12- lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Medica* **62**, 397– 401.

Vávrová K., Hrabálek A. (2006) Role ceramidů v kůži, *Praktické lékárenství* **2**, 55-58.

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

Vokurka M., Hugo J. a kolektiv (2006) Velký lékařský slovník, Maxdorf, Praha, ČR.

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

Weerasinghe P., Hallock S., Liepins A. (2001) Bax, Bcl-2, and NF-kappaB expression in sanguinarine induced bimodal cell death. *Exp. Mol. Pathol.* **71**, 89-98.

Weiss D., Baumert A., Vogel M., Roos W. (2006) Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant, Cell Env.* **29**, 291-302.

Wells T., Basketter D.A., Schroder K.R. (2004) In vitro skin irritation: facts and future, State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In vitro* **18**, 231-243.

Wester RC, Maibach HI, Melendres J, Sedik L, Knaak J & Wang R (1992) *In vivo* and *in vitro* percutaneous absorption and skin evaporation of isofenphos in man. *Fundam. Appl. Toxicol.* **19**, 521–526.

WHO (2006) Environmental Health Criteria 235 - Dermal Absorption, Geneva.

Wiechers J.W. (1989) The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. *Pharm. Weekbl. Sci.* **11**, 185–198.



Wilkinson S.C., Williams F.M. (2008) Cutaneous Metabolism. In: Roberts M.S., Walter K.A. eds. *Dermal absorption and toxicity assessment*, Vol. 91 Drugs and the Pharmaceutical Sciences, pp. 89–115, New York, Marcel Dekker, USA.

Williams A.C. (2003) Transdermal and topical drug delivery. From theory to clinical practice, Pharmaceutical Press, London, Great Britain.

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

## 8. SEZNAM ZKRATEK

BCA	Bicinchoninová metoda
BCC	Bazocelulární karcinom (Basal cell carcinoma)
DHBO	Dihydrobenzofenanthridinoxidasa
DHSG	Dihydrosanguinarin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouřetězcová DNA (double strand DNA)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	Fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup>	Gram pozitivní, Gram negativní
GSH	Glutathion
HPLC/ESI-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (ionizace elektrosprejem) (high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry)
IR	Infračervené záření (infrared)
KBA	Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy
LDH	Laktátdehydrogenasa
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, redukovaná forma
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukovaná forma
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
PCD	Programovaná buněčná smrt (Programmed cell death)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
<i>S. canadensis</i>	<i>Sanguinaria canadensis</i>
SC	<i>Stratum corneum</i>
SG	Sanguinarin
SGOH	Sanguinarin-pseudobáze
SR	Sanguinarinreduktasa
TNF	Tumor nekrotizující faktor
UV	Ultrafialové záření (ultraviolet)
UVA	A složka UV záření
UVB	B složka UV záření
UVC	C složka UV záření
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)