

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Ultra slabá fotonová emise nádorových buněk

Vypracovala: Ludmila Žárská

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.

Velmi ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D., za odborné vedení a pomoc při psaní bakalářské práce, za trpělivý a ochotný přístup. Rovněž bych ráda poděkovala Mgr. Marku Rácovi, za pomoc při měření s PMT, poskytnutí literatury a především za ochotný přístup a odborné rady.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Doc. RNDr. Pavla Pospíšila, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne:

Podpis:

SOUHRN

Fenomén ultra slabé fotonové emise (UPE) pozorujeme u všech biologických systémů, jako jsou mikroorganismy, rostliny a živočichové. V současnosti jsme schopni detekovat UPE na různých strukturálních stupních biologických systémů jakou jsou celé organismy, orgány, buněčné kultury a organely. Je všeobecně přijímáno, že UPE souvisí s oxidativními metabolickými procesy biologických systémů. V této bakalářské práci jsme použili UPE ke studiu vlivu přírodního glykosidu amygdalinu na buněčnou kulturu lidského mnohočetného myelomu (U266) a fibroblasty (3T3). Amygdalin je látka, která s sebou nese jak klady, tak i zápory. Amygdalin je znám z čínské medicíny díky svým účinkům při prevenci a léčbě migrény, vysokého krevního tlaku a chronických zánětů. Jednou z nejpodstatnějších vlastností amygdalinu je schopnost ničit nádorové buňky. Na druhou stranu je s pojmem amygdalin spojeno riziko otravy, protože při rozkladu amygdalinu vzniká kyanid. Námi zjištěné výsledky potvrzují, že amygdalin je schopný ničit buňky buněčné kultury U266. Dlouhodobý vliv amygdalinu na buněčnou kulturu je možné sledovat i prostřednictvím UPE.

SUMMARY

The phenomenon of ultra-weak photon emission (UPE) is observed in all biological systems such as microorganisms, plants and animals. We are currently able to detect UPE at different structural levels of biological systems such as whole organisms, organs, cell culture and organelles. It is widely accepted that the UPE is connected with oxidative metabolic processes in biological systems. In this study, ultra-weak photon emission was used to determine the effect of the natural glycoside amygdalin on human multiple myeloma (U266) and fibroblasts (3T3). Amygdalin is a substance that carries both positive and negative effect on living organism. Amygdalin is known in Chinese medicine for its effects in the prevention and treatment of migraine headaches, high blood pressure and chronic inflammation. One of the most important properties of amygdalin is its ability to destroy tumor cells. On the other hand, amygdalin is frequently associated with the risk of poisoning because of its decomposition to toxic cyanide. Our results confirm the findings that amygdalin is capable of destroying U266 cells. Long-term effect of amygdalin on cell culture can be monitored by UPE.

SEZNAM ZKRATEK

CCD	charge coupled device
DEFERAL	deferoxamine mesylate
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
$O_2^{\bullet-}$	superoxidový aniontový radikál
HO^{\bullet}	hydroxylový radikál
H_2O_2	peroxid vodíku
1O_2	singletní kyslík
PMT	fotonásobič
ROS	reaktivní formy kyslíku
R^{\bullet}	lipidový nebo proteinový alkylový radikál
RH	biomolekula (lipid, protein)
ROO^{\bullet}	peroxylový radikál
ROH	organický hydroxid
ROOOOR	tetroxid
R=O	karbonyl
$^3R=O$	tripletní excitovaný karbonyl
UPE	ultra slabá fotonová emise

Obsah

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1. Ultra slabá fotonová emise	3
2.1.1. Charakterizace ultra slabé fotonové emise	3
2.1.2. Lidské tělo	4
2.1.3. Buňky	6
2.2. Amygdalin	7
2.2.1. Charakterizace	7
2.2.2. Chemická struktura	9
2.2.3. Mechanismus působení	11
2.2.4. Rizika	13
3. CÍL PRÁCE	14
4. MATERIÁL A METODY	15
4.1. Buňky	15
4.1.1. Fibroblasty 3T3	15
4.1.2. Buněčná kultura U266	16
4.2. Médium	17
4.3. Určení hustoty a životaschopnosti buněk	19
4.3.1. Hustota buněk	19
4.3.2. Životaschopnost	19
4.4. PMT měření	19
5. VÝSLEDKY	20
5.1. Vliv mandlového extraktu na hustotu buněk	20
5.2. Vliv amygdalinu na životaschopnost buněk	21
5.3. Vliv amygdalinu na ultra slabou fotonovou emisi	23
5.3.1. Krátkodobý vliv amygdalinu	23
5.3.1.1. Měření spontánní ultra slabé fotonové emise	23
5.3.1.2. Měření ultra slabé fotonové emise indukované peroxidem vodíku	24
5.3.1.3. Vliv antioxidantů na ultra slabou fotonovou emisi indukovanou peroxidem vodíku z buněčné kultury U266 ovlivněné amygdalinem	25
5.3.1.4. Vliv chelátorů na ultra slabou fotonovou emisi indukovanou peroxidem vodíku z buněčné kultury U266 ovlivněné amygdalinem	26
5.3.2. Dlouhodobý vliv amygdalinu	28

5.3.2.1. Měření spontánní ultra slabé fotonové emise	28
5.3.2.2. Měření ultra slabé fotonové emise indukované peroxidem vodíku	29
6. DISKUZE	31
7. ZÁVĚR	35
8. SEZNAM LITERATURY	36

1. ÚVOD

Ultra slabou fotonovou emisi (UPE), často označovanou také jako biofotonovou emisi, je možné pozorovat u biologických systémů, jako jsou mikroorganismy, rostliny a živočichové. I přesto, že základní mechanismus UPE biologických systémů nebyl ještě jednoznačně objasněn, je všeobecně přijímáno, že UPE souvisí s oxidativními metabolickými procesy v biologických systémech.

Ultra slabá fotonová emise může sloužit jako neinvazivní diagnostická metoda při vyšetřování fyziologických a patologických charakteristik biologického systému. Zjištění, že měřením UPE můžeme rozlišit zdravé a rakovinné buňky otevírá možnosti použití této techniky k diagnostice nádorových buněk a to díky vývoji nízkošumových fotonásobičů (PMT) a velmi citlivých charge coupled device (CCD) kamer.

Bakalářská práce využívá detekce UPE lidských mnohočetných myelomů, buněčné linie U266 k určení účinnosti amygdalinu ničit nádorové buňky. Amygdalin je přírodní glykosid, obsažený ve více jak 1200 druzích rostlin, z nichž velká část je jedlých. Amygdalin je také znám pod názvem vitamín B17, laetril či nitrilosid. Nejvyšší koncentrace amygdalinu je obsažena v jádrech pecek běžných druhů ovoce, jako jsou meruňky, broskve, švestky, třešně, višně, ryngle, "špendlíky", mandle a ořechy. Na severní polokouli existuje pouze jediný druh ovoce - citrusy, které neobsahují žádný amygdalin.

Největšího ohlasu se amygdalin dočkal především kolem 50. let 20. století, kdy bylo zjištěno, že je úspěšný v boji s rakovinou. Avšak od té doby je účinnost amygdalinu považována spíše za mýt. K tomuto faktu přispěly i výsledky výzkumů, prováděných v 70. a 80. letech.

Výsledkem různých testování je, že prodej hořkých jader, které obsahují vysoké množství amygdalinu je ve většině států světa zakázán. Důvodem zákazu je fakt, že po požití se amygdalin začne rozkládat na glukózu, kyanid a benzaldehyd. Vzniklý kyanid se slučuje s benzaldehydem a vytváří extrémně toxickou látku mandelonitril. Po celém světě jsou známy případy předávkování a dokonce i otrav touto látkou.

V Mexiku a některých státech USA, je možný nejen prodej, ale je zde umožněna také léčba, jejíž součástí je použití amygdalinu. V současné době probíhají výzkumy nejen s jádry meruněk, ale také třešní, švestek. Nové výsledky ukazují, že amygdalin získaný z tohoto ovoce ničí rakovinné buňky, ale zároveň je zcela neškodný pro zdravé buňky. Zřejmě i tyto výsledky jsou důvodem, proč některé státy Evropské unie chtějí amygdalin legalizovat.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ultra slabá fotonová emise

2.1.1. Charakterizace ultra slabé fotonové emise

Ultra slabou fotonovou emisi (UPE) objevil a poprvé popsal v roce 1922 ruský biolog Alexander Gurwitsch jako mitotické záření. Mitotické záření bylo popsáno jako velmi slabé fotonové záření v ultrafialové oblasti spektra. Absence citlivých detektorů v té době bohužel neumožňovala přímé měření tak slabých signálů a proto musel Gurwitsch používat nepřímé metody. Po velké popularitě ve 20. a 30. letech minulého století, přišel útlum, který trval až do poloviny 70. let. V 70. letech byla díky německému profesorovi F. A. Poppovi znovu objevena. Ten změnil název z mitotického záření na biofotonovou emisi, která je synonymem pro dnes hojně používanou UPE (Bischof 2008). V době objevu byla UPE spojována s ultrafialovou oblastí spektra (200-400nm), zatímco dnes je UPE definována v celém rozsahu ultrafialového a viditelného záření (200 - 800 nm). V důsledku toho, že intenzita UPE je $1 - 1000 \text{ fotonů s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, není možné sledovat UPE pouhým okem. V důsledku rozvoje PMT a CCD kamer je dnes možné detekovat UPE z rostlin (Mathew a Roy 1992; Bajpai 2004), buněčných kultur (Kim a kol. 2007), živočišných orgánů (Kim a kol. 2005) nebo také z lidské kůže (Cohen a Popp 1997; van Wijk a van Wijk 2005; Cifra a kol. 2007; Rastogi a Pospíšil 2010; Rastogi a Pospíšil 2011; Prasad a Pospíšil 2011; Prasad a Pospíšil 2012).

Všeobecně je známo, že UPE souvisí s oxidativními metabolickými procesy, způsobenými reaktivními formami kyslíku (ROS). Reaktivní formy kyslíku jsou molekuly kyslíku obsahující jeden nebo více nepárových elektronů. Dělíme je na 1) radikálové, obsahující aspoň jeden nepárový elektron, 2) neradikálové, neobsahující žádný nepárový elektron. Mezi radikálové ROS patří superoxidový aniontový radikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a hydroxylový radikál (HO^{\bullet}), zatímco singletní kyslík ($^1\text{O}_2$) a peroxid vodíku (H_2O_2) patří mezi neradikálové ROS. Reaktivní formy kyslíku, které jsou přirozeným vedlejším produktem normálního metabolismu molekulárního kyslíku, hrají významnou roli v buněčné signalizaci a v obranných mechanismech při napadení organismu patogenem. Za normálních podmínek jsou ROS tvořeny především v mitochondriích

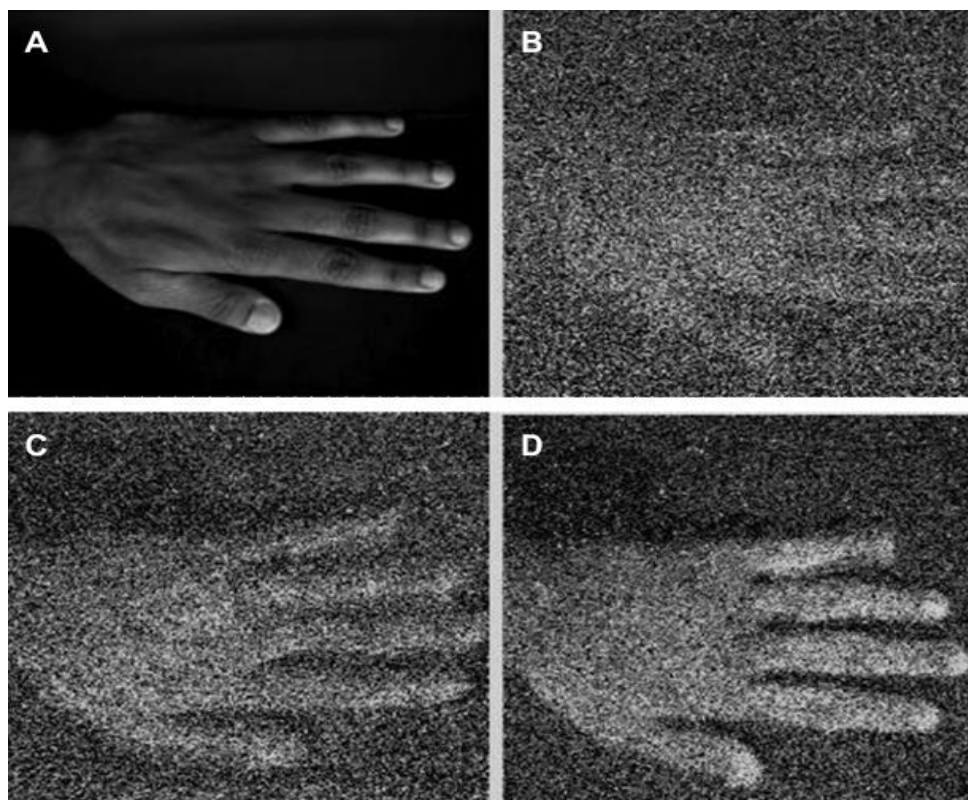
jako meziprodukt buněčného dýchání. Pokud jsou buňky vystaveny stresovým podmínkám jako UV záření, ionizující záření nebo vyšší teploty, dochází také ke zvýšené tvorbě ROS, známé jako oxidativní stres (Ozawa 1999).

2.1.2. Lidské tělo

Ultra slabá fotonová emise je spontánně vyzařována z biologických systémů, včetně člověka. Metabolické procesy jsou základní chemické reakce vyskytující se uvnitř všech živých buněk. Při metabolických procesech jako je buněčné dýchání (živočichové), nebo oxidativní vzplanutí (rostliny) vznikají ROS, které hrají důležitou roli v obraně proti infekci, buněčné signalizaci a apoptóze. Avšak, díky svému vysokému pozitivnímu redoxnímu potenciálu, ROS mají schopnost oxidovat různé buněčné složky, jako jsou lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny. Proti oxidačnímu poškození si tyto buněčné složky vytvářejí vlastní obranný systém. Za určitých podmínek, kdy množství vzniklých ROS přesahuje schopnosti antioxidantního systému aktivně se bránit, nejsou nebezpečné ROS dostatečně odstraněny. Toto nedostatečné odstranění způsobuje nerovnováhu systému, což vede k poškození buněčné membrány a buněčné smrti. Reaktivní formy kyslíku mohou poškodit lidskou pokožku a tím zahájit předčasné stárnutí pleti nebo vznik rakoviny kůže. U člověka UPE pochází z epidermální a dermální části kůže, to znamená, že UPE je možné detekovat pouze z 3 mm vrstvy (Prasad a Pospíšil 2011; Rastogi a Pospíšil 2011).

Ultra slabá fotonová emise může být využita pro zkoumání kůže živých organismů, avšak důležitým faktem je aby kůže byla nepoškozená. Velmi podstatná je znalost časové a prostorové změny UPE u normálních a zdravých organismů. Na základě těchto znalostí pak může být vyvíjena nová diagnostická metoda v medicíně (Cifra a kol. 2007). Intenzita UPE se při normálních fyziologických podmínkách může lišit až o 70% od denního průměru (Cifra a kol. 2008). I přes tyto rozdíly neexistuje žádná výrazná závislost na pohlaví a věku (Choi a kol. 2002). Další experimenty ukazují, že také svalová aktivita může zvýšit UPE (Laager a kol. 2008), stejně jako různé stresory jako jsou UV záření, ozón a cigaretový kouř. Faktory ovlivňující intenzitní a spektrální parametry UPE jsou teplota a vlhkost kůže, spektrální složení budícího UV záření a koncentrace O₂ v okolní atmosféře. Vliv pH na UPE nebyl prokázán (Hagens a kol. 2008)

Práce (Rastogi a Pospíšil 2011) zkoumala vliv antioxidantů na UPE z lidské kůže. Tento vliv byl studován poté, co pokožka ruky byla vystavena různým stresovým faktorům, ať už fyzikálním (ultrafialové záření), nebo chemickým (peroxid vodíku, cigaretový kouř). Bylo zjištěno, že aplikací antioxidantů (kyselina askorbová, koenzym Q10) dochází ke snížení UPE. Zatímco při lokální aplikaci ROS (peroxid vodíku, superoxidový aniontový radikál, hydroxylový radikál) dochází ke zvýšení UPE. Ultra slabá fotonová emise dosahovala nejvyšších hodnot po aplikaci hydroxylového radikálu a nejnižších hodnot po aplikaci H_2O_2 (Prasad a Pospíšil 2011). Další z prací (Prasad a Pospíšil 2012) se zabývala vlivem viditelného světla a UV záření na UPE. Pokožka ruky byla vystavena těmto zářením po dobu 5 min. Zjištěné výsledky ukazují, že došlo ke zvýšení UPE. Indukovaná ultra slabá fotonová emise byla nejvyšší u UV záření (Obr. 2.1.2.1.).



Obr. 2.1.2.1.: 2D obraz indukované ultra slabé fotonové emise z hřbetní strany ruky. Fotografie ruky (a), 2D obraz spontánní (b), indukované viditelným světlem (c) a indukované UVA zářením (d) ultra slabé fotonové emise ruky. V případě (b) byla ruka 30 min před měřením v úplné tmě. V případě (c,d) byla ruka vystavena viditelnému světlu (400 - 700 nm) a UVA záření (320 – 400 nm), po dobu 5 min. Fotografie ruky byla pořízeny pomocí CCD kamery při slabém světle. (Prasad a Pospíšil 2012).

Nejvíce zkoumanou částí lidského těla jsou ruce a to proto, že jsou nejlépe dosažitelné místo lidského těla. Experimenty UPE, které probíhaly po dobu 24 hod, ukázaly, že dochází k výkyvům, které jsou větší na hřbetní straně ruky, než na dlaních. Ke změnám pravo-levé symetrie dochází pouze na hřbetní straně ruky. Ultra slabá fotonová emise hřbetní části levé ruky je vysoká v noci, zatímco UPE hřbetní části pravé ruky je výraznější většinou během dne. Během 24 hod měření se hřbetní strana ruky projevila jako mnohem stabilnější (van Wijk a van Wijk 2007; Cifra a kol. 2007).

Měření UPE a teploty kůže na 12 místech těla ukazují, že vzájemný vztah teploty a intenzity emise je velký na rukou, avšak na jiných částech těla je obvykle mnohem nižší a nestabilní (Cifra a kol. 2008). Při prostorovém mapování intenzity UPE bylo zjištěno, že existuje typický anatomický model UPE (van Wijk a van Wijk 2005; Van Wijk a kol. 2006)

2.1.3. Buňky

Je známou skutečností, že existuje vzájemné ovlivňování mezi mechanicky oddělenými biologickými systémy. Gurwitsch již od roku 1920 ve svých pracích poukazoval na nechemickou a neelektrickou komunikaci mezi biologickými systémy. Svými experimenty dokázal, že u chemicky izolovaných buněk kořenové cibule dochází k nárůstu počtu mitóz, pokud jsou v blízkosti jiných aktivně dělících se buněk. Při použití UV filtru bylo toto ovlivnění zrušeno. Vzhledem k tomu, že tato práce a mnohé další studie bohužel nebyly zveřejněny v angličtině, nemohlo si toto téma získat dostatek pozornosti i v západním světě. Od té doby několik dalších prací poskytlo důkazy o nechemické a neelektrické mezibuněčné komunikaci. Bylo provedeno větší množství experimentů, kde pomocí barvení buněk byla pozorována morfologie. Bylo zjištěno, že cytopatické účinky vyvolané zářením, chemickými látkami nebo viry mohou být vyvolány také v jiných chemicky izolovaných buňkách (Trushin 2004). Stejnou nechemickou a neelektrickou mezibuněčnou komunikaci sledoval také Farhadi a kol. (2007). Po 10, 30 a 60 min přidání H_2O_2 byly naměřeny stejné změny celkového obsahu bílkovin a poškození struktury jak u vzorku, ke kterému byl přidán H_2O_2 , tak i druhého vzorku, kam přidán nebyl (Farhadi a kol. 2007).

V mnoha experimentech používají UPE k rozlišení zdravých a rakovinných buněk. Jedná se o neinvazivní metodu, která nám poskytuje nové možnosti pro zjištění

rakoviny a to díky vývoji nízko-šumových PMT a velmi citlivých CCD kamer. Tyto detektory mohou představovat novou techniku pro zobrazování rakoviny. Avšak podstatnou otázkou je, zda je možné nádorové tkáně charakterizovat určitou intenzitou UPE a tak ji odlišit od okolní zdravé tkáně. Výsledky některých měření ukazují, že by to mohlo být možné, ale zcela jasné rozdíly mezi intenzitou fotonové emise nádorových tkání a přilehlé zdravé tkáně nebyly zjištěny. Ví se, že rakovinné tkáně emitují více fotonů než ty zdravé, ale mezi jednotlivými typy tkání je rozdíl fotonových emisí velmi malý (Kim a kol. 2005).

Experimenty na buněčné kultuře HeLa ukazují, že existuje blízký vztah mezi intenzitou UPE, rychlostí růstu a životaschopností buněk HeLa. Těchto znalostí může být pak využito pro analýzu růstové aktivity, například životaschopnost buněk a nádorové bujení (Kim a kol. 2007).

2.2. Amygdalin

2.2.1. Charakterizace

Robiquet a Boutron, jako první v roce 1830 izolovali amygdalin z hořkých mandlí. O sedm let později byl amygdalin vůbec poprvé blíže chemicky popsán a to německými chemiky Liebigem a Wohlerem. Téměř po sto letech, v roce 1924 byla představena syntetická forma amygdalinu. V polovině 30. let Marc a Vierhover podrobněji shrnuli další biochemické vlastnosti této látky. Zjistili, že při *in vitro* hydrolýze emulsinu a zředěné kyseliny se uvolní 1 molekula kyanovodíku, benzaldehydu a 2 molekuly glukózy. Také zjistili, že rychlost uvolňování kyanovodíku je závislá na koncentraci enzymu emulsinu. Toxikologické testy prováděné na měkkýších, králicích a psech ukázaly, že s postupně zvyšujícími dávkami se objevily symptomy otravy kyanidem až do chvíle, kdy nastala smrt (Dorr a Paxinos 1978).

U mnoha zdrojů, které poskytují informace o této látce dochází k nesprávné záměně termínů amygdalin a laetril. Amygdalin je pouze přírodně se vyskytující látka, zatímco laetril je syntetická forma amygdalinu. Přesněji termín laetril označuje třídu kyanogenních glykosidů, tedy nepopisuje pouze jediný chemický subjekt. Termín laetril byl původně vytvořen E. T. Krebsem ml., ten tento termín používal jako označení

pro čištěný derivát amygdalinu. Tento termín je zkratka vzniklá ze slov “laevo rotator”, což znamená, že v polarizovaném světle je tato látka levotočivá. Amygdalin lze získat z různých rostlinných zdrojů jako například z vikve, jetele, z nejrůznějších druhů travin, z obilovin, některých druhů fazolí, ale především z jader třešní, švestek, jablek, hrušek, meruněk, broskví a v neposlední řadě z mandlí (Dorr a Paxinos 1978; Berenguer-Navarro 2002; Wagner a Galey 2003; Zhou a kol. 2012).

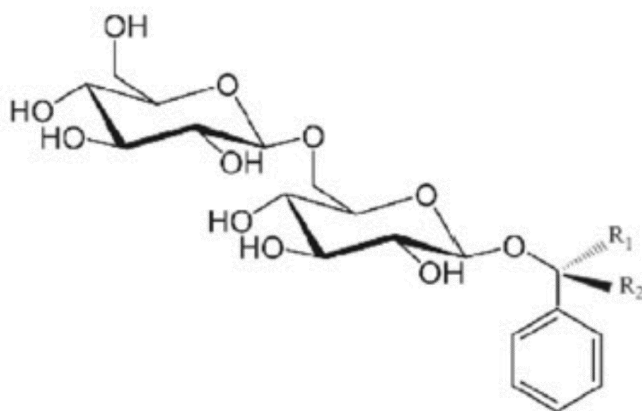
Již od počátku 19. století je známo, že divoké mandle obsahují kyanogenní glykosid amygdalin. V ovoci tuto látku najdeme v jádrech i v ovocné dužnině. Kyanogenní glykosidy jsou typické druhotné rostlinné přípravky s ochrannou funkcí proti herbivorů. Z toho vyplývá, že tyto látky jsou nebezpečné také pro včely, které opylovávají tyto rostliny a stromy. Studie ukázala, že mandloně využívají svého brzkého rozkvětu k opylování. Včely na začátku jara nemají příležitost si vybírat mezi velkým množstvím kvetoucích rostlin, a proto opylovávají i mandloně, jejichž nektar obsahuje značné množství amygdalinu. V období, kdy začnou kvést i ostatní rostliny s menším nebo téměř žádným obsahem této látky, dojde k tomu, že včely začnou vyhledávat nektar kdekoli jinde, než na mandloních. Amygdalin je ve větším množství pro včelu smrtelně nebezpečný (London-Shafir a kol. 2003).

Amygdalin je velmi dobře známý v čínské medicíně. Je hlavní biologicky aktivní složkou u meruňky obecné a hořkých mandlí. Amygdalin může být použit pro prevenci a léčbu migrény, vysokého krevního tlaku, chronických zánětů jako je například chronická gastritida. Pomůže zmírnit kašel, může zlepšit imunitu, snížit hladinu cukru v krvi, avšak jednou z nejpodstatnějších vlastností amygdalinu je schopnost ničit rakovinné buňky (Yan a kol. 2006; Wei a kol. 2009).

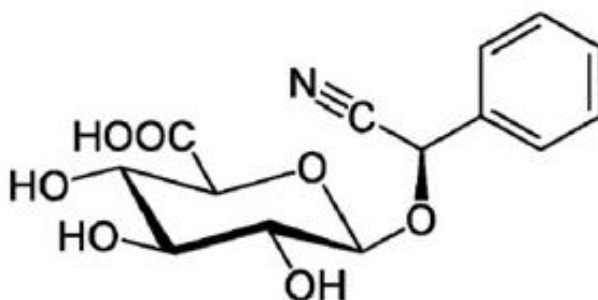
Jeden z experimentů prokázal účinnost amygdalinu při léčbě zánětu. Test byl proveden na potkanech, u nichž byl zánět tlapek způsoben podáním histaminu. Ukázalo se, že významně zpomaluje akutní fáze zánětu a to díky tomu, že dokáže zablokovat další produkci histaminu. Byly potvrzeny také analgetické a protikřečové vlastnosti nejen u zakoupeného amygdalinu, ale taktéž u extraktu získaného z jader meruňky obecné (Badr a Tawfik 2010).

2.2.2. Chemická struktura

Amygdalin (D-mandelonitrile- -D-gentiobioside), $C_{20}H_{27}NO_{11}$ (Obr. 2.2.2.1.) je kyanogenní glukosid původně izolovaný z jader hořkých mandlí (*Prunus dulcis*). Amygdalin je někdy zaměňován s laevomandelonitrile (Cyanophenylmethyl- -D-glucopyranosiduroniková kyselina), $C_{14}H_{15}NO_7$ (Obr. 2.2.2.2.), který je především známý jako laetril. Nicméně, amygdalin a laetril jsou různé chemické sloučeniny. Sloučenina amygdalin je známá tím, že se ve vodě změní na neoamygdalin (L-mandelonitrile- -D-gentiobioside) (Obr. 2.2.2.1.).

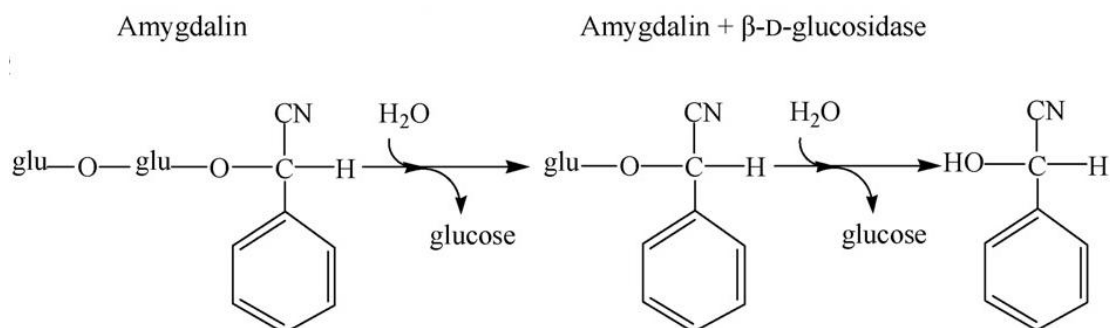


Obr. 2.2.2.1.: Chemická struktura amygdalinu ($R_1 = H$, $R_2 = CN$) a neoamygdalinu ($R_1 = CN$, $R_2 = H$) (Zhou a kol. 2012).



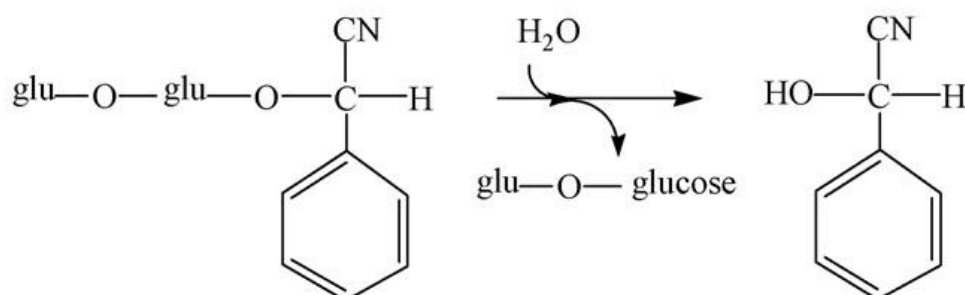
Obr. 2.2.2.2.: Chemická struktura laetrilu (Zhou a kol. 2012).

Předpokládá se, že amygdalin je postupně hydrolyzován na prunasin a poté na mandelonitril (Obr. 2.2.2.3.).



Obr. 2.2.2.3.: Dvoukroková hydrolyza amygdalinu (Zhou a kol. 2012).

Také může dojít k tomu, že je amygdalin přímo hydrolyzován na mandelonitril (Obr. 2.2.2.4.).

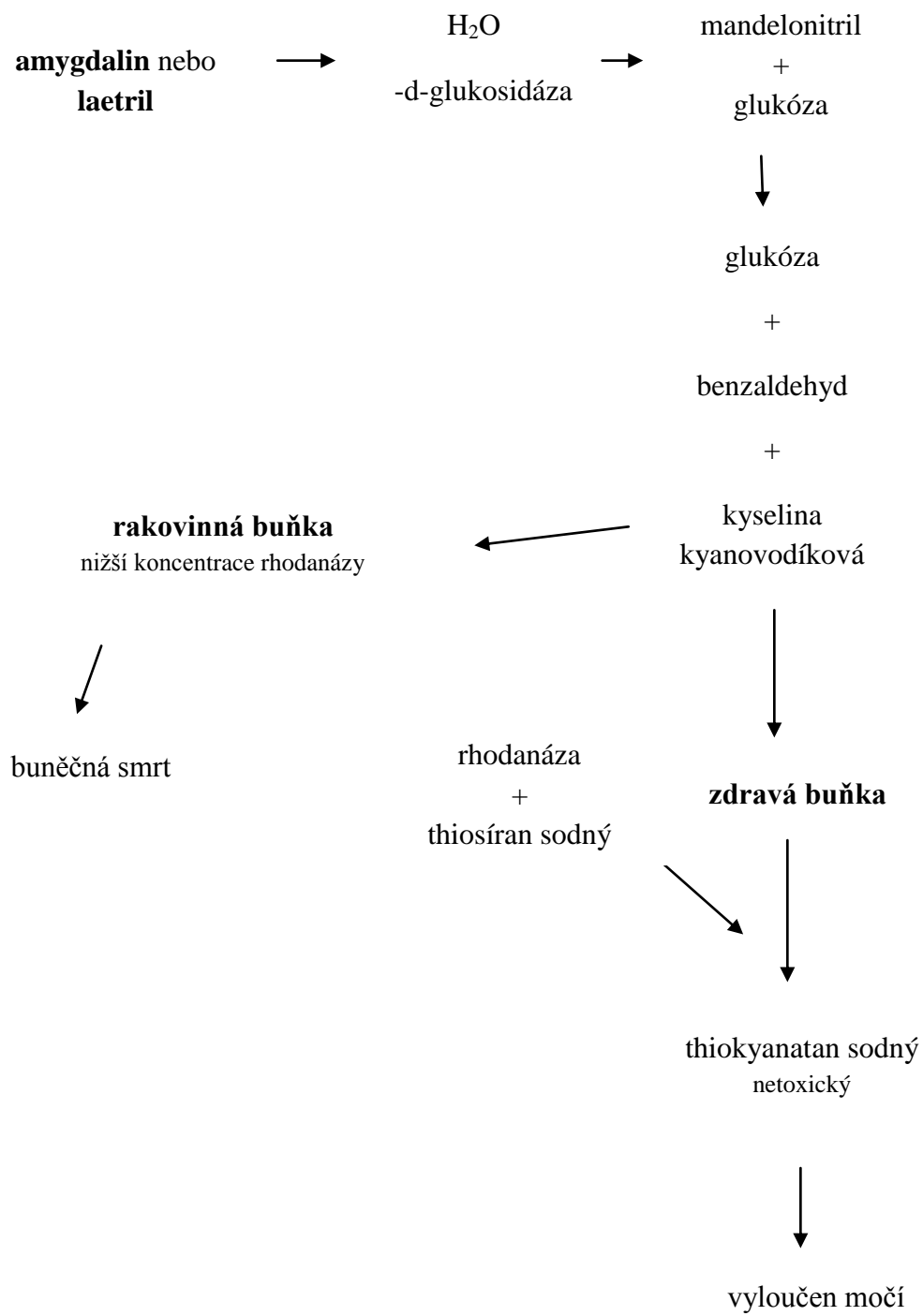


Obr. 2.2.2.4.: Přímá hydrolyza amygdalinu na mandelonitril (Zhou a kol.2012).

Mandelonitril pak může být spontánní hydrolyzou rozložen na kyselinu kyanovodíkovou (HCN) a benzaldehyd (C_6H_5CHO). Také může dojít k enzymatickému rozkladu a to pomocí benzokynázy, která je obsažena v emulsinovém komplexu. Tento komplex obsahuje enzymy, jako jsou β -D-glukosidáza, benzokyanáza a jiné. Při pokusech s buněčnou kulturou HepG2 se ukázalo, že pokud chceme zvýšit účinnost amygdalinu, je možné jej aktivovat β -D-glukosidázou (Zhou a kol. 2012).

2.2.3. Mechanismus působení

Od chvíle, kdy byl zjištěn protinádorový vliv amygdalinu, vědci chtěli zjistit, jak konkrétně dochází ke zničení nádorových buněk. Bylo navrženo mnoho mechanismů, které se v průběhu let několikrát změnily. I přes velkou kritiku je dodnes uznáván nejstarší a nejznámější mechanismus působení amygdalinu. Předpokládá se, že amygdalin je aktivován β -D-glukosidázou, která je ve vysokých koncentracích v nádorových buňkách. Dochází k hydrolyze, jejíž produktem je glukóza a mandelonitril. K dalšímu štěpení může docházet spontánně, nebo pomocí sekundárních enzymů, kdy se mandelonitril rozštěpí na benzaldehyd a kyselinu kyanovodíkovou. Ze schématu (Obr. 2.2.3.1.) vyplývá, že ve zdravých a rakovinných buňkách bude odlišná koncentrace β -D-glukosidázy. Tento enzym chrání zdravé buňky před kyanovodíkem, který přemění na netoxický thiokyanát. U rakovinných buněk je koncentrace enzymu rhodanáza mnohem nižší a proto buňku neochrání před HCN (Dorr a Paxinos 1978). Stejný mechanismus platí také pro laetril.



Obr. 2.2.3.1.: Mechanismus aktivace amygdalinu nebo laetrilu.

2.2.4. Rizika

Největším rizikem, které s sebou přináší amygdalin je přítomnost kyanidu, který je znám jako prudký jed. I malé množství kyanidu může zastavit buněčné oxidativní procesy (Bromley a kol. 2005). Příjem potravin, které obsahovaly velké množství kyanogenních glykosidů vedlo v některých případech ke smrti nebo bylo spojováno s chronickými neurologickými účinky (Silva a kol. 2006, Cho a kol. 2008). Dlouhodobý příjem kyanidu prostřednictvím některých potravin byl spojen s pankreatickým diabetem, hypotyreózou (Soto-Blanco a kol. 2002, Soto-Blanco a Górnjak 2003). Časté perorální požívání kyanovodíku nejen, že může způsobit pokles tělesné hmotnosti, ale může také přerušit funkci štítné žlázy (Silva a kol. 2006).

Po objevu amygdalinu a jeho schopnosti ničit rakovinné buňky, začaly přibývat případy otrav a jiných potíží po požití velkého množství této látky. Otravy amygdalinem byly zaznamenány z různých částí světa. Nejednalo se pouze o dospělé lidi, ale také o děti. Proto byly zavedeny velmi přísné kontroly, které sledují koncentraci amygdalinu. Případně došlo k úplnému zákazu prodeje například hořkým mandlím, hořkých jader meruněk, aby se zabránilo dalším případům úmrtí z předávkování. Některé státy v USA posléze konzumaci potravin, obsahujících větší koncentraci amygdalinu povolily i přes nedostatek studií, které by potvrdily bezpečnost této látky (Dorr a Paxinos 1978).

3. CÍL PRÁCE

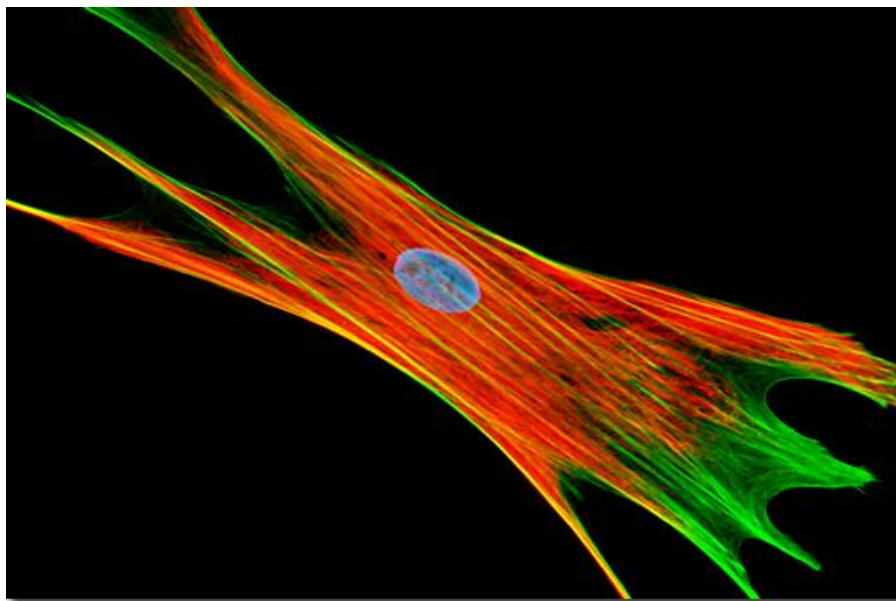
Cílem bakalářské práce bylo bližší seznámení s problematikou ultra slabé fotonové emise, funkcemi a ovládáním nízko-šumového fotonásobiče (PMT). Pomocí měření ultra slabé fotonové emise zjistit vliv amygdalinu na nádorové buňky (U266).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Buňky

4.1.1. Fibroblasty 3T3

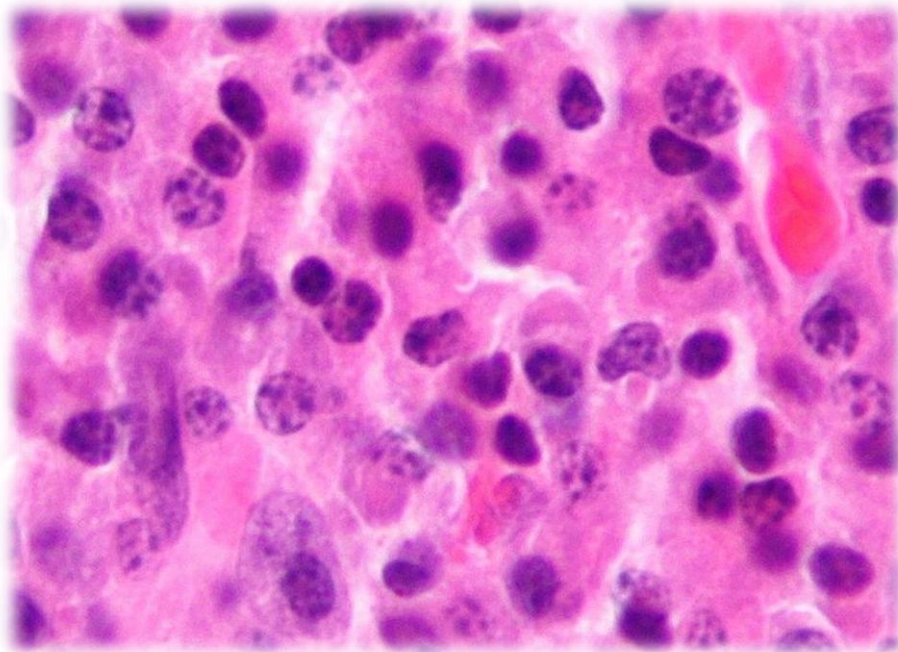
Fibroblasty tvoří jednu z hlavních složek buněčného tkáňového mikroprostředí. Tyto buňky byly poprvé popsány na konci 19. století. Typický je jejich hvězdovitý vzhled. Jejich základní funkcí je udržení tkáňové homeostázy a celistvosti. Do okolí produkuje extracelulární matrix, tedy mezibuněčnou hmotu a různá vlákna jako například kolagen. Významně se podílejí na procesech hojení. V posledních letech se stále více pozornosti soustřeďuje na vliv fibroblastů u nádorových onemocnění. Vzhledem k významu těchto buněk se fibroblasty stávají novým terapeutickým cílem pro léčbu rakoviny. Buněčné kultury byly kultivovány v DMEM médiu v inkubátoru při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂.



Obr. 4.1.1.1.: Fibroblast (www.micro.magnet.fsu.edu).

4.1.2. Buněčná kultura U266

Buněčná kultura U266 představuje lidský mnohočetný myelom. Kultura U266 byla poprvé izolována v roce 1968 z periferní krve od 53 – letého muže. Mnohočetný myelom je známý také pod názvem Kahlerova nemoc. Jedná se o zhoubné nádorové onemocnění plazmatických buněk, což je typ bílých krvinek, které jsou zodpovědné za tvorbu protilátek. Tyto buňky se shlukují především v kostech a v kostní dřeni, kde narušují produkci normálních krevních buněk. Většina případů myelomu zahrnuje tvorbu protilátky, která působí poškození ledvin. Buněčné kultury byly kultivovány v RPMI-1640 médiu v inkubátoru při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂.



Obr. 4.1.2.1.: Buněčná kultura U266 (www.wikipedia.cz).

4.2. Médium

Pro kultivaci buněk bylo použito médium RPMI – 1640 se stabilním glutamínem, zakoupené od firmy Sigma – Aldrich (R7755).

Komponenty	g/L
Dusičnan vápenatý·4H ₂ O	0,1
Síran hořečnatý (bezvodý)	0,04884
Chlorid draselný	0,4
Chlorid sodný	6,0
Hydrogenfosforečnan sodný (bezvodý)	0,8
Kyselina jantarová·6H ₂ O·2Na	0,1
Kyselina jantarová (volná kyselina)	0,075
L-Arginin	0,2
L-Asparagin (bezvodý)	0,05
L-Asparagová kyselina	0,02
L-Cystin·2HCl	0,0652
L-Glutamová kyselina	0,02
Glycine	0,01
L-Histidin	0,015
Trans-4-hydroxy-L-prolin	0,02
L-Isoleucin	0,05
L-Leucin	0,05
L-Lysin·HCl	0,04
L-Methionin	0,015
L-Fenylalanin	0,015
L-Prolin	0,02
L-Serin	0,03
L-Threonin	0,02
L-Tryptofan	0,005
L-Tyrosin	0,02
L-Valin	0,02

D-Biotin	0,0002
Cholin bitartrát	0,00544
Kyselina listová	0,001
myo-Inositol	0,035
Niacinamid	0,001
p-Aminobenzoová kyselina	0,001
D-Pantothenová kyselina (hemicalcium)	0,00025
Pyridoxin·HCl	0,001
Riboflavin	0,0002
Thiamin·HCl	0,001
Vitamín B-12	0,000005
D-Glukóza	2,0
Glutathion (redukovaný)	0,001
Fenolová červeň·Na	0,00318

4.3. Určení hustoty a životaschopnosti buněk.

4.3.1. Hustota buněk

Hustotu buněk jsme určovali pomocí Bürkerovy komůrky a světelného mikroskop (Mikroskop Carl Zeiss, Jena, Německo) se zvětšením 187,5x.

4.3.2. Životaschopnost

Pro určení životaschopnosti (počet živých buněk) a úmrtnosti (počet mrtvých buněk) jsme buňky barvili 4% trypanovou modří. Poté jsme ke zjištění životaschopnosti použili Bürkerovy komůrku a světelný mikroskop (Mikroskop Carl Zeiss, Jena, Německo) se zvětšením 187,5x.

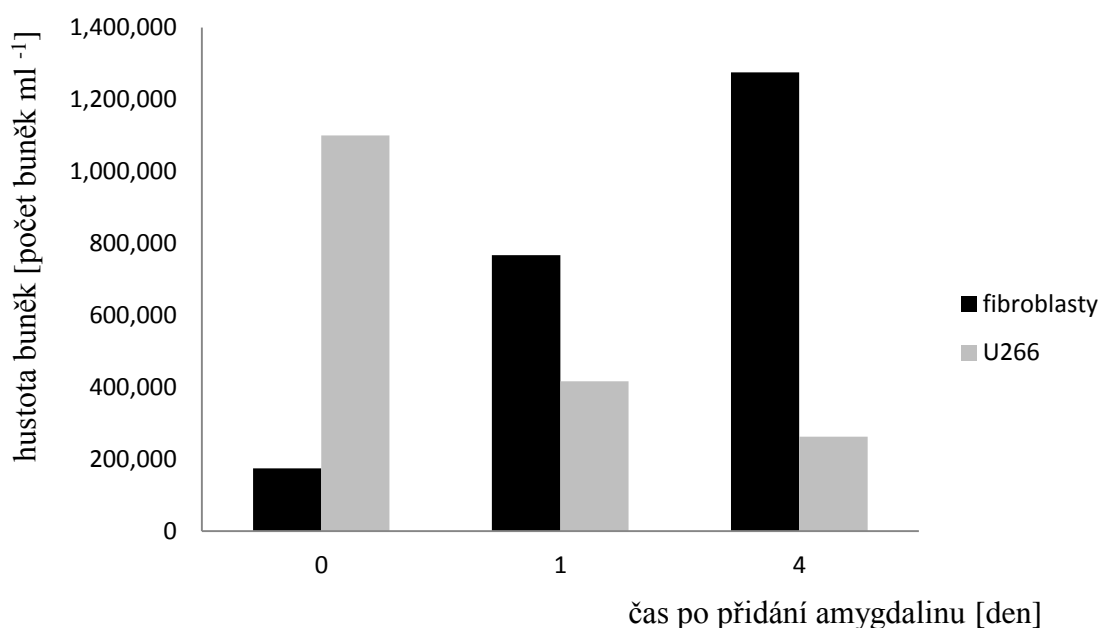
4.4. PMT měření

K měření UPE byl použit fotonásobič Hamamatsu R7518P (Hamamatsu Photonics KK, Iwata City, Japonsko) se spektrální citlivostí v rozsahu od 185 nm do 730 nm. Počítání fotonů bylo zajištěno pomocí počítač jednotky C9744 (Hamamatsu Photonics KK, Iwata City, Japonsko). Pro snížení šumu bylo PMT chlazeno na -30 °C, za použití termoelektrického chladiče C9143. Zařízení pro zpracování dat bylo umístěno v tmavé místnosti, vymalované černou barvou, aby zde byly vyhovující podmínky pro PMT a vzorky. Ovládací počítač byl ve vedlejší místnosti. Všechna měření byla provedena při pokojové teplotě. Vzorky byly před každým měřením umístěny do tmy na dobu 10 min. Pak byl vzorek v uzavřené plastové Petriho misce o průměru 5,5 cm umístěn těsně pod PMT okno. Všechna další přidávání látek během měření byla provedena v úplné tmě. Objem vzorku byl 5 ml a všechny koncentrace byly uzpůsobeny pro toto množství. Integrální intenzita fotonové emise byla vyhodnocena jako součet hodnot jednotlivých pulzů.

5. VÝSLEDKY

5.1. Vliv mandlového extraktu na hustotu buněk

Vzhledem ke skutečnosti, že amygdalin se běžně vyskytuje ve sladkých mandlích, rozhodli jsme se ověřit schopnost mandlového extraktu ničit rakovinné buňky. K tomuto ověření jsme použili metodu počítání buněk buněčné kultury U266 (rakovinné buňky) a fibroblastů 3T3 (zdravé buňky).



Obr. 5.1.1.: Časová závislost vlivu mandlového extraktu na počet buněk buněčné kultury U266 a fibroblastů 3T3.

Metodou počítání buněk jsme zjistili, že i mandlový extrakt snížil hustotu buněk buněčné kultury U266. Hustota buněk po prvním dnu od přidání extraktu se snížila více než o polovinu původního počtu, tento pokles pokračoval i v následujících dnech. Vzrůstající hustota fibroblastů ukazuje, že mandlový extrakt nezpůsobuje úbytek zdravých buněk. Výše uvedené výsledky ukazují, že mandlový extrakt byl schopen ničit rakovinné buňky, zatímco na zdravé buňky mandlový extrakt neměl vliv.

5.2. Vliv amygdalinu na životaschopnost buněk

Vliv amygdalinu na životaschopnost buněčné kultury U266 byl sledován pomocí metody počítání buněk. Pro zjištění počtu živých (životaschopnost) a mrtvých (úmrtnost) buněk jsme buňky barvili trypanovou modří. K buněčné kultuře U266 jsme přidávali amygdalin o koncentracích 10; 7,5; 5; 2,5 mM a do poslední kultivační nádoby jsme přidali destilovanou vodu jako kontrolu. Přidání amygdalinu k buněčné kultuře U266 mělo za následek úbytek živých buněk a zvýšení počtu mrtvých buněk (Obr. 5.2.1. a 5.2.2.).

1) První den po přidání 10 mM amygdalinu se životaschopnost buněk snížila na třetinu původního počtu. Druhý den došlo také ke snížení životaschopnosti buněk, avšak tento pokles nebyl nijak výrazný. Úmrtnost buněk se po dobu měření zvyšovala jen nepatrně.

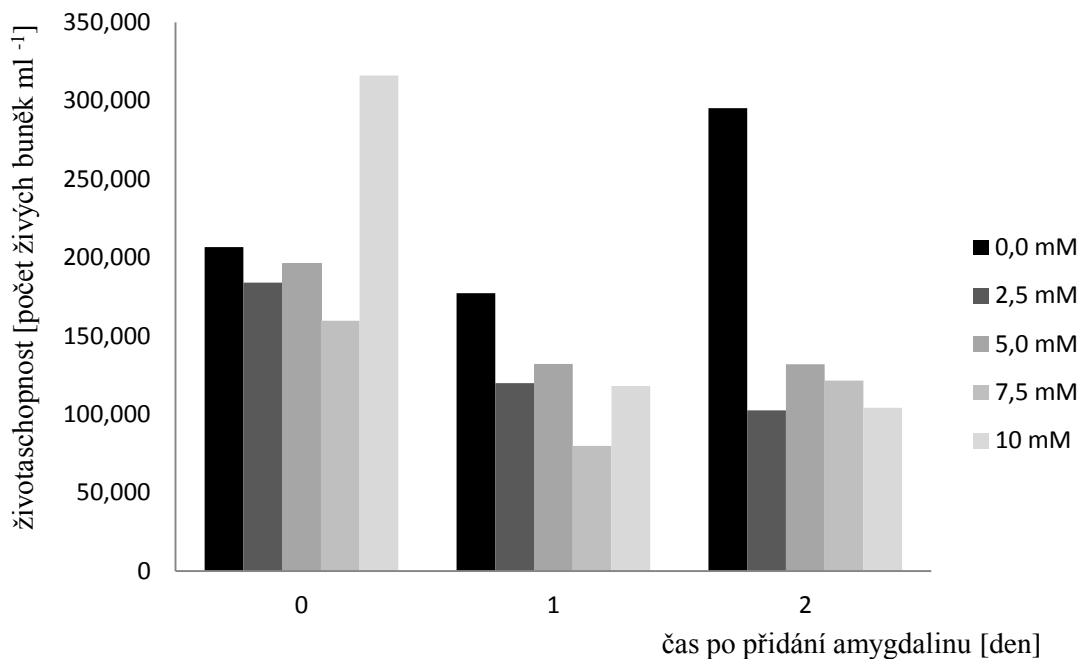
2) Po přidání 7,5 mM amygdalinu došlo během prvního dne k poklesu životaschopnosti buněk téměř na polovinu původního počtu a již po prvním dnu byl zaznamenán nárůst úmrtnosti buněk, který se i další den zvýšil. Druhý den se životaschopnost buněk začala znovu zvyšovat.

3) Po přidání 5 mM amygdalinu se životaschopnost buněk po prvním dnu snížila asi o jednu čtvrtinu původního počtu a dále už se neměnila. První den došlo k významnému zvýšení úmrtnosti buněk, a tento trend pokračoval i druhý den, kdy se úmrtnost buněk téměř zdvojnásobil.

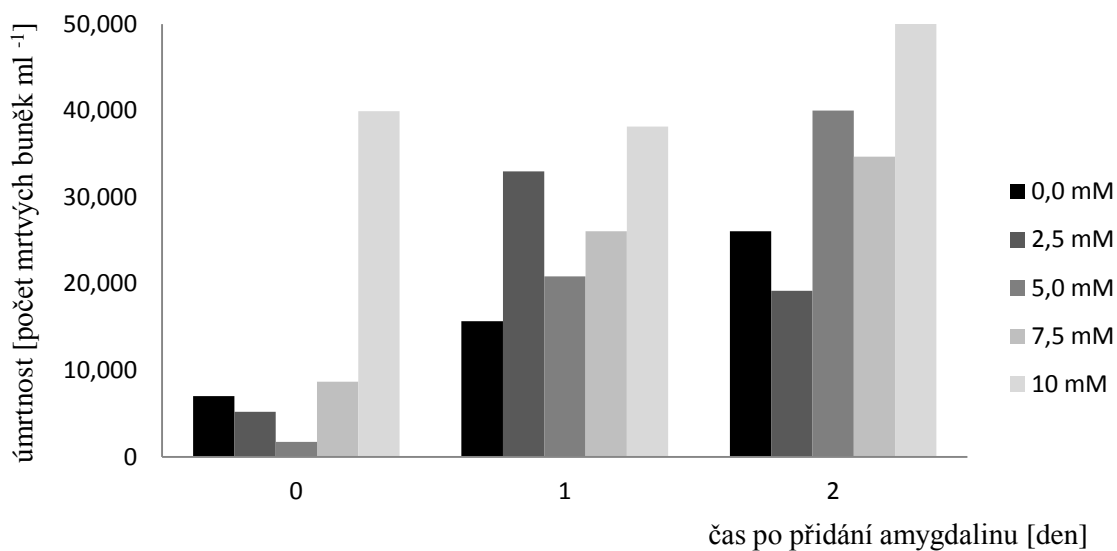
4) Přidání 2,5 mM amygdalinu mělo za následek pokles životaschopnosti buněk o více než třetinu původního počtu, druhý den byl pokles mírnější. Úmrtnost buněk se začala zvyšovat již první den, avšak druhý den poklesla.

5) U buněčné kultury U266 bez amygdalinu došlo během prvního dne k mírnému poklesu životaschopnosti buněk, ale druhý den se životaschopnost buněk výrazně zvýšila. Úmrtnost buněk se mírně zvyšovala v průběhu obou dnů.

Přidání amygdalinu ve všech koncentracích vedlo k životaschopnosti buněk ve všech vzorcích. Nebyla nalezena přímá korelace mezi koncentrací amygdalinu a úmrtností buněk.



Obr. 5.2.1.: Časová závislost vlivu amygdalinu na životaschopnost buněčné kultury U266. Amygdalin byl přidán v koncentracích 2,5; 5; 7,5 a 10 mM.



Obr. 5.2.2.: Časová závislost vlivu amygdalinu na úmrtnost buněčné kultury U266. Amygdalin byl přidán v koncentracích 2,5; 5; 7,5 a 10 mM.

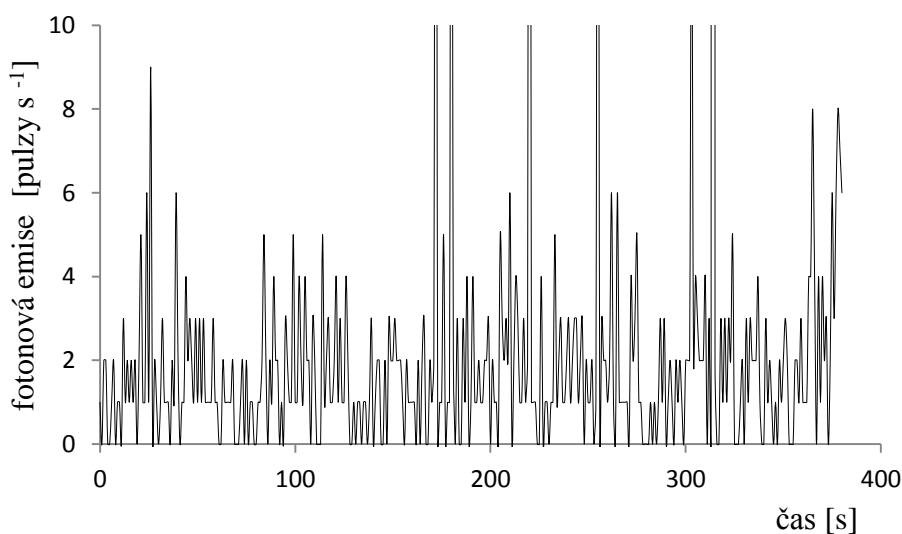
5.3. Vliv amygdalinu na ultra slabou fotonovou emisi

5.3.1. Krátkodobý vliv amygdalinu

Krátkodobý vliv představuje hodinové působení 10 mM amygdalinu na buněčnou kulturu U266. Ovlivnění krátkodobým působením amygdalinu jsme sledovali pomocí spontánní a indukované UPE. V neposlední řadě jsme sledovali vliv antioxidantů a chelátorů na indukovanou UPE získanou z buněčné kultury bez amygdalinu a buněčné kultury U266 ovlivněné amygdalinem.

5.3.1.1. Měření spontánní ultra slabé fotonové emise

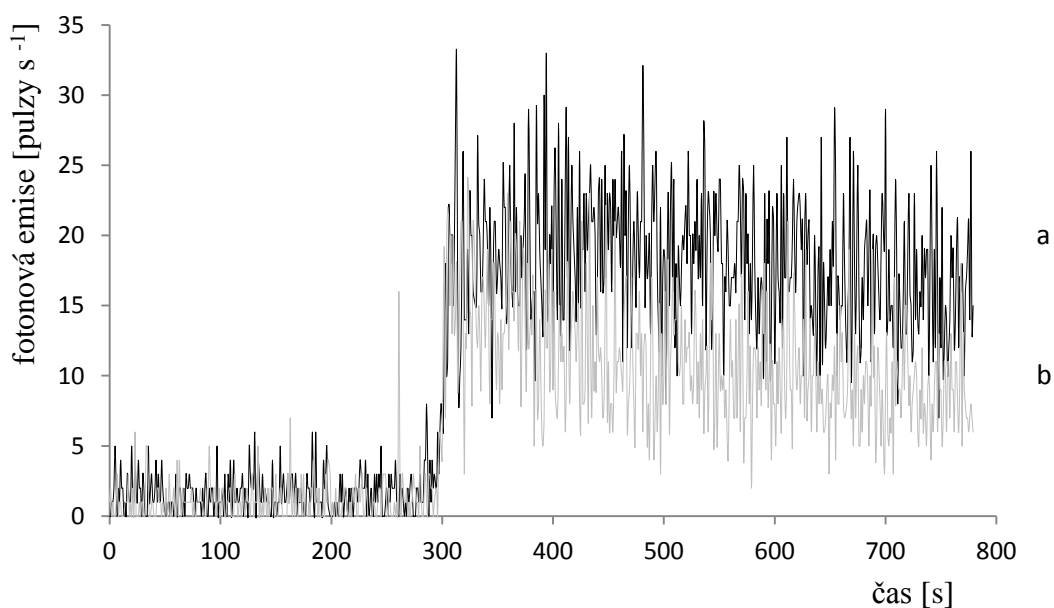
Nejprve jsme pozorovali projev krátkodobého působení amygdalinu na spontánní UPE. Ultra slabá fotonová emise z buněčné kultury U266 byla měřena po dobu 400 s. Průměrná hodnota pozadí byla 0,96 pulzů s^{-1} zatímco, průměrná hodnota UPE kontrolního vzorku dosahovala 1,57 pulzů s^{-1} . Po odečtení pozadí vychází průměrná hodnota UPE z buněčné kultury 0,61 pulzů s^{-1} . V průběhu měření spontánní UPE nedošlo k žádným výrazným změnám. Srovnání spontánní UPE buněčné kultury U266 s amygdalinem a bez něj ukazuje, že rozdíly emisí jsou minimální.



Obr. 5.3.1.1.: Spontánní ultra slabá fotonová emise buněčné kultury U266.

5.3.1.2. Měření ultra slabé fotonové emise indukované peroxidem vodíku

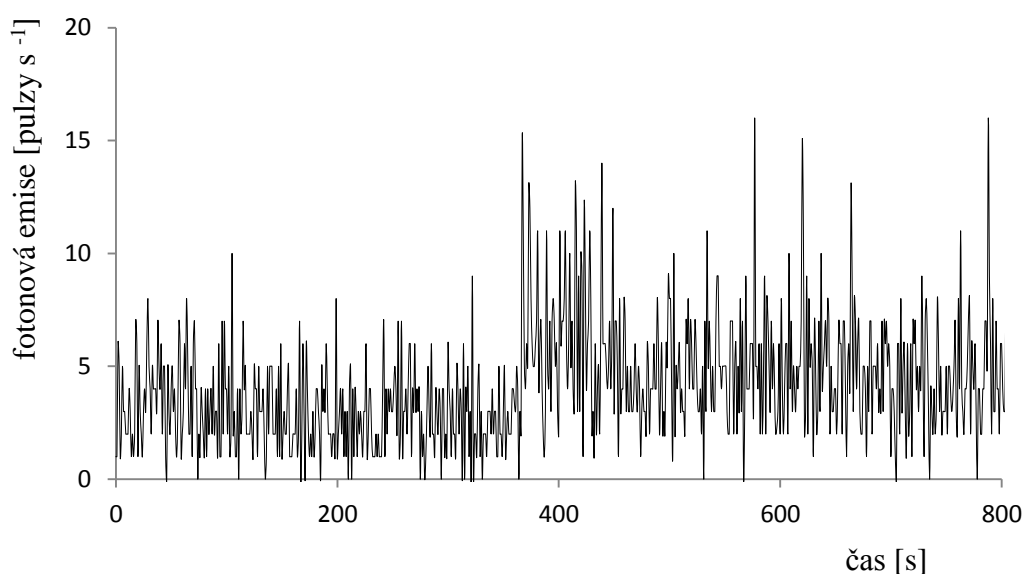
Kromě spontánní UPE jsme u krátkodobého vlivu amygdalinu zjišťovali také průběh indukované UPE. Ultra slabá fotonová emise buněčné kultury U266 byla indukována H_2O_2 (5 mM). Peroxid vodíku jsme k buněčné kultuře U266 bez amygdalinu a s amygdalinem přidali ve 300 s. Koncentrace amygdalinu dosahovala stejné hodnoty jako v předchozích měřeních, tedy 10 mM.



Obr. 5.3.1.2.: Ultra slabá fotonová emise indukovaná H_2O_2 (5 mM). Buněčná kultura U266 bez amygdalinu (a) a s 10 mM amygdalinem (b). Peroxid vodíku byl přidán ve 300 s.

5.3.1.3. Vliv antioxidantů na ultra slabou fotonovou emisi indukovanou peroxidem vodíku z buněčné kultury U266 ovlivněné amygdalinem

Vliv antioxidantů na UPE indukovanou peroxidem vodíku byl studován na buněčné kultuře U266 ovlivněné amygdalinem. K buněčné kultuře U266 byl nejprve přidán amygdalin (10 mM) hodinu před měřením a následně kyselina askorbová (1 mM) těsně před měřením. Kyselina askorbová potlačila indukovanou UPE jak u buněčné kultury U266 bez amygdalinu, tak i s amygdalinem až na úroveň spontánní emise (Obr. 5.3.1.3.).

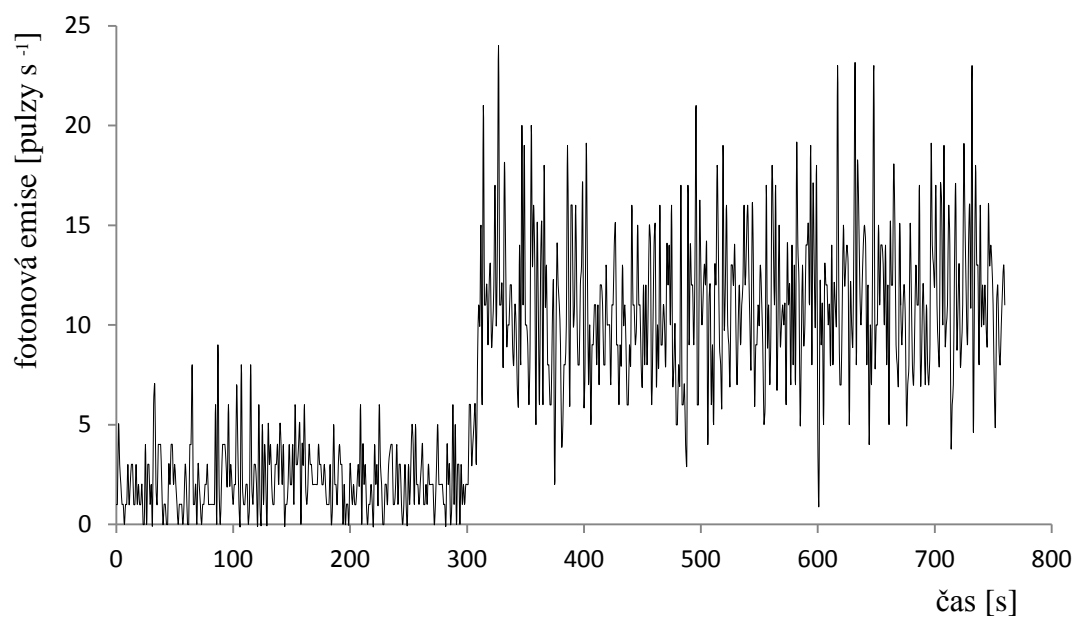


Obr. 5.3.1.3.: Ultra slabá fotonová emise buněk buněčné kultury U266 s amygdalinem po přidání kyseliny askorbové. Kyselina askorbová (1 mM) byla přidána před začátkem měření, peroxid vodíku (5 mM) po 300 s měření.

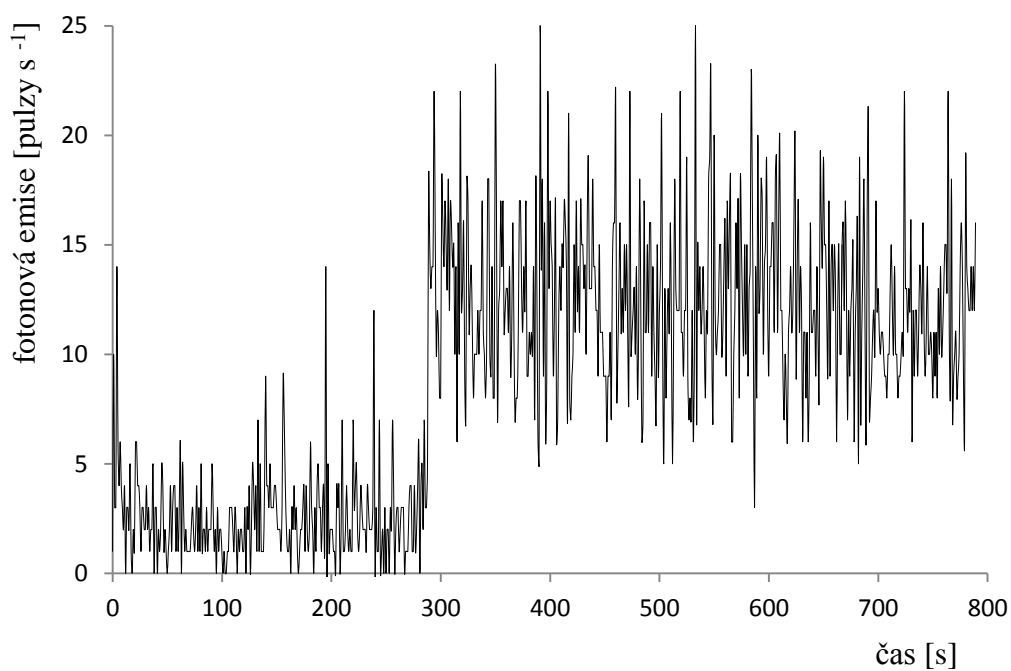
5.3.1.4. Vliv chelátorů na ultra slabou fotonovou emisi indukovanou peroxidem

vodíku z buněčné kultury U266 ovlivněné amygdalinem

Sledovali jsme vliv chelátorů na UPE indukovanou H_2O_2 z buněčné kultury U266 ovlivněné amygdalinem. K buněčné kultuře U266 byl přidán amygdalin (10 mM) hodinu před měřením a následně EDTA (1 mM) nebo desferal (1 mM) těsně před měřením (Obr. 5.3.1.4.a,b). Výsledky získané pro buněčnou kulturu U266 s amygdalinem a bez něj dosahovaly srovnatelných hodnot.



Obr. 5.3.1.4.a: Vliv chelátoru EDTA na UPE indukovanou H_2O_2 (5 mM). Obrázek představuje naměřenou UPE z buněčné kultury U266 ovlivněné amygdalinem. EDTA (1 mM) byla přidána do vzorků těsně před měřením a v průběhu měření byl přidán H_2O_2 (5 mM).



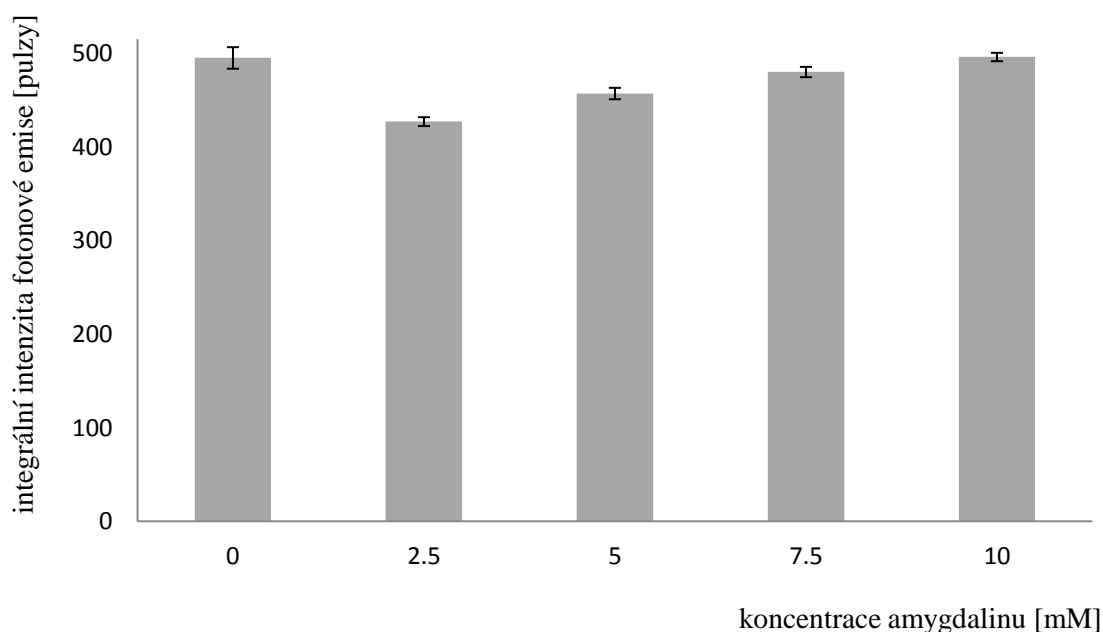
Obr. 5.3.1.4.b: Ovlivnění indukované UPE chelátorem desferalem. Desferal (1 mM) byl přidán do vzorků těsně před měřením, amygdalin hodinu před měřením. Ve 300 s měření byl ke vzorku přidán H₂O₂ (5 mM). Obrázek znázorňuje indukovanou UPE buněčné kultury U266 s amygdalinem.

5.3.2. Dlouhodobý vliv amygdalinu

Za dlouhodobý vliv amygdalinu jsme při měření pokládali 1denní působení 10 mM amygdalinu na buněčnou kulturu U266. Pomocí spontánní a indukované UPE jsme sledovali dlouhodobé působení amygdalinu.

5.3.2.1. Měření spontánní ultra slabé fotonové emise

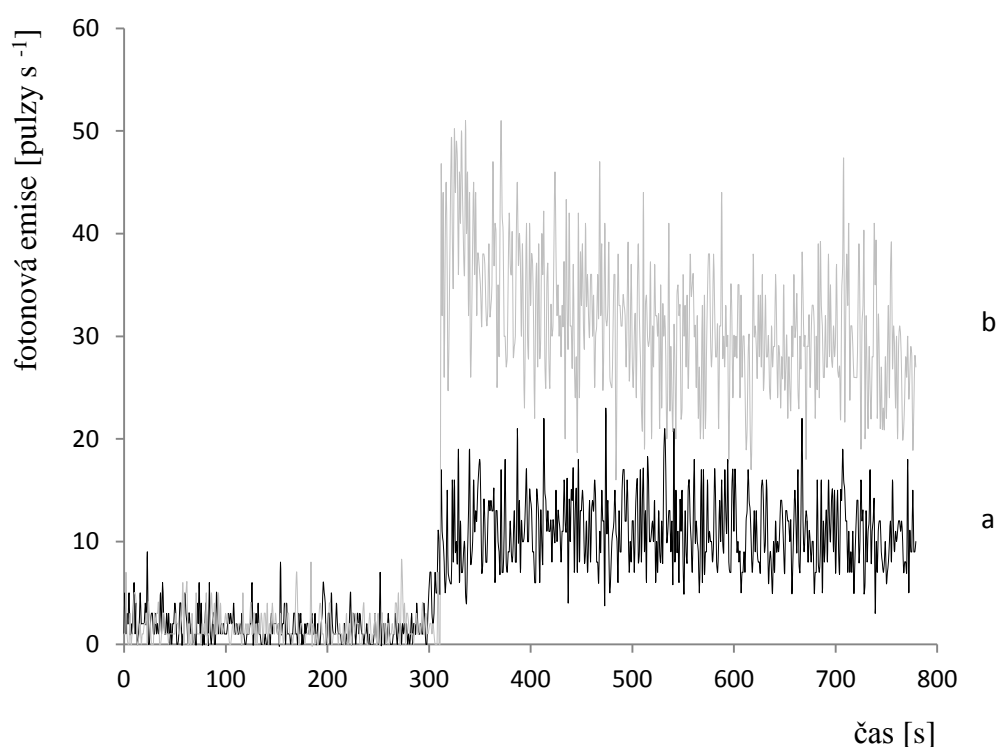
Amygdalin v koncentracích 0, 2,5; 5; 7,5 a 10 mM byl přidán k buněčné kultuře U266 den před měřením. Po dobu 300 s byla měřena spontánní UPE (Obr. 5.3.2.1). Nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi buněčnou kulturou U266 s amygdalinem a bez něj.



Obr. 5.3.2.1.: Spontánní ultra slabá fotonová emise buněčné kultury U266 s amygdalinem o koncentraci 2,5; 5; 7,5 a 10 mM. Zobrazena je integrální intenzita fotonové emise za čas 300 s. Sřední hodnota a směrodatná odchylka byla vypočítána ze 3 měření.

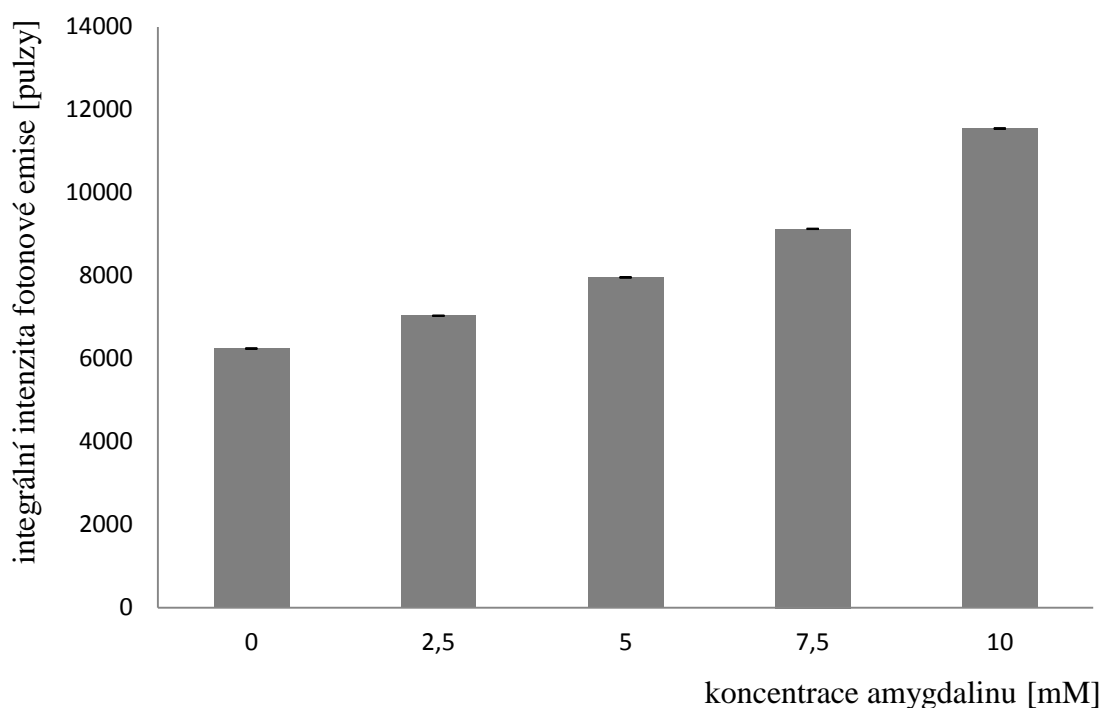
5.3.2.2. Měření ultra slabé fotonové emise indukované peroxidem vodíku

Buněčná kultura U266 byla vystavena amygdalinu po dobu jednoho dne a následně byla měřena UPE indukovaná peroxidem vodíku (5 mM) (Obr. 5.3.2.2.a.). Ve 300-sté s byl k buněčné kultuře U266 s amygdalinem a bez něj přidán H_2O_2 , což vyvolalo prudký nárůst UPE na 12 resp. 50 pulzů s^{-1} . V případě buněčné kultury U266 bez amygdalinu byl nárůst následován steady-state stavem, zatímco u vzorku ovlivněného amygdalinem byl prudký nárůst následován pomalým poklesem.



Obr. 5.3.2.2.a: Ultra slabá fotonová emise indukovaná H_2O_2 (5 mM). Buněčná kultura U266 bez amygdalinu (a) a s 10 mM amygdalinem (b). Peroxid vodíku byl přidán v čase 300 s.

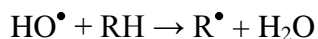
Peroxidem vodíku indukovaná UPE byla měřena pro vzorky ovlivněné 2,5; 5; 7,5 a 10 mM amygdalinem. Byla vyhodnocena integrální intenzita za dobu 300 s, počínaje časem přidání H_2O_2 (Obr. 5.3.2.2.b). Ultra slabá fotonová emise z buněčné kultury U266 vzrůstá spolu se vzrůstající koncentrací amygdalinu.



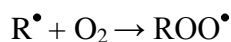
Obr.5.3.2.2.b.: Závislost ultra slabé fotonové emise buněčné kultury U266 indukované H_2O_2 (5mM) na koncentraci přidaného amygdalinu (2,5, 5, 7,5, 10 mM). Ultra slabá fotonová emise byla měřena po dobu 300 s a její integrální intenzita je zobrazena. Toto měření bylo opakováno 3x, zjistili jsme střední hodnotu a směrodatnou odchylku.

6. DISKUZE

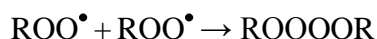
Skutečnost, že u biologických systémů dochází k ultra slabé fotonové emisi můžeme objasnit následovně. Hydroxylový radikál oxiduje biomolekuly (lipid, protein) za vzniku lipidového nebo proteinového alkylového radikálu a vody.



Lipidový nebo proteinový alkylový radikál reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu.

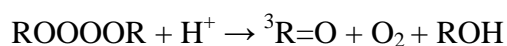


Poté spolu zreagují dva peroxylové radikály, čímž vzniká nestabilní meziprodukt tetroxid.

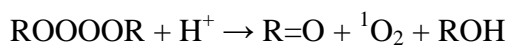


Tento tetroxid se okamžitě přemění na:

1) tripletní excitovaný karbonyl, molekulární kyslík a organický hydroxid



2) karbonyl, singletní kyslík a organický hydroxid



Vzniklý tripletní excitovaný karbonyl a singletní kyslík způsobují UPE.

Jedním z našich záměrů bylo prokázat, že existuje rozdíl mezi krátkodobým a dlouhodobým vlivem amygdalinu na rakovinné buňky a že tento fakt se projeví i na výsledcích získaných měřeními UPE. Experimenty, které byly provedeny pomocí HPLC analýzy (Chang a Zhang 2012) ukázaly, že k úplné degradaci amygdalinu na konečné 3 segmenty dochází 4 hodiny od začátku měření. Na základě tohoto zjištění je možné vysvětlit rozdílnost získaných výsledků pro krátkodobý a dlouhodobý vliv amygdalinu. Po hodině, kdy byl amygdalin přidán k buněčné kultuře U266 nemohlo podle těchto získaných dat dojít k úplnému rozložení amygdalinu na glukózu, kyanid a benzaldehyd. Na rozdíl od 1 denního působení amygdalinu, kde byl dostatečný čas na degradaci a vzniklý mandelonitril mohl v průběhu tohoto času začít účinně ničit rakovinné buňky.

Vysvětlení, proč rakovinné buňky v přítomnosti amygdalinu umírají a fibroblasty, tedy zdravé buňky nejsou touto látkou negativně ovlivněny můžeme najít v jednom z nejstarších a nejznámějších mechanismů působení amygdalinu. Aktivace amygdalinu využívá podstatného rozdílu koncentrací enzymů α -D-glukosidázy a rhodanázy. Předpokládá se, že důležitou roli v aktivaci amygdalinu hraje koncentrace α -D-glukosidázy. Tento enzym najdeme u zdravých i rakovinných buněk avšak v odlišných koncentracích. Ve zdravých buňkách je koncentrace α -D-glukosidázy velmi nízká na rozdíl od rakovinných buněk, které obsahují tento enzym ve vysokých koncentracích. Dalším rozdílem mezi zdravou a rakovinnou buňkou je odlišná koncentrace rhodanázy. U zdravých buněk je koncentrace tohoto enzymu velmi vysoká, oproti rakovinným buňkám, kde je mizivé množství rhodanázy. α -D-glukosidáza v rakovinných buňkách aktivuje amygdalin a poté dochází k hydrolýze. Produktem hydrolýzy je glukóza a mandelonitril. K dalšímu štěpení může docházet spontánně nebo pomocí sekundárních enzymů, kdy se mandelonitril rozštěpí na benzaldehyd a kyselinu kyanovodíkovou. Rhodanáza je u rakovinných buněk jen v nepatrném množství, buňky tedy nejsou chráněny před extrémně toxickým mandelonitrem a dochází ke zničení rakovinné buňky. Rhodanáza ve zdravých buňkách chytá volné molekuly kyanidu, které spojuje s thiosíranem sodným za vzniku thiokyanatanu sodného, který je neutrální. Poté je thiokyanatan sodný vyloučen z těla močí (Dorr a Paxinos 1978).

Srovnání účinnosti koupeného amygdalinu a extraktu ze sladkých mandlí je v našem případě nemožné. Zakoupený amygdalin jsme získali již v čisté formě, na rozdíl od extraktu, ve kterém se vyskytují nejrůznější příměsi a amygdalin je zde obsažen v nejasné koncentraci.

Předpokládáme, že rozdíl, který sledujeme ve výsledcích indukované UPE, mezi buněčnou kulturou U266 s amygdalinem a bez něj je způsoben rozdílnou koncentrací mrtvých buněk. Po indukci UPE H_2O_2 u buněčné kultury U266 bez amygdalinu nastane nárůst UPE, který je následován steady-state stavem. U buněčné kultury U266 bez amygdalinu můžeme předpokládat, že většina buněk je živá a tedy je schopna se dodanému H_2O_2 aktivně bránit, tento obranný mechanismus způsobí steady-state stav. Na rozdíl od buněčné kultury U266, která byla vystavena působení amygdalinu. Na základě výsledků měření (Chang a Zhang 2012) víme, že zde již došlo k rozkladu amygdalinu a vzniklý mandelonitril začal ničit rakovinné buňky. V tomto vzorku bude mnohem větší koncentrace mrtvých buněk. U těchto buněk nefunguje správně ochranný systém, který by je chránil před peroxidem vodíku. Proto dochází k prudkému nárůstu emise, který je následován pozvolným poklesem. Pro potvrzení naší hypotézy, že výsledný tvar křivky indukované UPE je způsoben větší koncentrací mrtvých buněk by bylo možné provést následující. Pro měření bychom použili přisedlou kulturu rakovinných buněk. Využili bychom skutečnosti, že buňka je přisedlá, pouze pokud je živá, zatímco odumřením buňka tuto schopnost ztrácí a volně plave v okolním médiu. Jeden vzorek s touto buněčnou kulturou bychom před měřením promyli, čímž bychom odstranili mrtvé buňky. Druhý vzorek bychom neproplachovali, vzorek by tedy obsahoval mrtvé i živé buňky. Pro oba vzorky bychom naměřili UPE, odlišná UPE by potvrdila náš předpoklad, že rozdílnost emise byla způsobena vyšší koncentrací mrtvých buněk.

Důvodem, proč byla indukovaná UPE vyšší u buněčné kultury U266 s amygdalinem by mohl být fakt, že dochází k reakci mezi H_2O_2 a amygdalinem a proto jsme ověřovali i tuto možnost. Získané výsledky ukázaly, že amygdalin s H_2O_2 nereaguje.

V neposlední řadě jsme sledovali vliv kyseliny askorbové na indukovanou UPE. Výsledek našeho měření potvrzuje skutečnost, že tento antioxidant omezuje aktivitu volných kyslíkových radikálů. Také snižuje pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádí do méně reaktivních nebo nereaktivních forem. Což vysvětluje, proč indukovaná UPE dosahovala hodnot spontánní UPE.

Při měření indukované UPE jsme zaznamenali podobný průběh křivky, který se vyskytl také v práci (Rác 2010). Z tohoto důvodu se nabízela otázka, jestli je amygdalin schopný ovlivňovat koncentraci volných kovů v buňce. K ověření jsme použili chelátory, které zamezují vzniku Fentonové reakce s volnými kovy. Na základě již

zmíněné práce (Rác 2010), která předpokládá, že přidaný H_2O_2 reaguje s kovem navázaným na protein. Dochází k Fentonové reakci, která probíhá v těsné blízkosti proteinu, okamžitě dochází k reakci hydroxylového radikálu a proteinu. Z naměřených výsledků tedy můžeme vyvodit závěr, že amygdalin nijak neovlivnil koncentraci volných kovů v buňce.

7. ZÁVĚR

V bakalářské práci jsme se snažili zcela nestranně posoudit účinnost velmi kontroverzního protinádorového přírodního produktu amygdalinu, který byl po mnoho let používán jako alternativní lék na rakovinu. Od počátku svého objevení až do současnosti, amygdalin neustále vzbuzuje u mnoha vědců nejrůznější reakce. Tato práce byla zaměřena na určení vlivu amygdalinu na buněčnou kulturu U266 pomocí ultra slabé fotonové emise. Cílem byla snaha určit možnou souvislost mezi amygdalinem a UPE. Zjistili jsme, že:

- 1) Mandlový extrakt účinně ničil rakovinné buňky, zatímco na zdravé buňky neměl vliv.
- 2) Amygdalin ve všech koncentracích (2,5; 5; 7,5; 10 mM) způsobil pokles životaschopnosti, avšak nebyla nalezena přímá korelace mezi koncentrací amygdalinu a snížením životaschopnosti buněk.
- 3) Dlouhodobé působení amygdalinu na buněčnou kulturu U266 se výrazněji projevilo i při zobrazení UPE, na rozdíl od krátkodobého vlivu amygdalinu, kde jsme nezískali žádné signifikantní výsledky.
- 4) Působení antioxidantů a chelátorů na buněčnou kulturu U266 s amygdalinem a bez amygdalinu nezpůsobilo žádné výrazné rozdíly mezi UPE vzorku ovlivněného a neovlivněného amygdalinem.

Bakalářská práce je prvním krokem k pochopení vztahu mezi UPE a amygdalinem ovlivněnou buněčnou kulturou U266. Vzhledem ke skutečnosti, že s amygdalinem je spojeno mnoho nevyjasněných faktů, přináší nám tento přírodní produkt nepřehlednou možnost dalšího bádání.

8. SEZNAM LITERATURY

Badr J.M., Tawfik M.K., Analytical and Pharmacological Investigation of Amygdalin in *Prunus armeniaca* L. Kernels, *Journal of Pharmacy Research*, 3, 2134 – 2137, 2010

Bajpai R.P., Biophoton emission in a squeezed state from a sample of *Parmelia tinctorum*, *Physics Letters*, 322, 131-136, 2004

Berenguer-Navarro V., Giner-Galván R.M., Grané-Teruel N., Arrazola-Paternina G., Chromatographic determination of cyanoglycosides prunasin and amygdalin in plant extracts using a porous graphitic carbon column, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(24), 6960–6963, 2002

Bischof M., A tribute to Fritz-Albert Popp on the occasion of his 70th birthday, *Indian Journal of Experimental Biology*, 46, 267-272, 2008

Bromley J., Hughes B.G., Leong D.C., Buckley N.A., Life-threatening interaction between complementary medicines: Cyanide toxicity following ingestion of amygdalin and vitamin C, *The Annals of Pharmacotherapy*, 39(9), 1566–1569, 2005

Cifra M., van Wijk E., van Wijk R., Endogenous electromagnetic field in biological systems: measurement of spontaneous photon emission in visible range from the human body, In *Odborné semináře - Sborník za rok 2006/2007*. Praha: Czechoslovak section IEEE, p. 40-48. ISBN 80-86582-21-3, 2007

Cifra M., van Wijk E., Koch H., Bosman S., van Wijk R., Spontaneous Ultra-Weak Photon Emission from Human Hands Is Time Dependent, *Radioengineering*, 16, 2, 2007

Cifra M., van Wijk E., van Wijk R., Temperature Induced Changes of Spontaneous Photon Emission from Human Hands, *Progress In Electromagnetics Research Symposium*, 2-6, 2008

Cohen S., Popp F.A., Biophoton emission of the human body, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 40, 187-189, 1997

Dorr R.T., Paxinos J., The Current Status of Laetrile, *Annals of Internal Medicine* 89, 389 – 397, 1978

Farhadi A., Forsyth Ch., Banan A., Shaikh M., Engen P., Fields J. Z., Keshavarzian A., Evidence for non-chemical, non-electrical intercellular signaling in intestinal epithelial cells, *Bioelectrochemistry* 71, 142–148, 2007

Hagens R., Khabiri F., Schreiner V., Wenck H., Wittern K. P., Duchstein H. J., Mei W., Non-invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission measurement, *Skin Research and Technology*, 14, 112–120, 2008

Chang J., Zhang Y., Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry*, 47, 2, 195 – 200, 2012

Cho A.Y., Shin K.J., Chung J, Oh S., A sensitive enzyme immunoassay for amygdalin in food extracts using a recombinant antibody, *Journal of Food Protection* 71(10), 2048–2052, 2008

Choi C., Woo W. M., Lee M. B., Yang J. S., Soh K.- S., Yang J. S, Yoon G., Kim M., Zaslavsky C., Chang J. J., Biophoton emission from the hands, *Journal of the Korean Physical Society*, 41, 2, 275-278, 2002

Kim L. J., Choi Ch., Lim J., You H., Sim S. B., Yom Y. K., Kim E. H., Soh K. S., Measurements of spontaneous ultraweak photon emission and delayed luminescence from human cancer tissues, *The journal of alternative and complementary medicine*, 11, 879- 884, 2005

Kim J., Lim J., Lee B., Kim Y., Lee S. K., Cheun B. S., Soh K., Spontaneous Ultra-Weak Photon Emission and Delayed Luminescence during Carbon tetrachloride-induced liver injury and repair in mouse, *Journal of Health Science*, 51, 155-160, 2005

Kim J., Kim Y., Lee Y., Kobayashi M., Tsutsumi Y., Kondo R., Lee S. K., Soh K., Spontaneous ultraweak photon emission during the growth of the cell population of cultured HeLa cell line, *Journal of Health and Science*, 53, 481-485, 2007

Laager F., Park S. H., Yang J. M., Song W., Soh K. S., Effects of exercises on biophoton emission of the wrist, *European Journal of Applied Physiology*, 102, 463-469, 2008

London – Shafir I., Shafir S., Eisikowitch D., Amygdalin in almond nectar and pollen – facts and possible roles, *Plant Systematics and Evolution*, 238, 87-95, 2003

Mathew B. G., Roy D., Weak luminiscence from the frozen-thawed root tips of *Cicer Arietinum*, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 12, 141-150, 1992

Ozawa N. T., *Undertanding the process of aging*, Marcel Dekker, 265-292, 1999

Prasad A., Pospíšil P., Two – dimensional imaging of spontaneous ultra – weak photon emission from the human skin: role of reactive oxygen species, *Journal of Biophotonics* 4, 840-849, 2011

Prasad A., Pospíšil P., Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: *in vivo* charge coupled device imaging, *Journal of Biomedical Optics* 17, 085004, 2012

Rác M., Ultra – weak photon emission from U937 cell culture, *Diplomová práce Univerzita Palackého v Olomouci*, 2010

Rastogi A., Pospíšil P., Ultra-weak photon emission as a non-invasive tool for monitoring of oxidative processes in the epidermal cells of human skin: comparative study on the dorsal and the palm side of the hand, *Skin Research and Technology*, 16, 365-370, 2010

Rastogi A., Pospíšil P., Spontaneous ultraweak photon emission imaging of oxidative metabolit processes in human skin: effect of molecular oxygen and antioxidant defense systém, *Journal of Biomedical Optics* 16, 096005, 2011

Silva MC, Terra WR, Ferreira C., Absorption of toxic beta-glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochememistry and Molecular Biology*, 143(3):367–373, 2006

Soto-Blanco B, Górníak S.L., Milk transfer of cyanide and thiocyanate: Cyanide exposure by lactation in goats, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34(2), 213–220, 2003

Soto-Blanco B, Marioka P.C., Górníak S.L., Effects of long-term low-dose cyanide administration to rats, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(1), 37–41, 2002

Trushin M.V., Distant non-chemical communication in various biological systems, *Rivista di Biologia*, 97, 409–442, 2004

Van Wijk E., van Wijk R., Multi-site recording and spectral analysis of spontaneous photon emission from human body, *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 12, 96-106, 2005

Van Wijk, R., Kobayashi M., van WIJK, E., Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a move-able photomultiplier and CCD imaging, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 83(1),69-76, 2006

Van Wijk E., van Wijk R., Spontaneous ultra-weak photon emission from human hands varies diurnally, *Biophotonics : Optics in life science* 6633, 66331J, 2007

Wagner B., Galey W.R., Kinetic analysis of hexose transport to determine the mechanism of amygdalin and prunasin absorption in the intestine, *Journal of Applied Toxicology* 23(5), 371–375, 2003

Wei Y., Xie Q., Ito Y., Preparative Separation of Axifolin - 3 – Glucoside, Hyperoside and Amygdalin from Plant Extracts by High Speed Countercurrent Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32, 1010 – 1022, 2009

Yan J., Tong S., Li J., Lou J., Preparative isolation and Purification of Amygdalin from *Prunus armeniaca* L. with High Recovery by High – Speed Countercurrent Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related technologies*, 29, 1271 – 1279, 2006

Zhou C., Qian L., Ma H., Yu X., Zhang Y., Qu W., Zhang X., Xia W., Enhancement of amygdalin activated with α -D- glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis, *Carbohydrate Polymers* 90, 516 – 523, 2012