

**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



**BIOLOGICKÁ AKTIVITA
*MACLEAYA CORDATA***

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2010

Eva Vrublová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Eva Vrublová

BIOLOGICKÁ AKTIVITA
MACLEAYA CORDATA

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitelka: Doc. RNDr. Jitka Vostálová, PhD.

Obor: Lékařská chemie a biochemie

Disertační práce byla vypracována během presenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2006 – červen 2010

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně, převzaté údaje jsou citovány. Spoluautoři publikací uváděných v disertační práci souhlasí s jejich použitím.

V Olomouci dne 9.6.2010

.....

Mgr. Eva Vrublová

Děkuji své školitelce Doc. RNDr. Jitce Vostálové, PhD. za vedení, cenné rady a lidský přístup. Také děkuji Prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. za možnost podílet se na řešení zajímavého grantového projektu a rady během studia. Děkuji všem pracovníkům z Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za přátelskou atmosféru, pomoc s řešením problémů a za spolupráci při *in vivo* experimentech.

Doc. RNDr. Jaroslavu Vičarovi, CSc. děkuji za přípravu benzo[*c*]fenanthridinových alkaloidů, Mgr. Pavlu Kosinovi, PhD. a Ing. Janu Vackovi, PhD. za pomoc při stanovení obsahu alkaloidů v biologickém materiálu. Mé poděkování náleží též pracovníkům Ústavu histologie a embryologie LF UP za mikroskopickou analýzu tkání z *in vivo* experimentů, pracovníkům z Ústavu farmakologie za pomoc při studiu farmakokinetiky dihydrosanguinarinu, Doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, PhD. z Katedry fyzikální chemie PřF UP za měření antioxidační kapacity biologického materiálu, Prof. RNDr. Bořivoji Klejdusovi, PhD. z Ústavu chemie a biochemie, Agronomické fakulty, MZLU, Brno za HPLC/MS-Q analýzy alkaloidů, Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. z Katedry biochemie, PřF UK, Praha za měření genotoxicity studovaných látek, Mgr. Janě Vrbkové z Katedry matematické analýzy a numerické matematiky, PřF UP a Mgr. Janě Zapletalové, PhD. z Ústavu lékařské biofyziky, LF UP za statistické analýzy.

V neposlední řadě děkuji Irence a Honzíkovi.

Práce byla vypracována v rámci řešení projektů MŠM 619895216 a GAČR 525/07/0871 a 303/09/H048.

SOUHRN

Macleaya cordata obsahuje benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (BA) sanguinarin (SG) a chelerythrin (CH), které jsou známy pro své antimikrobiální, antiparazitické a protizánětlivé účinky. *M. cordata* je složkou rostlinného aditiva Sangrovit, určeného do krmiv pro hospodářská zvířata. *Sanguiritrin*, alkaloidová frakce *M. cordata*, obsahuje SG a CH a je aktivní komponentou v přípravcích ústní hygieny řady Santoin. Naproti tomu jsou SG a dihydrosanguinarin (DHSG) stále uváděny v literatuře jako toxická složka oleje semen *Argemone mexicana*, vyvolávající u lidí „Epidemic dropsy“ syndrom (otoky velkých kloubů, selhaní kardiovaskulárního systému).

Téma biobezpečnosti BA, pro jejich aplikaci v humánních a veterinárních přípravcích, je stále aktuální. Proto byla zkoumána jejich toxicita, metabolické přeměny a kumulace při dlouhodobém používání.

V předkládané disertační práci byly studovány některé biologické aktivity intaktní *M. cordata*, alkaloidového extraktu *sanguiritrinu* a alkaloidů SG, CH, DHSG a dihydrochelerythrinu (DHCH). Práce byla zaměřena na studium i) toxicity SG, CH a dihydroderivátů na potkaních hepatocytech a hepatomové linii HepG2, ii) jejich vlivu na aktivitu a expresi kaspasy-3 na potkaních hepatocytech a hepatomové linii HepG2, iii) metabolických přeměn SG, CH a dihydroderivátů v lidských hepatocytech, iv) farmakokinetiky DHSG na potkanu, v) bezpečnosti DHSG, aditiva Sangrovitu a *sanguiritrinu* při dlouhodobém podávání potkanům, vi) ochranného účinku Sangrovitu a *sanguiritrinu* na experimentálně vyvolanou kolitidu u potkanů.

SG i CH vykazovaly na buněčných modelech koncentračně i časově závislou toxicitu a vedly k aktivaci kaspasy-3. Naproti tomu DHSG a DHCH byly netoxické a neměly vliv na kaspasu-3.

Bylo prokázáno, že se SG a CH redukují *in vitro/in vivo* na dihydroderiváty. Dihydroderiváty byly zpětně oxidovány pouze z 3-5 %. CH byl ve srovnání s SG redukován ve větším množství.

Dlouhodobé podávání krmiva obsahujícího DHSG potkanům vedlo ke zvýšení hmotnosti zvířat, nemělo vliv na sledované parametry hematologie, klinické biochemie a oxidačního stresu. Nebyla prokázána genotoxicita DHSG a jeho vliv na strukturu jater, tenkého střeva, ledvin, srdce, jazyku a dásní. Z farmakokinetických dat je zřejmé, že DHSG podstupuje enterohepatální cyklus a z organismu je vyloučen do 18 hodin.

Dlouhodobé podávání diety obsahující Sangrovit nebo *sanguiritrin* nemělo vliv na parametry hematologie, klinické biochemie a oxidačního stresu. Pouze skupina zvířat krmená dietou obsahující 15000 ppm Sangrovitu vykazovala statisticky významné zvýšení hladiny glutathionu a aktivity superoxiddismutasy v játrech. Genotoxicita a morfologické změny jater, tenkého střeva, ledvin, srdce a jazyka nebyly prokázány. Bylo zjištěno, že se SG a CH v organismu neakumulují a jsou vylučovány trusem, převážně jako dihydroderiváty.

Sangrovit (500 ppm), podávaný v dietě potkanům s experimentální kolitidou, vyvolanou dextranulfátem sodným, měl protektivní účinek na střevní sliznici. Ten byl prokázán snížením těžkých morfologických změn střeva o 45 %. Protizánětlivý účinek Sangrovitu se projevil poklesem hladiny cyklooxygenasy-2 a snížením aktivity myeloperoxidasy ve střevě. *Sanguiritrin* (600 ppm) a vyšší dávka Sangrovitu (15000 ppm), podávané v dietě, neměly vliv na poškození střeva vyvolané dextranulfátem sodným.

SG a CH, které jsou v *in vitro* experimentech toxické, jsou v organismu savců metabolizovány na netoxické dihydroderiváty. Dlouhodobé podávání intaktní *M. cordata* nebo *sanguiritrinu* v krmivu nevyvolávalo nežádoucí účinky na organismus potkana.

Klíčová slova: *Macleaya cordata*, benzo[c]fenanthridinové alkaloidy, sanguinarin, chelerythrin, dihydroderiváty, Sangrovit, *sanguiritrin*, *in vitro/in vivo* toxicita, biobezpečnost, dextranulfát sodný, ulcerózní kolitida

SUMMARY

SUMMARY

The benzo[*c*]phenanthridine alkaloids (BA), sanguinarine (SG) and chelerythrine (CH) contained in *Macleaya cordata* are known for their anti-microbial, anti-parasitic and anti-inflammatory activities. In animals, *M. cordata* is used in the natural feed additive Sangrovit. Sanguirithrin, the alkaloid extract of *M. cordata* contains SG and CH and is a constituent of the dentifrice, Santoin. On the other hand SG and dihydrosanguinarine (DHS) are considered the toxic agents in *Argemone mexicana* seed oil causing the „Epidemic dropsy“ syndrome.

That aside, the safety of the BAs is accepted as they are in use in human and veterinary preparations.

The present thesis focuses on the biological activity of *M. cordata*, its alkaloid extract *sanguirithrin* and the benzo[*c*]phenanthridine alkaloids SG, CH, DHS and dihydrochelerythrine (DHCH) with particular reference to i) the toxicity of SG, CH, DHS and DHCH on cell lines, ii) the effects of SG, CH, DHS and DHCH on caspase-3 activity, iii) the metabolism of SG, CH, DHS and DHCH in human hepatocytes, iv) safety assessment of DHS, Sangrovit and *sanguirithrin* in a 90-day feeding experiment, v) the pharmacokinetics of DHS and, vi) the effect of Sangrovit and *sanguirithrin* on dextran sulfate sodium induced-colitis in rats.

SG and CH showed toxicity in both tested cell lines. The toxicity was time and concentration dependent. It also concentration-dependently induced caspase-3 activity. DHS and DHCH were not toxic and they had no influence on caspase-3 activity.

When SG and CH were metabolized, their reduction to DHS and DHCH was proven. CH was reduced to a greater degree than SG. DHS and DHCH were oxidized to SG and CH in 3-5 %.

Long-term administration of DHS led to significant increase in rat body weight but it had no effect on hematological, biochemical or oxidative stress parameters. No genotoxicity, or changes in the morphology of liver, ileum, kidneys, heart, tongue and gingivae were observed. The pharmacokinetic parameters showed that DHS entered the enterohepatic circulation and was eliminated from plasma and liver over 18 hours.

The long-term administration of *sanguirithrin* and Sangrovit had no effect on hematological, biochemical or oxidative stress parameters, with the exception of the dose of 15000 ppm Sangrovit which produced a significant increase in liver glutathione level and superoxidedismutase activity. No genotoxicity, or changes in the morphology of

SUMMARY

liver, ileum, kidneys, heart and tongue were observed. Neither SG nor CH accumulated in the organism. They were eliminated in the feces as dihydroderivatives.

Sangrovit (500 ppm) administered to rats with dextran sulfate sodium induced-colitis reduced colon injury caused by dextran sulfate by 45 %. This dose also caused a reduction in cyclooxygenase-2 and myeloperoxidase activity. Neither *sanguirithrin* nor Sangrovit (15000 ppm) had any effect on the damage caused by dextran sulfate sodium.

SG and CH which both showed toxicity *in vitro* were metabolized to non-toxic dihydroderivatives in the organism. The long-term administration of these alkaloids either from the whole plant or as an extract or in pure form had no adverse effects.

Keywords: *Macleaya cordata*, benzo[*c*]phenanthridine alkaloids, sanguinarine, chelerythrine, dihydroderivatives, Sangrovit, *sanguirithrin*, *in vitro/in vivo* toxicity, safety, dextran sulfate sodium, ulcerative colitis

1. ÚVOD	1
2. BENZO[c]FENANTHRIDINOVÉ ALKALOIDY	3
2.1 VÝSKYT A DĚLENÍ BENZO[c]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	3
2.2 BIOSYNTÉZA BENZO[c]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	4
2.3 CHEMICKÉ VLASTNOSTI BENZO[c]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	9
2.4 BIOLOGICKÉ ÚČINKY BENZO[c]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	10
2.4.1 SANGUINARIN a CHELERYTHRIN	10
2.4.2 DIHYDROSANGUINARIN a DIHYDROCHELERYTHRIN	11
2.5 MACLEAYA CORDATA (WILLD.) R.BR.	12
2.5.1 Praktické využití <i>Macleaya cordata</i>	14
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	16
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	17
4.1.1 Rostlinný materiál a extrakty	17
4.1.2 Alkaloidy	17
4.1.3 Buňky	17
4.1.4 Zvířata	17
4.2 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A PŘÍSTROJE	17
4.2.1 Chemikálie	17
4.2.2 Roztoky	19
4.2.3 Ostatní materiál	21
4.2.4 Přístroje	21
4.3 STATISTICKÁ ANALÝZA	23
4.4 METODY	23
4.4.1 Studium biologické aktivity SG, CH, DHSG a DHCH – In vitro	23
4.4.1.1 Stanovení buněčného poškození	25
4.4.1.2 Účinek DHSG a DHCH na expresi a aktivitu kaspasy-3	27
4.4.1.3 Studium transformace SG, CH, DHSG a DHCH na lidských hepatocytech	30
4.4.2 Studium biologické aktivity DHSG, Sangrovitu a sanguiritrinu – In vivo	31
4.4.2.1 Vliv DHSG na vybrané fyziologické parametry potkana při dlouhodobém podávání	31
4.4.2.2 Farmakokinetika DHSG	41
4.4.2.3 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na vybrané fyziologické parametry potkana při dlouhodobém podávání	42
4.4.2.4 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na zánět tlustého střeva	43
5. VÝSLEDKY	47
5.1 BIOLOGICKÁ AKTIVITA SG, CH, DHSG A DHCH – IN VITRO	47
5.1.1 Cytotoxicita SG, CH, DHSG a DHCH	47
5.1.2 Účinek SG, CH, DHSG a DHCH na expresi a aktivitu kaspasy-3	49
5.1.2.1 Vliv SG, CH, DHSG a DHCH na expresi kaspasy-3	49
5.1.2.2 Vliv SG, CH, DHSG a DHCH na aktivitu kaspasy-3	51
5.1.3 Transformace SG, CH, DHSG a DHCH na lidských hepatocytech	53

5.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA DHSG, SANGUIRITRINU A SANGROVITU – <i>IN VIVO</i>	55
5.2.1 Vliv DHSG na vybrané fyziologické parametry u potkana při dlouhodobém podávání	55
5.2.1.1 Vliv DHSG na spotřebu krmiva, celkovou hmotnost a hmotnost orgánů	55
5.2.1.2 Vliv DHSG na parametry klinické biochemie	57
5.2.1.3 Vliv DHSG na hematologické parametry	58
5.2.1.4 Vliv DHSG na parametry oxidačního stresu a celkové množství cytochromu P450.....	59
5.2.1.5 Vliv DHSG na expresi CYP1A1/2	60
5.2.1.6 Vliv DHSG na jadernou DNA	60
5.2.1.7 Stanovení DHSG a SG v dietě a biologickém materiálu	60
5.2.1.8 Vliv DHSG na morfologii tkání.....	61
5.2.2 Farmakokinetika DHSG	62
5.2.2.1 Základní farmakokinetická data.....	62
5.2.3 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na vybrané fyziologické parametry u potkana při dlouhodobém podávání	63
5.2.3.1 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na spotřebu krmiva, celkovou hmotnost a hmotnost orgánů ...	64
5.2.3.2 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na parametry klinické biochemie	65
5.2.3.3 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na hematologické parametry.....	66
5.2.3.4 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na parametry oxidačního stresu a celkové množství cytochromu P450.....	66
5.2.3.5 Stanovení SG/DHSG a CH/DHCH v biologickém materiálu.....	67
5.2.3.6 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na morfologii tkání.....	68
5.2.4 VLIV SANGROVITU A SANGUIRITRINU NA ZÁNĚT TLUSTÉHO STŘEVA	69
5.2.4.1 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na spotřebu krmiva, celkovou hmotnost a hmotnost orgánů	69
5.2.4.2 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na hematologické parametry	71
5.2.4.3 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na parametry oxidačního stresu a markery zánětu	71
5.2.4.4 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na morfologii střeva	72
5.2.4.5 Vliv Sangrovitu a sanguiritrinu na expresi COX-2	74
6. DISKUSE	76
7. ZÁVĚRY	82
8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI	84
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	87

SEZNAM ZKRATEK

SEZNAM ZKRATEK

ALP	alkalická fosfatasa	EDTA	ethylen-diamintetraoctová kyselina
ALT	alaninaminotransferasa		
AOPP	produkty pokročilé oxidace proteinů	EGTA	ethylenglykol-O,O-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
AST	aspartátaminotransferasa		
AUC _{0→∞}	plocha pod křivkou koncentrace látky	ELISA	imunoenzymatické stanovení
BA	benzo[c]fenanthridinové alkaloidy	EMEA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
BSA	hovězí sérový albumin	FBS	fetální hovězí sérum
CDNB	1-chlor-2,4-dinitrobenzen	FDA	Agentura pro kontrolu potravin a léků
CID	kolizně indukovaná disociace	GMT	gama-glutamyltransferasa
C _{max}	maximální koncentrace	GPx	glutathionperoxidasa
COX-2	cyklooxygenasa-2	GSH	redukováný L-glutathion
CRP	C-reaktivní protein	GSHred	glutathionreduktasa
CYP1A1/2	cytochrom P450 1A1/2	GSSG	oxidováný L-glutathion
cyt P450	cytochrom P450	GST	glutathiontransferasa
diH ₂ O	deionizovaná voda	HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonová kyselina
DHBO	dihydrobenzofenanthridin oxidasa	HepG2	buněčná linie odvozená z lidských hepatomových buněk
DHCH	dihydrochelerythrin		
DHSG	dihydrosanguinarin	HPLC/MS-Q	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem-kvadrupólem
DMEM	Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem		
DMEM/F12	DMEM s přísávkem Ham F-12	HPLC/MS-IT	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem-iontovou pastí
DMSO	dimethylsulfoxid		
DSS	dextranulfát sodný	HRP	křenová peroxidasa
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina		
DTT	D,L-dithiothreitol		

SEZNAM ZKRATEK

HTAB	hexadecyltriamonium bromid	SDS	dodecylsulfát sodný
CH	chelerythrin	SG	sanguinarin
CHE	cholinesterasa	SOD	superoxiddismutasa
ISOM	Isomovo médium pro kultivaci lidských hepatocytů	TAC	celková antioxidační kapacita
LDH	laktátdehydrogenasa	TBA	thiobarbiturová kyselina
MPO	myeloperoxidasa	TBARS	látky reagující s thiobarbiturovou kyselinou
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2- yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid	TBS	izotonický Tris pufr
MS	hmotnostní spektra	TBS/T	izotonický Tris pufr s přídavkem 0,05 % Tween-20
NADH	redukovaný nikotinamidadenin- dinukleotid	TCA	trichloroctová kyselina
NADPH	redukovaný nikotinamidadenin- dinukleotid fosfát	TEMED	tetramethylethylendiamin
NBT	2,2'-di- <i>p</i> -nitrofenyl-5,5'- difenyl-3,3'-dimethoxy- 4,4'-difenylenditetrazolium chlorid (nitrotetrazoliová modř)	t_{max}	čas dosažení maximální koncentrace léčiva
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	TMB	3,3',5,5'- tetramethylbenzidin
PBS	fosfátový pufr	TNB	5-thio-2-nitrobenzoát
PenStrep	stabilizovaný roztok penicilinu G se streptomycinsulfátem	Tricin	N-[tris(hydroxymethyl)- methyl]glycin
PMS	fenazin methosulfát	Tris	tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
PVDF	polyvinyliden difluoridová membrána	UV	ultrafialová oblast spektra
SD	směrodatná odchylka	VIS	viditelná oblast spektra
		WME	Williamsovo médium E

1. ÚVOD

Rostliny jsou používány lidmi již po několik tisíciletí a staly se nedílnou součástí každodenního života. Jsou využívány jako stavební materiál, zdroj potravy a léčivých látek nebo jako okrasné rostliny, které mají příznivý vliv na psychiku. Léčivé rostliny hrají nezastupitelnou roli jak v tradiční, tak klasické medicíně. Obsahují pestrou paletu strukturně odlišných látek např. alkaloidy, fenolové látky, terpeny či glykosidy, jejichž pozitivní účinky jsou známy a využívány při léčbě různých onemocnění. U některých z těchto látek jsou známy jak jejich příznivé, tak nežádoucí účinky na organismus.

Benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (BA) se vyskytují především v čeledích *Papaveraceae*, *Fumariaceae*, *Rutaceae*, *Caprifoliaceae* a *Meliaceae* (Cordell, 1981; Šimánek, 1985). Zejména *Argemone mexicana*, *Chelidonium majus*, *Dicranostigma lactuoides*, *Eschscholtzia californica*, *Macleaya cordata*, *Sanguinaria canadensis* a některé druhy *Zanthoxylum* jsou zdrojem BA a pro své různorodé biologické účinky (antibakteriální a protizánětlivé) jsou využívány v lidovém léčitelství, v homeopatii a přípravcích léčby kožních onemocnění (McDaniel *et al.*, 2002) a zažívacích potíží (Krueger *et al.*, 2009). Ve veterinární medicíně jsou používány k léčbě kožních nádorů (Fox, 2008) a v zemědělství jako biodegradabilní pesticidy (US Environmental Protection Agency, 2002). Alkaloidový extrakt *Macleaya cordata* - *sanguiritrin*, který obsahuje hlavně sanguinarin (SG) a chelerythrin (CH), je aktivní složkou v přípravcích ústní hygieny (Food and Drug Administration, 2003). Nadzemní část *Macleaya cordata*, standardizovaná na 1,5 % SG, je součástí aditiva Sangrovit, které se přidává do krmiva hospodářských zvířat (Internetový zdroj č. 1). Naproti tomu jsou některým BA nebo rostlinným extraktům je obsahujícím připisovány nežádoucí účinky. SG a dihydrosanguinarin (DHSG) jsou považovány za toxickou složku oleje ze semen *Argemone mexicana*, který byl v Indii přidáván obchodníky do jedlého hořčičného oleje (Sharma *et al.*, 1999). Požití kontaminovaného oleje vede k oxidačnímu stresu v organismu a může vést až k smrti jedince. Různé názory se objevují také na účinnost a bezpečnost přípravků zubní hygieny obsahujících *sanguiritrin*. Byla publikována práce, která uvádí, že při dlouhodobém užívání zubní pasty obsahující BA se může vyskytnout leukoplakie (Munro *et al.*, 1999).

Z důvodů, že BA jsou většinou ve formě extraktů součástí mnoha humánních a veterinárních přípravků, měla by být podrobněji zkoumána jejich bezpečnost, vliv na metabolické dráhy, popřípadě možné interakce s biomolekulami, ale i jinými přípravky

či léčivy. Důležitá je i znalost jejich základních farmakokinetických dat jako jsou absorpce, distribuce ve tkáních, metabolické přeměny a způsob jejich vylučování z organismu. Disertační práce byla zaměřena na studie *in vitro* a *in vivo* bezpečnosti vybraných BA a preparátů, které je obsahují.

2. BENZO[c]FENANTHRIDINOVÉ ALKALOIDY

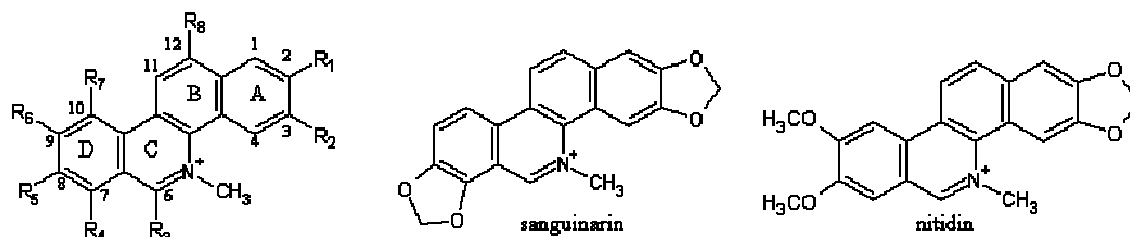
Alkaloidy jsou bazické, nízkomolekulární látky obsahující dusík, produkované 20 % krytosemenných rostlin (Wink, 2008). Rostliny je produkují jako ochranu před patogeny a býložravci. Alkaloidy se rozdělují na a) pravé alkaloidy, odvozené od aminokyselin a s dusíkem včleněným do heterocyklu, b) pseudoalkaloidy, které nejsou odvozeny od aminokyselin a c) protoalkaloidy, které nemají dusík včleněný do heterocyklu. Alkaloidy se vyskytují ve většině rostlinných čeledí (Bennett *et al.*, 1994), mají mnoho biologických účinků a řada z nich je využívána v medicíně, např. atropin jako anticholinergikum, morfin jako analgetikum a vinblastin jako cytostatikum (Wink, 2008).

2.1 VÝSKYT A DĚLENÍ BENZO[c]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

Benzo[c]fenanthridinové alkaloidy patří do velké skupiny isochinolinových alkaloidů a jsou syntetizovány převážně v rostlinných čeledích *Fumariaceae* (zemědýmovitě), *Papaveraceae* (mákovitě), *Rutaceae* (routovitě), *Caprifoliaceae* (zimolezovitě) a *Meliaceae* (strdivkovitě) (Cordell, 1981; Šimánek, 1985). Mezi nejvíce zkoumané druhy rostlin produkující tyto alkaloidy patří *Argemone mexicana*, *Chelidonium majus*, *Dicranostigma lactucoides*, *Eschscholtzia californica*, *Macleaya cordata*, *Sanguinaria canadensis* a druh *Zanthoxylum*. BA můžeme dělit do šesti skupin (Šimánek, 1985):

- a) hexahydrobenzofenanthridiny
- b) dihydrobenzofenanthridiny
- c) *N*-demethylbenzofenanthridiny
- d) kvartérní benzofenanthridiny
- e) dimerní dihydrobenzofenanthridiny
- f) sekobenzofenanthridiny

Dosud je známo 25 kvartérních BA přírodního původu (tab. 1) a několik dalších synteticky připravených (Krane *et al.*, 1984; Nakanishi *et al.*, 2000). Podle substituentů na kruhu D můžeme kvartérní BA rozdělit na alkaloidy odvozené od sanguinarinu, nitidinu a ostatní (tab. 1). Skupina odvozená od sanguinarinu má na kruhu D substituenty v polohách C7 a C8. Skupina odvozená od nitidinu má substituenty v polohách C8 a C9 (obr. 1). SG a CH jsou díky svým biologickým účinkům nejčastěji studované kvartérní BA.



Obrázek 1. Obecná struktura kvartérních BA, sanguinarinu a nitidinu.

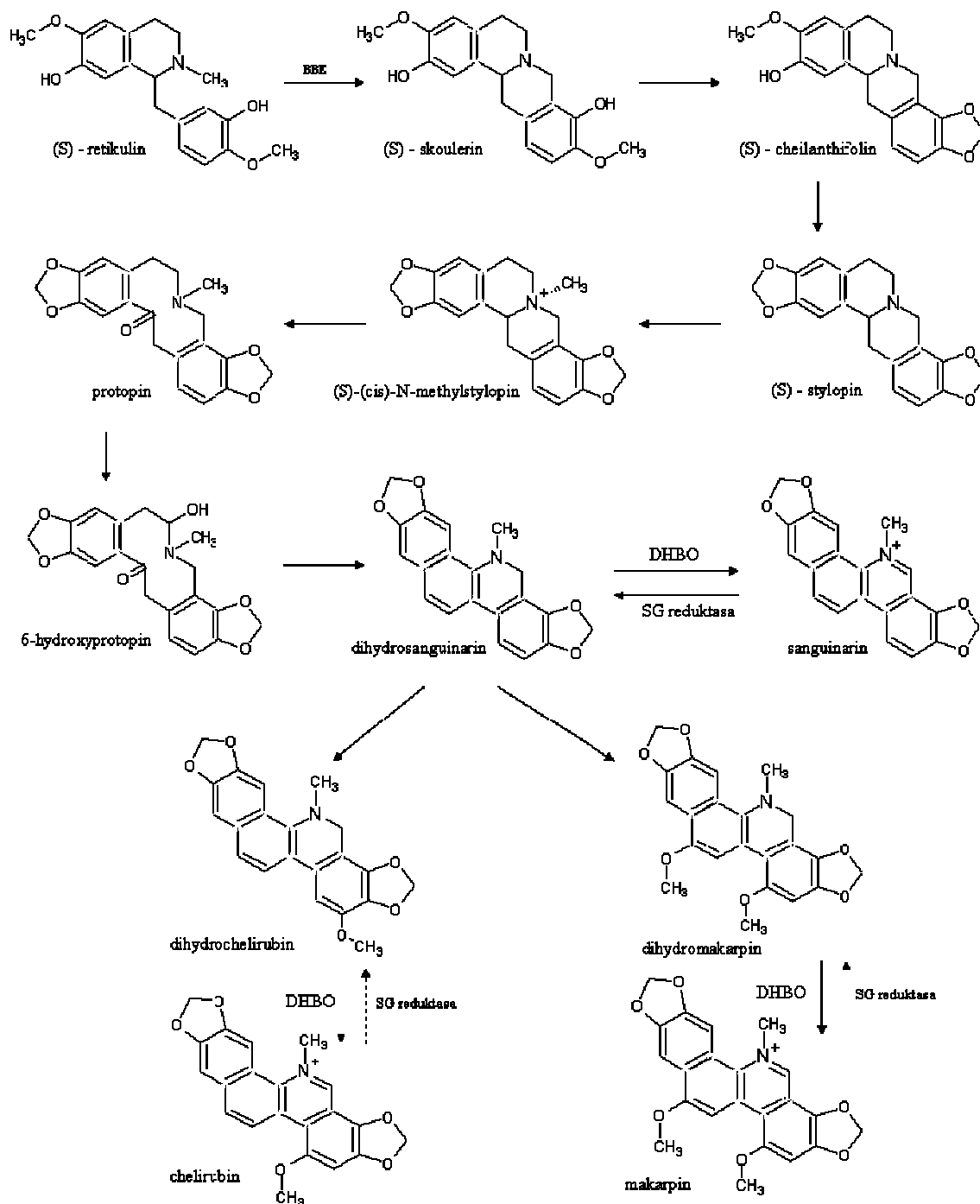
Tabulka 1. Kvartérní BA izolované z rostlin.

Skupina odvozená od nitidinu	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Literatura
Avicin	O—CH ₂ —O	H	H	H	O—CH ₂ —O	H	H	H	Šimánek, 1985
8-Demethylnitidin (terihanin)	O—CH ₂ —O	H	H	H	OH	OCH ₃	H	H	Bentley, 1998
9-Demethylnitidin (isoterihanin)	O—CH ₂ —O	H	H	H	OCH ₃	OH	H	H	Halstead <i>et al.</i> , 2006
Fagaronin	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Šimánek, 1985
6-Methylnitidin	O—CH ₂ —O	H	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Bongui <i>et al.</i> , 2005
Nitidin	O—CH ₂ —O	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Šimánek, 1985
8-Methoxynorchelerythrin	O—CH ₂ —O	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Hu <i>et al.</i> , 2006
9-Methoxychelerythrin	O—CH ₂ —O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Bentley, 1998
Skupina odvozená od sanguinarinu									
Chelerythrin	O—CH ₂ —O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	Šimánek, 1985
Chelirubin (bocconin)	O—CH ₂ —O	H	H	O—CH ₂ —O	H	OCH ₃	H	H	Šimánek, 1985
Chelilutin	O—CH ₂ —O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	Šimánek, 1985
7,8-Demethylsanguinarin	O—CH ₂ —O	H	H	OH	OH	H	H	H	Šimánek, 1985
7,8-Demethylen-7,8-dehydrosanguinarin	O—CH ₂ —O	H	H	O	O	H	H	H	Krane <i>et al.</i> , 1984
12-Ethoxychelerythrin	O—CH ₂ —O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OC ₂ H ₅	Šimánek, 1985
Fagaridin	O—CH ₂ —O	H	H	OH	OCH ₃	H	H	H	Šimánek, 1985
10-Hydroxychelerythrin	O—CH ₂ —O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	Tanahashi <i>et al.</i> , 1990
12-Hydroxychelirubin	O—CH ₂ —O	H	H	O—CH ₂ —O	H	OCH ₃	OH	H	Tanahashi <i>et al.</i> , 1990
10-Hydroxysanguinarin	O—CH ₂ —O	H	H	O—CH ₂ —O	H	OH	H	H	Tanahashi <i>et al.</i> , 1990
Isofagaridin	O—CH ₂ —O	H	H	OCH ₃	OH	H	H	H	Bentley, 1998
Makarpin	O—CH ₂ —O	H	H	O—CH ₂ —O	H	OCH ₃	OCH ₃	H	Šimánek, 1985
Punktatin	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	Šimánek, 1985
Sanguilutin	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	Šimánek, 1985
Sanguinarin	O—CH ₂ —O	H	H	O—CH ₂ —O	H	H	H	H	Šimánek, 1985
Sanguirubin	OCH ₃	OCH ₃	H	O—CH ₂ —O	H	OCH ₃	H	H	Šimánek, 1985
Ostatní									
Bucconin	O—CH ₂ —O	H	H	OCH ₃	H	O—CH ₂ —O	H	H	Phillips <i>et al.</i> , 1981

2.2 BIOSYNTÉZA BENZO[*c*]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

Biosyntéza BA vychází z aminokyseliny tyrosinu, ze které se tvoří (S)-norkoklaurin, obsahující dvě benzenová jádra. Z norkoklaurinu je dalšími čtyřmi kroky syntetizován tetrahydrobenzylisochinolin (S)-retikulin, který je výchozí sloučeninou pro syntézu isochinolinových alkaloidů. Z retikulinu se dále syntetizuje (S)-skoulerin pomocí enzymu (S)-retikulin:oxidoreduktasy – tvořící methylenový můstek (BBE). (S)-skoulerin je dále oxidován na stylopin dvěma specifickými cytochrom P450 oxidasami (S)-cheilanthifolinsynthasou a (S)-stylopinsynthasou. Na stylopin je navázána methylová

skupina z S-adenosyl-L-methioninu enzymem (S)-tetrahydroprotoberberin-N-methyltransferasou za vzniku (S)-*cis*-N-methylstylopinu. Působením methyltetrahydroprotoberberin-14-monooxygenasy vzniká protopin, který je přeměňován na nestabilní 6-hydroxyprotopin účinkem protopin-6-monooxygenasy (cytochrom P450). Ten spontánně přechází až na DHSG, který je v posledním kroku oxidován na SG pomocí dihydrobenzofenanthridinoxidasy (DHBO), jak je uvedeno na obrázku 2 (Kutchan, 1996). DHSG může být také hydroxylován v pozici 10 pomocí dihydrosanguinarin-10-hydroxylasy (cytochrom P450) na 10-hydroxydihydrosanguinarin a methylován 10-hydroxydihydrosanguinarin-10-O-methyltransferasou na dihydrochelirubin. Dihydrochelirubin může být pomocí DHBO přeměněn na chelirubin nebo na dihydromakarpin. Dihydromakarpin vzniká hydroxylací dihydrochelirubinu katalyzovanou dihydrochelirubin-12-monooxygenasou a methylací řízenou 12-hydroxydihydrochelirubin-12-O-methyltransferasou. Z něj pak oxidací pomocí DHBO vzniká makarpin (Zenk, 1994). Biosyntéza BA je spjata se signální kaskádou zahrnující protein kinasu C a vyžaduje přítomnost vápenatých iontů (Mahady *et al.*, 1998).



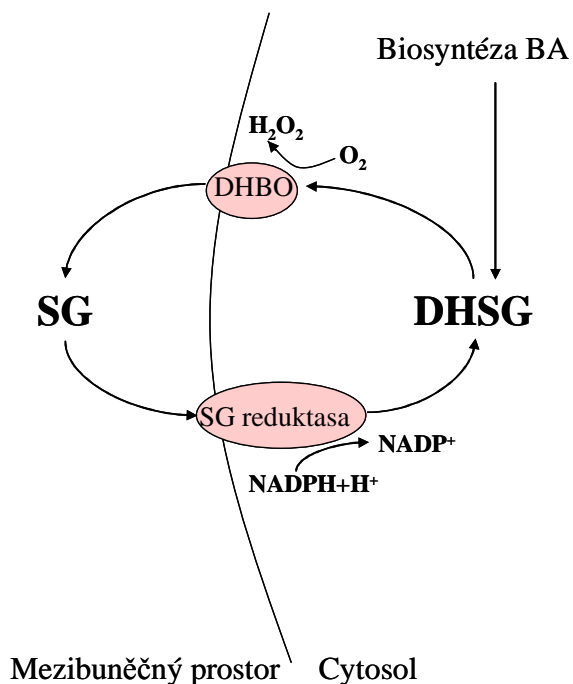
Obrázek 2. Syntéza benzo[c]fenanthridinových alkaloidů. Upraveno dle Zenk, 1994.

Biosyntéza BA probíhá v cytosolu buněk kořenů i nadzemních částí rostlin. Syntetizované BA jsou skladovány v buněčné stěně idioplastů, což jsou zvláštní buňky vyměšovacího pletiva. V idioplastech jsou skladovány ve formě váčků, které mohou fúzovat s vakuolami. V *Ch. majus* jsou BA vylučovány do mlčnic (Klein *et al.*, 2009).

Biosyntéza alkaloidů závisí částečně na přítomnosti elicitorů, látek, které stimulují obrannou reakci rostlin před lokálním poškozením, způsobeným herbivorním hmyzem nebo před infekcí plísněmi. Elicitory mohou být glykoproteiny půdních hub a bakterií (Weiss *et al.*, 2006) či rostlinami tvořený methyljasmonát. Po napadení rostlinné buňky patogeny dochází k aktivaci genů a syntéze obranných molekul, fytoalexinů, které znesnadňují pronikání patogenu. Při mechanickém poškození rostliny či osmotickém stresu se uvolní signální molekula, kyselina jasmonová (Heil *et al.*, 2002). Kyselina jasmonová je syntetizována z linolenové kyseliny pomocí lipoxygenasy. Spolu se svým methylderivátem je produkována na základě biotického (patogenní organismy, herbivoři, parazitické rostliny) a abiotického stresu (osmotický stres, mechanické poškození, nízká či vysoká teplota, vodní deficit, pH). Mimo obranných reakcí rostliny se účastní různých fyziologických pochodů v rostlině např. regulace růstu rostliny, vývoje květů, plodů a semen. Také zpomalují růst kořenů, ovlivňují stárnutí a opadávání listů a syntézu alkaloidů (Bennett *et al.*, 1994; Creelman *et al.*, 1995).

SG patří mezi fytoalexiny díky své silné antimikrobiální aktivitě, schopnosti interkalovat do DNA, inhibovat některé mitochondriální enzymy či vázat se na glutathion a tak snižovat jeho množství. SG je rostlinnými buňkami vylučován do apoplastu (mezibuněčných prostor) (obr. 3). Rostliny tak chrání vlastní buňky před poškozením reaktivním SG a zároveň jsou uložením SG na povrch rostliny chráněny před působením škůdců z vnějšku (Vogel, 2007).

BA jsou v rostlině syntetizovány do vzniku dihydroderivátů. K oxidaci dihydroderivátů BA dochází pouze v přítomnosti elicitorů (Facchini *et al.*, 1996). Syntézu BA lze experimentálně navodit glykoproteinem z kvasinek, methyljasmonátem, okyselením či mírným osmotickým stresem (Färber *et al.*, 2003). Jako další induktory syntézy BA byly popsány barbituráty (Haider *et al.*, 1997), chitin (Angelova *et al.*, 2006) nebo fytohormon abscisová kyselina, která v buněčné kultuře *Sanguinaria canadensis* zpomaluje její růst (Mahady *et al.*, 1998). Syntéza SG se také zvyšuje po přidání plísně *Botrytis* k suspenzi buněk *Papaver somniferum* (Facchini *et al.*, 1996).



Obrázek 3. Cyklický pochod SG v buňce. Upraveno dle Weiss *et al.* 2006.

Enzym katalyzující poslední krok syntézy SG je DHBO. Mimo SG katalyzuje tento enzym syntézu chelirubinu a makarpinu z jejich dihydroderivátů (obr. 2). Je tvořen třemi podjednotkami. Majoritní část má velikost 77 kDa, další dvě části mají velikost 59 kDa až 67 kDa (Arakawa *et al.*, 1992). Pro jeho funkci je nezbytná měď a pH okolo 7,0 (Ignatov *et al.*, 1997). Při reakci katalyzované DHBO je redukován kyslík za vzniku H_2O_2 (Kutchan, 1998). V rostlině vznikající H_2O_2 je pro svou toxicitu vůči patogenu využito v obranné reakci rostlin a dále se zapojuje do regulace genů, které se podílí na tvorbě dalších obranných molekul (Neill *et al.*, 2002). V buněčné suspenzi *Eschscholtzia californica* může být DHBO indukován již zmíněnými elicitory, oligosacharidy z kvasinek či chitinem. Oligosacharidy i methyljasmonát indukují enzymy prvních kroků biosyntézy BA, vedoucí k tvorbě skoulerinu a mají i schopnost indukovat DHBO, což vede k produkci SG. Methyljasmonát indukuje expresi DHBO pouze minimálně (Cho *et al.*, 2008). DHBO je inhibován kyanidem draselným, azidem sodným, dithiotreiolem či merkptoethanolem (Kutchan, 1998).

Zpětnou redukci SG na DHSG zajišťuje sanguinarinreduktasa (SG reduktasa), která byla nalezena v listech a kořenech *E. californica*. Tento enzym má velikost 29,5 kDa a je to NADH/NADPH závislý cytoplasmatický enzym s vysokou substrátovou specificitou. Mimo SG se v menší míře účastní přeměny i dalších BA (CH, chelirubin, makarpin)

(Weiss *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2009). SG reduktasa vykazuje sekvenční homologii s některými lidskými a bakteriálními enzymy, např. lidskou biliverdin-IX- β reduktasou či 17- β -hydroxysteroid dehydrogenasou (Vogel *et al.*, 2010).

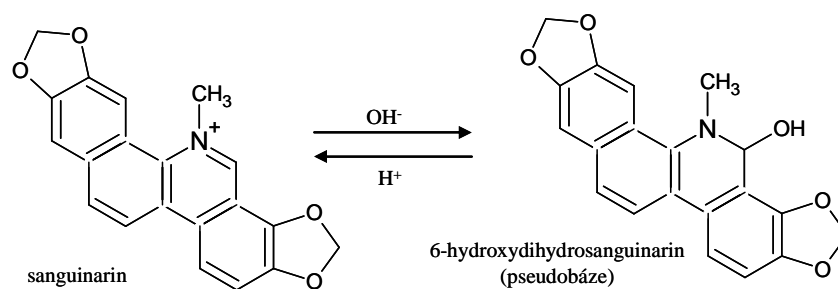
Pokud byl SG přidán do prostředí buněčné kultury *E. californica*, bylo zjištěno, že je rychle vstřebáván a během 24 h redukován na netoxický DHSG. V případě potřeby je DHSG oxidován na SG a ten je vyloučen do vnějšího prostředí. Tento vratný děj dovoluje působení SG na buněčném povrchu bez rizika poškození vlastních molekul v cytoplasmě (obr. 3) (Weiss *et al.*, 2006). Přidání SG k buněčným kulturám rostlin, které netvoří BA, vyvolalo inhibici růstu těchto rostlin a nedošlo k redukci SG na DHSG (Vogel *et al.*, 2010).

SG reduktasa dosud nebyla nalezena v živočišných buňkách. Vzhledem k tomu, že byla prokázána metabolizace SG na DHSG u potkana (Psotova *et al.*, 2006a; Deroussent *et al.*, 2010), předpokládá se existence nespecifické reduktasy. *In vitro* byla pozorována redukce SG na DHSG v přítomnosti kofaktorů NADH či NADPH (Kovář *et al.*, 1985).

Dosud není přesně znám mechanismus přenosu BA přes buněčnou membránu.

2.3 CHEMICKÉ VLASTNOSTI BENZO[*c*]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

Ve vodném prostředí, při pH menším než 7,0, se BA vyskytuje ve formě kvartérního kationtu (iminiová forma). V zásadité oblasti přechází BA adicí hydroxidového aniontu na iminiovou vazbu na neutrální formu, tzv. pseudobázi (obr. 4). Za fyziologického pH existuje rovnováha mezi oběma formami (Dostál *et al.*, 2000). Iminiová vazba reaguje s dalšími nukleofily, jako např. thiolovou skupinou, primárními aminy, halogen deriváty a dalšími, za vzniku aduktů (Walterová *et al.*, 1995; Vavrečková *et al.*, 1994). BA v iminiové formě interkalují do RNA a DNA, kde se přednostně váží na sekvenci GC (Maiti *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2006). Makarpin, chelirubin a SG je možno použít jako fluorescenční sondy pro průtokovou cytometrii (Slaninová *et al.*, 2008). CH je používán jako modelový inhibitor proteinkinas C (Herbert *et al.*, 1990; Veggeti *et al.*, 2008).

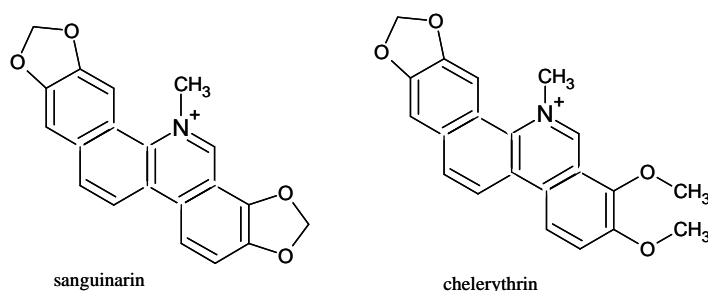


Obrázek 4. Kvartérní forma a pseudobáze sanguinarinu

2.4 BIOLOGICKÉ ÚČINKY BENZO[*c*]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

Kvartérní BA jsou známy a používány pro své antimikrobiální, protizánětlivé, antiparazitické, antihelmintické, insekticidní a další účinky (Franz, 2005; Dvořák *et al.*, 2007). Sanguirubin a sanguilutin mají antituberkulózní vlastnosti (Ishikawa *et al.*, 2001). U alkaloidu ze skupiny nitidinu, fagaroninu, byl prokázán cytostatický a antituberkulózní efekt (Larsen *et al.*, 1993). Avicin, nitidin a některé syntetické deriváty vykazují antimalarický účinek (Gakunju *et al.*, 1995; Jullian *et al.*, 2006). Nevýhodou BA nitidinového typu je jejich vysoká cytotoxicita.

2.4.1 SANGUINARIN a CHELERYTHRIN

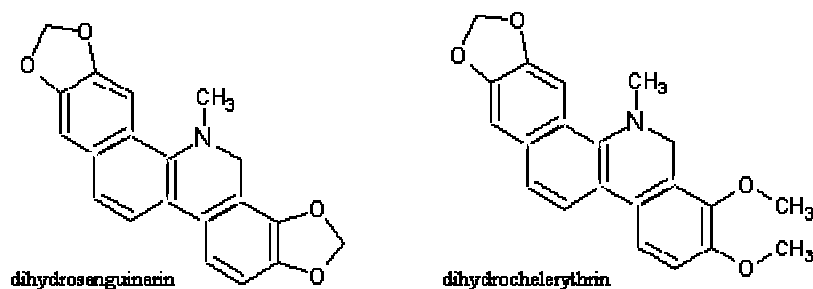


Biologické účinky SG a CH jsou shrnuty v přehledném článku (Zdařilová *et al.*, 2006). Oba alkaloidy vykazují *in vitro* genotoxicitu a inhibují aktivitu SH-enzymů. CH inhibuje Ca^{2+} ATPasu (Militante *et al.*, 1998) a dráhy ovlivněné mitogen aktivovanými proteinkinasami (Yang *et al.*, 2008). SG inhibuje Na^+/K^+ ATPasu (Seifen *et al.*, 1979; Janovska *et al.*, 2010). Protizánětlivé účinky SG i CH jsou založeny na schopnosti inhibice aktivace nukleárního faktoru κB vyvolanou tumor nekrotizujícím faktorem α (Duvoix *et al.*, 2004) a inhibice 5- a 12-lipoxygenas (Vavreckova *et al.*, 1996). CH snižuje tvorbu tromboxanu B2 (Ko *et al.*, 1990). Protinádorové účinky SG

a CH jsou připisovány schopnosti aktivovat apoptotické děje v buňkách nádoru (Weerasinghe *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2008; Mackraj, 2008). CH zastavuje buněčný cyklus v G1 fázi (Vrba *et al.*, 2008). SG potlačuje angiogenezi (Eun *et al.*, 2004) a u myší inhibuje gen survivin a tím potlačuje růst buněk nádoru prostaty (Sun *et al.*, 2010). Topická aplikace SG snižuje poškození kožních buněk, způsobené UV zářením (Dinkova-Kostova *et al.*, 2008).

Aplikace CH byla popsána při léčbě poruch centrálního nervového systému (US Patent 20090036387) či při radioterapii (US Patent 6025365), kdy CH zesiluje její účinky a tím umožňuje použít nižší dávky záření (Internetový zdroj č.2). SG a CH jsou aktivní složkou přípravku **Di-Sancor**, který je doporučován na léčbu virových onemocnění (hepatitidy, chřipky a imunodeficitních onemocnění). Mechanismus účinku je založen na schopnosti BA inhibovat reverzní transkriptasu, odpovědnou za množení viru. Přípravek **Sagra-4U**, využíván k léčbě chemorezistentních malignit, aktivuje proapoptotický protein Bax a snižuje syntézu antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Internetový zdroj č.3). To, co vyvolává pochybnosti o klinických aplikacích BA je, že Agentura pro kontrolu potravin a léků (Food and Drug Administration; FDA) a Evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicines Agency; EMEA) neuvádí žádné údaje o registraci přípravků obsahující BA.

2.4.2 DIHYDROSANGUINARIN a DIHYDROCHELERYTHRIN



DHSG a DHCH jsou prekurzory v biosyntéze kvartérních BA. Na rozdíl od svých oxidovaných forem, SG a CH, jsou biologicky neúčinné. DHSG a DHCH izolované z *Bocconia arborea* měly antibakteriální účinky vůči *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans* (Navarro *et al.*, 1999). Odlišný výsledek publikoval Kosina *et al.*, 2010. Dihydroderiváty nebyly aktivní vůči výše zmíněným kmenům bakterií. Lze to vysvětlit metodikou experimentu, kdy Navarro *et al.* testovali antibakteriální aktivitu

přímou bioautografií pomocí tenkovrstvé chromatografie. Za těchto podmínek dochází k oxidaci DHSG a DHCH na kvartérní BA. Fungicidní účinek dihydroderivátů vůči *Cladosporium herbarum* popsali Ma *et al.* Oba dihydroderiváty působily mírně antimykoticky na *Candida albicans* a její flukonazol-rezistentní kmeny. Pseudobáze SG a CH však mají výrazně silnější účinek na výše uvedené kmeny (Meng *et al.*, 2009). 6-Methoxyderivát DHSG působil antibakteriálně na methicilin rezistentní kmen *Staphylococcus aureus* (Choi *et al.*, 2009) a inhiboval proliferaci buněčné linie HepG2 aktivací kaspasy-3 (Yin *et al.*, 2005). DHSG na rozdíl od SG neinhibuje Na⁺/K⁺ ATPasu (Janovska *et al.*, 2010). V patogenních houbách *Verticillium dahliae* byl DHSG nalezen jako produkt přeměny SG (Howell *et al.*, 1972). U potkanů byl identifikován a stanoven DHSG v plasmě a játrech po orální aplikaci SG (Psotova *et al.*, 2006a).

DHCH snižoval tvorbu antigenů HBsAg (povrchový antigen viru hepatitidy B) a HBeAg (e antigen viru hepatitidy B) v hepatidou infikované hepatomové buněčné linii HepG2 (Wu *et al.*, 2007). DHCH izolovaný z *Garcinia lucida* byl účinný proti parazitickým prvokům *Trypanosoma brucei brucei* a *Leishmania donovani*, které způsobují závažná systémová onemocnění převážně na africkém kontinentu (Fotie *et al.*, 2007). V testování na myších vykazují DHCH a jeho 8-hydroxyderivát analgetické a protizánětlivé účinky srovnatelné s hydrokortisonem (Hu *et al.*, 2006). Nezodpovězenou otázkou zůstává, zda biologická aktivita dihydrobenzo[c]fenanthridinů v testovaných systémech není způsobena jejich oxidací na kvartérní kation. Přítomnost oxidoreduktas např. myeloperoxidasy, xantinoxidasy a dalších a doba inkubace by mohla vést k této přeměně.

2.5 MACLEAYA CORDATA (WILLD.) R.BR.

Synonymum: *Bocconia cordata*

Bocconia japonova

Plumme poppy

Čeleď: *Papaveraceae*



Obrázek 5. *Macleaya cordata* (Internetový zdroj č 4.)

Macleaya cordata (Okecek srdčitý) je rychle rostoucí, opadávající trvalka. Vyskytuje se převážně ve východní Asii, Japonsku a Severní Americe. Duté lodyhy jsou olistěné okrouhlými, laločnatými, nepravidelnými, modrozelenými listy s bělavým nádechem ze spodní strany. Lodyhy nesou krémově bílé až růžové květy v latách vysokých 60 cm a více. Množí se oddenky (Turner, 2009). Je pěstována zemědělsky jako zdroj alkaloidů a patří mezi oblíbené dekorativní rostliny.

M. cordata obsahuje množství BA: sanguinarin, chelerythrin, dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin, protopin, homochelidonin, α -allokryptopin, angolin, berberin, chelirubin, bocconolin, chelilutin, koptisin, kryptopin, dehydrocheilanthifolin, 6-ethoxychelerythrin, 6-ethoxysanguinarin, makarpin, oxysanguinarin, protopin-*N*-oxid (Franz, 2005), sanguidimerin, 6-methoxydihydrosanguinarin, norsanguinarin, 6-acetyldihydrochelerythrin, 6-acetyldihydrosanguinarin, chelidimerin a bocconarborin (Ye *et al.*, 2009). Ve stoncích a listech jsou v největší míře zastoupeny protopin a allokryptopin. Dalšími obsahovými látkami nadzemních částí, květů a semen jsou fenolové látky, mezi nimiž mají dominantní zastoupení *p*-hydroxybenzoová, ferulová a sinapová kyselina. Olej semen *M. cordata* obsahuje linolenovou (74,5 %), olejovou, palmitovou a stearovou kyselinu (Kosina *et al.*, 2010). Nadzemní část je sbírána ve fázi květu, sušena a drcena. Celá rostlina se používá v tradiční medicíně na léčbu abscesů, vředů či syfilis, zácpy, nadýmání, bolestí kloubů, otoků, zubního kazu, zánětu kostí a kostní dřeně, na zlepšení krevního oběhu či jako nosní analgetikum (Duke, 1975) a také pro své antiemetické, insekticidní, čistící a močopudné vlastnosti (Franz, 2005). Alkaloidový extrakt z této rostliny, obsahující SG a CH (majoritní složky) a protopin a allokryptopin (minoritní složky), se nazývá *sanguiritrin*. Blíže nespecifikovaný alkaloidový extrakt vykazoval částečný protinádorový efekt na hepatomové buněčné linii HepB3 *in vitro* a *in vivo* u myši (Pang *et al.*, 2005). Etanolvý extrakt z rostliny *Macleaya microcarpa* stejného rodu jako *M. cordata* měl silné antihelmintické účinky proti hlístu *Dactylogyrus intermedius*, kterým byly infikovány zlaté rybky (Wang *et al.*, 2010). Čtyři hlavní alkaloidy (SG, CH, protopin a allokryptopin) izolované z *M. cordata* vykazovaly silnou aktivitu proti rostlinným patogenům (Liu *et al.*, 2009). V praxi jsou v přípravcích humánní a veterinární medicíny použity buď rozemletá nadzemní část rostliny nebo alkaloidová frakce - *sanguiritrin*.

2.5.1 Praktické využití *Macleaya cordata*

Sangrovit obsahuje sušenou nadzemní část *M. cordata* standardizovanou na obsah 1,5 % SG. Sangrovit je vysoce účinné, zchutňující krmné aditivum, které příznivě působí v gastrointestinálním traktu. Zvyšuje produkci slin, účinnost trávicích enzymů, tvorbu žluči a ve střevě chrání esenciální aromatické aminokyseliny, zejména tryptofan, před enzymatickým rozkladem na biogenní aminy. Sangrovit nahrazuje používání antibiotik na podporu růstu zvířat a bylo zjištěno, že zvyšuje příjem krmiva až o 6 %. Díky svým antibakteriálním účinkům také příznivě ovlivňuje střevní mikroflóru. Jeho denní dávka je závislá na druhu zvířete a činí 20-50 ppm krmné směsi, v případech enteritidy je doporučována dávka až 70 ppm krmné směsi. Používá se jak pro drůbež, tak pro výkrmová a chovná prasata a výkrmový skot a dojnice (Internetový zdroj č. 1). Vieira *et al.* studovali vliv Sangrovitu (25 a 50 ppm) nebo kombinaci organických kyselin se Sangrovitem po dobu 42 dní na brojlerech, u kterých pozorovali zvýšení příjmu potravy i zvýšení hmotnosti (Vieira *et al.*, 2008a,b). Obdobný vliv na příjem potravy byl prokázán i na rybách, Okounovci nilském, v 60ti denní studii, kdy byl Sangrovit podáván v koncentraci 25-100 ppm. V této studii nebyl pozorován negativní efekt na zdraví ryb, na hematologické parametry a jaterní funkce (Rawling *et al.*, 2009). Sangrovit byl testován na prasatech v koncentraci 30 ppm. V průběhu studie byl monitorován váhový přírůstek a vliv na plasmatickou hladinu indolu, močoviny, cholesterolu, lysozymu a na fagocytární index leukocytů. Autoři pozorovali zvýšení hladiny lysozymu a fagocytárního indexu v prvních dnech podávání Sangrovitu (Gudev *et al.*, 2004).

Sanguiritrin je extrakt z *M. cordata* obsahující bisulfáty alkaloidů SG a CH (v závislosti na kvalitě od 40 % do 90 %), dále protopin a allokryptopin. *Sanguiritrin* má široké spektrum účinků, působí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, patogenním houbám a parazitickým prvokům (Vichkanova *et al.*, 1982). Krém s obsahem *sanguiritrinu* byl používán na léčbu infekčních zánětů kůže, vředů, hnisajících ran, dermatomykóz, periodentitid a kandidóz (Semkina *et al.* 2005). Zubní pasta, obsahující *M. cordata* spolu s *Prunella vulgaris*, je známa pro své protizánětlivé účinky u gingivitid (Adamkova *et al.*, 2004). V České republice se extrakt z *M. cordata* přidává do přípravků ústní hygieny řady **Santoin**, která je doporučována pacientům s parodontózou (Walterova *et al.*, 1995; Internetový zdroj č.5). V Rusku je ke krytí pooperačních jizev nabízen přípravek **Sanguicol**, což je porézní houbička obsahující *sanguiritrin* (Levchik *et al.*, 1999).

Ve veterinární medicíně se *sanguiritrin* používá při léčbě mastoidity krav (Faddeeva *et al.*, 1997). Bezpečnost *sanguiritrinu* byla ověřena v několika studiích, kde byl *sanguiritrin* podáván v dietě prasatům (Kosina *et al.*, 2004) nebo potkanům (Psotova *et al.*, 2006b; Zdarilova *et al.*, 2008). V žádné z těchto studií nebyly pozorovány změny základních parametrů klinické biochemie a hematologie. *Sanguiritrin* vázaný v liposomech, podávaný brojlerům, příznivě ovlivňoval kvalitu jejich masa (Druz *et al.*, 2009).

Další uplatnění našel extrakt z *M. cordata* jako fungicid v přípravku s názvem **QwelTM** (US Environmental Protection Agency, 2002). Tento přípravek má srovnatelné účinky s běžně používanými fungicidy, obsahujícími piperalin a síran měďnatý (Newman *et al.*, 1999). QwelTM dobře ulpívá na povrchu listů, je stabilní, má nízkou fototoxicitu a je biodegradabilní (US Patent 6277416) (Internetový zdroj č. 2).

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Záměrem předkládané disertační práce bylo porovnat biologické účinky Sangrovitu, *sanguiritrinu*, SG, CH a dihydroderivátů, o jejichž bezpečnosti a možných nežádoucích účincích není v současné době dostatek informací.

Konkrétní cíle:

1. *In vitro* studium biologické aktivity SG, CH, DHSG a DHCH:
 - transformace SG, CH, DHSG a DHCH na lidských hepatocytech
 - stanovení toxicity SG, CH, DHSG a DHCH na vybraných buněčných modelech a sledování jejich účinků na apoptózu
2. *In vivo* studium bezpečnosti DHSG, Sangrovitu a *sanguiritrinu*:
 - dlouhodobý vliv DHSG, Sangrovitu a *sanguiritrinu* na vybrané fyziologické parametry u potkana
 - farmakokinetika DHSG
 - vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na průběh experimentálně vyvolané kolitidy

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

4.1.1 Rostlinný materiál a extrakty

Sangrovit[®] (sušená nadzemní část *Macleaya cordata* R.Br., standardizovaná na 1,5 % SG) byl poskytnut firmou Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH (Německo). *Sanguiritrin* (2 šarže s rozdílným obsahem SG a CH) byl zakoupen od firmy CAMAS Technologies (USA).

4.1.2 Alkaloidy

Sanguinarin (SG) a chelerythrin (CH) byly izolovány ze *sanguiritrinu* sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém. Dihydrosanguinarin (DHSG) a dihydrochelerythrin (DHCH) byly připraveny redukcí SG a CH (Vičar *et al.*, 2010).

4.1.3 Buňky

Lidská hepatomová linie HepG2 (ECACC No. 85011430) byla zakoupena od ECACC (The European Collection of Cell Cultures, Velká Británie).

Primární potkaní hepatocyty byly izolovány z jater laboratorních potkanů kmene Wistar, zakoupených od firmy BioTest s.r.o. (ČR).

Lidské hepatocyty byly izolovány z jater pacientů (multiorgánových dárců) Fakultní nemocnice Olomouc. Veškerá práce s játry byla prováděna s povolením Etické komise FNOL a LF UP v Olomouci a v souladu s českou legislativou.

4.1.4 Zvířata

Pro izolaci potkaních hepatocytů a *in vivo* experimenty byli použiti potkani kmene Wistar (samci, tělesná hmotnost 180 ± 10 g) zakoupení od firmy BioTest s.r.o. či Velaz s.r.o. (ČR). Veškerá práce se zvířaty byla prováděna s povolením Etické komise LF UP v Olomouci a v souladu s českou legislativou.

4.2 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A PŘÍSTROJE

4.2.1 Chemikálie

Agarosa (typ I a typ VII), askorbová kyselina, 1-chlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB), disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), dexamethason, dimethylsulfoxid (DMSO), disodná sůl glycerolfosfátu, disodná sůl redukovaného

β -nikotinamidadenindinukleotidu (NADH), dodecylsulfát sodný (SDS), 5,5'-dithio-bis(benzoová) kyselina (DTNB), ethanolamin, ethidium bromid, ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA), fenazin methosulfát (PMS), fetální hovězí sérum (FBS), fetální telecí sérum (FCS), holo-transferin, L-glutamin, L-glutathion oxidovaný, L-glutathion redukovaný, glutathionreduktasa (GSHred), 1-heptansulfonová kyselina, N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES), hexadecyltrimethylamonium bromid (HTAB), Histopak 1077, hovězí albumin – frakce V (BSA), chloramin T, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), D-manitol, kolagenasa z *Clostridium histolyticum* typ IV o aktivitě 415 U·mg⁻¹, kumenhydroperoxid, linolová kyselina, β -naftoflavon, nitrotetrazoliová modř (NBT), vanadičnan trisodný (Na₃VO₄), stabilizovaný roztok penicilinu (10 000 U·ml⁻¹) se streptomycinem (10 mg·ml⁻¹; PenStrep), D-sorbitol, streptomycin sulfát, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), tetrasodná sůl redukovaného β -nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH), thiobarbiturová kyselina (TBA), N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (Tricin), trichloroctová kyselina (TCA), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Triton X-100, roztok trypanové modři (0,4%), 0,25% roztok trypsin-EDTA a Williamsovo médium E (WME) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). Bovinní sérum, Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM) a médium DMEM/F-12 (Ham) bylo koupeno od firmy GIBCO - Life Technologies (USA).

Dále byly použity: Western blot luminol činidlo A a činidlo B pro chemiluminiscenční detekci křenové peroxidasy (HRP), primární králičí protilátky: kaspasa-3 (rabbit polyclonal IgG caspase-3 p20, L-18), cyklooxygenasa-2 (rabbit polyclonal IgG COX-2, H-62) a primární kozí protilátky cytochrom P450 1A1/2 (goat polyclonal IgG CYP1A1, G-18) a aktin (goat polyclonal IgG actin, I-19) a sekundární kozí a králičí protilátky konjugované s křenovou peroxidasou (HRP) (goat anti-rabbit IgG-HRP a rabbit anti-goat IgG-HRP) od Santa Cruz Biotechnology (USA), inhibitor proteas CompleteTM od firmy Roche Diagnostic GmbH (Německo), roztok akrylamidu s N,N'-methylenbisakrylamidem (29:1, 40%), Tween 20, glycerol, sacharosa, 10× Tris-glycin pufr, 10× Tris-glycin-SDS pufr, dithiotreitol (DTT) a N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) byly zakoupeny od firmy Bio Basic INC (Kanada) a standard molekulové hmotnosti Kaleidoscop zakoupen od firmy BioRad, coomassie brilliantová modř G-250 a kolagenasa NB z *Clostridium histolyticum* o aktivitě 0,263 U·mg⁻¹ od firmy Serva (Německo),

fentanyl od firmy Janssen-Cilag (Belgie), medetomidin od firmy Orion-Farmos Pharm. (Finsko), diazepam od Krka, D. D. (Slovinsko), xylazin od firmy Bioveta a.s. (ČR), ketamin od firmy Spofa a.s. (ČR), inzulin ($100 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$) od Zentiva a.s. (ČR), glukagon ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) od Novo Nordisk A/S (Dánsko), amfotericin B od Bristol-Myers Squibb (USA) a penicilin G-draselná sůl ($10000 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) od Biotika (SR). Substrát a inhibitor pro fluorescenční stanovení kaspasy-3 (substrát Ac-DEVD-AMC, inhibitor Ac-DEVD-CHO) byly zakoupeny od firmy Bachem (Švýcarsko), sušené mléko Laktino (1,3 % tuku) od firmy PML Protein. Mléko. Laktóza a.s. (ČR), dextransulfát sodný od MP Biomedicals LLC (USA) a pyruvát sodný, acetonitril, methanol a octová kyselina od firmy Merck (Německo). Dusík, kyslík a helium byly zakoupeny od firmy Linde Technoplyn (ČR), bromfenolová modř, D-glukosa, chloroform, peroxid vodíku, isopropanol a ostatní chemikálie stupně čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Lach-Ner (ČR).

4.2.2 Roztoky

Všechny roztoky pro práci s buňkami byly připraveny sterilní.

Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS)

PBS: NaCl ($0,137 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($2,68 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($8,96 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1,47 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4. Pro experimenty byl zásobní roztok $10\times$ zředěn deionizovanou vodou (diH_2O).

Roztoky pro izolaci a kultivaci buněk

Primární kultura potkaních hepatocytů:

Centrifugační roztok: NaCl ($161 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), CaCl_2 ($6,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($3,09 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), HEPES ($32,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Hanksův roztok I: NaCl ($137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($5,37 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), MgSO_4 ($0,81 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($0,34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), K_2HPO_4 ($0,34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaHCO_3 ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), HEPES ($12,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4, EGTA ($0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Hanksův roztok II: NaCl ($137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($5,37 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), MgSO_4 ($0,81 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($0,34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), K_2HPO_4 ($0,34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaHCO_3 ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), HEPES ($12,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4, CaCl_2 ($4,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), kolagenasa NB

Kultivační médium: Williamsovo médium E (WME), dexamethason ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), penicilin G ($0,063 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), streptomycin sulfát ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), L-glutamin (1 %), inzulin ($0,35 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), FBS (10 %, v/v)

Bezserové médium: WME, dexamethason ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), penicilin G ($0,063 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), streptomycin sulfát ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), L-glutamin (1 %), inzulin ($0,35 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Lidské hepatocyty:

Premix: směs Premix 1 (50 ml), Premix 2 (5 ml) a Premix 3 (1 ml)

Premix 1: glukosa ($0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glutamin ($0,24 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), penicilin G ($0,016 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), streptomycin sulfát ($9,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Premix 2: pyruvát sodný ($0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), dexamethason ($1,78 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), holo-transferin ($0,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Premix 3: ethanolamin (2% v/v), inzulin ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), glukagon ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), linolová kyselina ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Promývací roztoky a média:

HEPES 1: HEPES ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glukosa (0,5 %), KCl ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), amfotericin B ($4,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), PenStrep (1%), manitol ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), sorbitol ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), glutathion redukovaný ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4

HEPES 2: HEPES ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glukosa (0,5 %), KCl ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), amfotericin B ($4,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), PenStrep (1%)

HEPES 3: HEPES ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($0,12 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), glukosa (0,5 %), KCl ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), amfotericin B ($4,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), PenStrep (1%), CaCl_2 ($7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), kolagenasa typ IV ($600 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

HEPES 4: HEPES ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glukosa (0,5 %), KCl ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), amfotericin B ($4,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), PenStrep (1%), bovinní sérum (5%, v/v)

EGTA: KCl ($5,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,44 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($0,34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), EGTA ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Tricin ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), amfotericin B ($4,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), PenStrep (1%), pH 7,2

Kultivační médium ISOM : WME (0,5 l), DMEM/F12 (Ham) médium (0,5 l), pH 7,2, askorbová kyselina (15 mg), premix (37 ml), bovinní sérum (5%, v/v)

Bezserové médium ISOM: WME (0,5 l), DMEM/F12 (Ham) médium (0,5 l), pH 7,2, askorbová kyselina (15 mg), premix (37 ml)

Buněčná linie HepG2:

Kultivační médium: Eaglovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM), PenStrep (1%), FBS (10%, v/v), L-glutamin (2 mmol·l⁻¹)

Bezserové médium: DMEM, PenStrep (1%), L-glutamin (2 mmol·l⁻¹)

4.2.3 Ostatní materiál

Elisa kit pro stanovení potkaního CRP (BioVendor, ČR)

Fotografický film *Kodak X-Omat AR Film XAR5*, fotografická vývojka *Kodak GBX*, fotografický ustalovač *Kodak GBX* (Eastman Kodak, USA)

PVDF membrána *Immun-BlotTM* (0,2 μm, Bio-Rad Laboratories, USA)

Sterilizační filtry *0,22 μm Millex[®]-GS* (Millipore, USA)

Kultivační láhve, kultivační desky, filtry a centrifugační zkumavky (Nunc, Dánsko)

Plastové injekční stříkačky (B Braun Melsungen, Německo)

Plastové mikrozukavky (Eppendorf, Německo)

Zkumavky Na₂EDTA a Heparin-Lithium (Sarstedt, Německo)

4.2.4 Přístroje

Chlazená centrifuga *Z 323 K* (Hermle Labortechnik, Německo)

Chlazená centrifuga *Mikro 22 a Rotina 38R* (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Centrifuga *Labofuge 400* (Heraeus, Německo)

Centrifuga *MiniSpin[®]* (Eppendorf, Německo)

Fotometr pro měření absorpance v 96-jamkových deskách *Sunrise Remote* (Tecan, Švýcarsko)

Hematologický analyzátor *ABX Micros ABC Vet* (Horiba, Velká Británie)

Hlubokomrazicí box *Jouan VXE 380* (Jouan, Francie)

Homogenizátor *Ultra-Turax T 25 basic* (Ika Werte, Německo)

Inkubátor *Cellstar* (Queue System, USA)

Inverzní fluorescenční mikroskop *Olympus IX 70 S8F* (Olympus, Japonsko) s kamerou *PCO VC 45-CG-23* (CCD Imaging, Německo)

Laminární box *CLF* (Schoeller Instruments, ČR)

Luminiscenční spektrometr *LS 50 B* (Perkin Elmer, USA)

Magnetická míchačka *IKA RH basic KT/C* (Ilabo, ČR)

Mikro-Dismembrator U (B Braun Melsungen, Německo)

Mikroskop *CK40 a BX40* (Olympus, Japonsko)

pH-metr *inoLab Level 1* (Schoeller Instruments, ČR) s elektrodou *SenTix41* (WTW, Německo)

Soxhletův extraktor (Fisher Scientific s.r.o., ČR)

System pro elektroforézu *Mini-Protean[®] 3 Cell* se zdrojem *PowerPac 200* nebo *PowerPac 3000* (Bio-Rad Laboratories, Německo)

Termomixer *Comfort* (Eppendorf, Německo)

Třepačka *Duomax 1030* (Heidolph, Německo)

Ultracentrifuga *OptimaTM LE-80K* (Beckmann Instruments, Německo)

Ultrazvuková sonda *UP200s* se sondou *S1* (Dr. Hielscher GmbH, Německo)

Ultrazvuková termostatová vodní lázeň *PS 01000A* (Notus-Powersonic, SR)

UV-VIS spektrofotometr *UV-2401PC* (Shimadzu, Japonsko)

Váhy *AX105 DeltaRange[®]* (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Vakuové čerpadlo *Vacuu-space* (Chromservis, ČR)

Vakuová rotační odparka s vodní lázní *Rotavapor R-3000* (Büchi, Švýcarsko)

Zařízení pro přípravu deionizované vody *Ultrapur* (Watrex, ČR)

System s jednoduchým kvadrupólem pro HPLC/MS-Q *HP 1100* (Hewlett-Packard, Německo) byl vybaven odplyňovačem *G1322A*, binární pumpou *G1312A*, autoinjektorem *G1313A*, termostatem kolony *G1316A*, termostatem kolony *G1316A*, detektorem s diodovým polem *G1315A* a kvadrupólovým HP MSD detektorem *G1946A* (Hewlett-Packard, USA).

System s iontovou pastí pro HPLC/MS-IT *Shimadzu Class VP* (Shimadzu, Japonsko) byl vybaven řídicí jednotkou *SCL-10Avp*, odplyňovačem *DGU-14A*, ventilem kontroly průtoku *FCV-10A1VP*, binární pumpou *LC-10ADvp*, autoinjektorem *SIL-10ADvp*, termostatem kolony *CTO-10ACvp*, UV detektorem *SPD-10Avp* a hmotnostním detektorem *LCQ Fleet* (Thermo Scientific, USA).

System pro cyklickou voltometrii Potenciostat/Galvanostat model 273 (EG & G Princeton Applied Research, USA) byl vybaven pracovní skleněnou uhlíkovou elektrodou *MF2012* (Bioanalytical Systems, USA), pomocnou platinovou elektrodou a referenční kalomelovou elektrodou ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{nasycený roztok KCl}$).

4.3 STATISTICKÁ ANALÝZA

Všechny experimenty *in vitro* byly provedeny v tripletech ve třech nezávislých opakováních. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Statistické vyhodnocení *in vitro* získaných dat bylo provedeno pomocí programu MS Excel 2006 (Microsoft, USA) se Studentovým *t*-testem.

Všechny hodnoty z dlouhodobých experimentů na zvířatech byly zpracovány systémem ANOVA a vyjádřeny jako průměr \pm SD ($p < 0,05$). Pro vyjádření statistické významnosti v případě růstových křivek byla použita regresní analýza. Data z experimentu vlivu Sangrovitu a *sanguiritrinu* na kolitidu byla zpracována neparametrickým Wilcoxonovým testem a vyjádřena jako průměr \pm SD ($p < 0,05$).

4.4 METODY

4.4.1 Studium biologické aktivity SG, CH, DHSG a DHCH – *In vitro*

Izolace SG, CH, DHSG a DHCH

Sanguiritrin (1 g) byl rozpuštěn v 500 ml vody, alkalizován amoniakem a extrahován etherem. Etherový odparek byl rozpuštěn v roztoku 1% kyseliny octové v benzenu a nanesen na kolonu oxidu hlinitého (150 g). SG a CH byly eluovány vzrůstající koncentrací ethanolu ve fázi 1% kyseliny octové v benzenu. Po okyselení eluátu byly z jednotlivých frakcí získány alkaloidy SG (C₂₀H₁₄ClNO₄; Mr 367,79; čistota 98,1 %) a CH (C₂₁H₁₈ClNO₄; Mr 383,83; čistota 95 %). DHSG (C₂₀H₁₅NO₄; Mr 330,29; čistota 99 %) a DHCH (C₂₁H₁₉NO₄; Mr 346,33; čistota 95 %) byly připraveny z SG (CH) redukcí NaBH₄ v methanolu (Vičar *et al.*, 2010).

Příprava zásobních roztoků alkaloidů

Zásobní roztoky alkaloidů (SG a CH: 0,2-1 mmol·l⁻¹, DHSG a DHCH: 0,125-20 mmol·l⁻¹) byly připraveny v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Kultivace hepatomové nádorové linie HepG2

Kryoprezervované buňky byly vyjmuty z hlubokomrazícího boxu, sterilně přeneseny do 5 ml kultivačního média a zcentrifugovány (1 min, 100×g, 20 °C). Pelet byl rozsuspendován v kultivačním médiu a přenesen do 25 cm² lahve. Buňky byly uchovávány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂, médium bylo měněno každých 48-72 hodin. Po dosažení monovrstvy byly buňky

opláchnuty sterilním PBS a uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu v EDTA (0,5 ml, 2-3 min, 37 °C), rozsuspendovány ve 20 ml kultivačního média a přeneseny do 75 cm² lahve a dále kultivovány. Po dosažení monovrstvy byly buňky opláchnuty sterilním PBS a uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu v EDTA (1 ml, 2-3 min, 37 °C). Následně byl buněčný pelet rozsuspendován v 10 ml kultivačního média a použit pro experimenty. Buňky byly v experimentech používány mezi 5-25 pasáží.

Příprava linie HepG2 pro experimenty

Počet buněk byl stanoven v Bürkerově komůrce na základě barvení trypanovou modří. Buňky byly naředěny příslušným kultivačním médiem a vysety na 96-jamkové a 6-jamkové desky v koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/cm². Po dosažení monovrstvy (24 h) bylo kultivační médium vyměněno za bezsérové.

Izolace a kultivace potkaních hepatocytů

Potkaní hepatocyty byly izolovány z potkaních jater modifikovanou dvoustupňovou kolagenasovou perfuzí (Moldéus *et al.*, 1978). Po intraperitoneální anestezii (2% xylazin-1,2 ml·kg⁻¹ tělesné hmotnosti a 10% ketamin-1,2 ml·kg⁻¹ tělesné hmotnosti) a následné kanylaci portální vény byla játra vyjmuta z dutiny břišní a promývána Hanksovým roztokem I (5 min) pro odstranění Ca²⁺ a následně v Hanksově roztoku II (5 min), obsahujícím kolagenasu o aktivitě 8 U·ml⁻¹. Poté byla játra přenesena do sterilní kádinky s centrifugačním roztokem (100 ml), do něj byly opatrně vytřepány uvolněné hepatocyty a následně přefiltrovány přes gázu, centrifugovány (1 min, 50×g, 20 °C) a promyty centrifugačním roztokem (3×). Po poslední centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v kultivačním médiu. Životnost a počet buněk byly stanoveny na základě barvení trypanovou modří. Hepatocyty byly vysety v kultivačním médiu na předem připravené kolagenované desky.

Kolagenování desek:

Na 96-jamkovou a 6-jamkovou desku byl aplikován roztok kolagenu I (25 μl respektive 400 μl/jamka) izolovaného z potkaních ocasů (Berry *et al.*, 1991). Otevřené desky byly umístěny pod UV lampu do laminárního boxu (20 min). Po zaschnutí (12 h) byly desky uzavřeny a připraveny k použití.

Příprava primárních kultur potkaních hepatocytů

Hepatocyty byly naředěny kultivačním médiem a vysety na kolagenem pokryté 96-jamkové a 6-jamkové desky v koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/cm². Buňky byly dále kultivovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C a v atmosféře s 5% CO₂. Po stabilizaci 4 h bylo kultivační médium vyměněno za bezsérové médium a inkubace pokračovala do dalšího dne.

Izolace lidských hepatocytů

Lidské hepatocyty byly izolovány z části jater multiorgánových dárců dvoufázovou kolagenovou perfuzí (Pichard *et al.*, 1990). Játra (cca 250 g) byla promývána roztoky v následujícím pořadí: HEPES 1, EGTA, HEPES 2, opláchnuta sterilní diH₂O a promyta roztokem HEPES 3. Poté byla játra rozmělněna v roztoku HEPES 4 a uvolněné buňky byly přefiltrovány přes sterilní gázu, centrifugovány (1 min, 50×g, 4 °C) a promyty kultivačním médiem ISOM. Následovala centrifugace (1 min, 50×g, 4 °C) a promytí kultivačním médiem (3×). Po poslední centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v bezsérovém médiu ISOM. Životnost a počet buněk byly stanoveny na základě barvení trypanovou modří.

Příprava suspenzních kultur lidských hepatocytů

Hepatocyty byly naředěny bezsérovým médiem ISOM na koncentraci buněk $4 \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹ a přeneseny do baněk na rotační odparku při teplotě vodní lázně 37 °C.

4.4.1.1 Stanovení buněčného poškození

Cytotoxicita studovaných alkaloidů

K buněčné linii HepG2 nebo kultuře potkaních hepatocytů na 96-jamkové desce byly přidány SG a CH v příslušném bezsérovém médiu ve výsledném koncentračním rozmezí $1-5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a DHSG a DHCH v koncentračním rozmezí $0,625-100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ nebo Triton X-100 (1%, v/v). Výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,5 % (v/v). Kontrolní buňky byly připraveny inkubací s příslušným objemem DMSO. Po inkubaci 1, 3, 6 a 24 h (37 °C, 5% CO₂) byl sledován vliv alkaloidů na buněčné poškození pomocí uvolněné laktátdehydrogenasy (LDH) do kultivačního média a pomocí MTT testu.

Stanovení aktivity LDH v médiu

Princip metody: redukce pyruvátu na laktát je katalyzována LDH. Úbytek NADH, který je nezbytný pro průběh reakce, je sledován spektrofotometricky při 340 nm (Bergmeyer *et al.*, 1974).

Roztoky pro stanovení aktivity LDH:

LDH pufr: Na₂HPO₄ (0,05 mol·l⁻¹), pyruvát sodný (1,22 mmol·l⁻¹), pH 7,5

Reakční směs: NADH (0,4 mmol·l⁻¹) v LDH pufru

Postup: k 50 µl média bylo přidáno 150 µl reakční směsi a ihned po promíchání byl měřen pokles absorbance po dobu 4 min. Relativní aktivita LDH (%) byla stanovena podle následujícího vztahu:

$$\text{Aktivita LDH (\%)} = \left(\frac{(A_v - A_k)}{(A_T - A_k)} \right) \cdot 100$$

Av...změna absorbance vzorku za min (buňky inkubované s alkaloidy)

Ak...změna absorbance kontroly za min (buňky inkubované s DMSO)

Ar...změna absorbance tritonu za min (buňky inkubované s Tritonem X-100)

MTT test

Princip metody: žlutá tetrazoliová sůl MTT je redukována mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk na fialové, ve vodě nerozpustné formazanové barvivo, jehož koncentrace je po rozpuštění v organickém rozpouštědle stanovena spektrofotometricky při 540 nm (Siewerts *et al.*, 1995).

Postup: buňky na 96-jamkové desce byly opláchnuty sterilním PBS a následně bylo aplikováno 100 µl čerstvého bezsérového média a 10 µl roztoku MTT (5 mg·ml⁻¹ PBS). Po inkubaci 3 h (37 °C, 5% CO₂) bylo médium odsáto a do jamek bylo aplikováno 200 µl DMSO s 1 % NH₃. Po 5 min byla měřena absorbance vzniklého modrofialového roztoku. Životnost buněk byla počítána ze vztahu:

$$\text{Životnost (\%)} = \frac{A_v}{A_s} \cdot 100$$

Av...absorbance vzorku

As...absorbance kontroly

4.4.1.2 Účinek DHSG a DHCH na expresi a aktivitu kaspasy-3

Vliv SG, CH, DHSG a DHCH na apoptotické procesy byl zkoumán na buněčných liniích HepG2 a potkaních hepatocytech fluorescenční metodou (měření aktivity kaspasy-3) a Western blot analýzou (množství aktivované kaspasy-3).

a) Exprese kaspasy-3 (Western blot)

Příprava vzorků z buněčných linií:

K buněčné linii HepG2 nebo kultuře potkaních hepatocytů kultivovaných na 6-jamkové desce byly přidány SG a CH v bezsérovém médiu ve výsledném koncentračním rozmezí 1-5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a DHSG a DHCH ve výsledném koncentračním rozmezí 10-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kontrolní buňky byly inkubovány s příslušným objemem DMSO. Po 3 a 6 hodinové inkubaci (37 °C, 5% CO₂) bylo z buněk odsáto médium a buňky byly opláchnuty ledovým PBS. Následně byly buňky seškrábnuty do 0,5 ml PBS a centrifugovány (10 min, 150×g, 4 °C). Supernatant byl odsát, pelet byl lyzován v 80 μl čerstvě připraveného lyzačního pufru (30 min, 4 °C) a zcentrifugován (10 min, 9700×g, 4 °C). V supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů (Bradford, 1976), supernatant byl zamražen na -80 °C a následně použit na stanovení exprese kaspasy-3.

Lyzační pufr:

Tris (2,0 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), EGTA (0,005 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl (0,15 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), glycerolfosfát (0,02 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na₃VO₄ (0,001 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaF (0,001 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Triton X-100 (1%, v/v), Tween 20 (0,1%, v/v), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), pH 7,5

Stanovení koncentrace proteinů:

Princip metody: barvivo (coomassie brilantová modř G-250) tvoří s proteiny ve vzorku komplex. Barvivo se vyskytuje ve třech formách: kation (470 nm, červený), neutrální molekula (650 nm, zelený) a anion (595 nm, modrý). Vazba proteinu stabilizuje aniontovou formu a vyvolává změnu zbarvení, která je měřena fotometricky při 595 nm (Bradford, 1976).

Roztoky pro stanovení koncentrace proteinů:

Coomassie brilantová modř (0,01%, m/v), ethanol (50 ml, 95%) a H₃PO₄ (100 ml, 85%) doplněny do 1000 ml vodou.

Standardní roztoky hovězího albuminu (BSA) v koncentraci 0,0625-0,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pro sestrojení kalibrační křivky.

Postup: k 10 μl standardu BSA/vzorku bylo přidáno 100 μl roztoku pro stanovení koncentrace proteinů a po promíchání byla změřena absorbance při 595 nm. Koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky BSA.

Western blot: metoda je založena na elektroforéze proteinů celkových lyzátů buněk, které jsou rozděleny v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE), přeneseny na membránu a následně detekovány pomocí specifických protilátek.

Roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blot:

Migrační pufr: Tris (0,025 mol·l⁻¹), glycin (0,192 mol·l⁻¹), SDS (0,1%, m/v), pH 8,3

Migrační gel: 7,5-15% polyakrylamidový gel

Zaostřovací gel: 10% polyakrylamidový gel

Přenosový pufr: Tris (0,025 mol·l⁻¹), glycin (0,192 mol·l⁻¹), methanol (20 %, v/v), SDS (0,1%, m/v), pH 8,3

TBS: Tris (0,1 mol·l⁻¹), NaCl (0,137 mol·l⁻¹), pH 7,6

TBS/T: Tris (0,1 mol·l⁻¹), NaCl (0,137 mol·l⁻¹), pH 7,6, Tween 20 (0,05 %, v/v)

TBS/T/mléko: Tris (0,1 mol·l⁻¹), NaCl (0,137 mol·l⁻¹), pH 7,6, Tween 20 (0,05 %, v/v), sušené mléko (5 %, m/v)

TBS/T/BSA: Tris (0,1 mol·l⁻¹), NaCl (0,137 mol·l⁻¹), pH 7,6, Tween 20 (0,05 %, v/v), BSA (5 %, m/v)

Vzorkový pufr: Tris (0,125 mol·l⁻¹), pH 6,8, SDS (4 %, m/v), glycerol (20 %, v/v), DTT (0,2 mol·l⁻¹), bromfenolová modř (0,02 %, m/v)

Postup stanovení kaspasy-3:

Vzorky byly rozmrazeny a naředěny 0,8× vzorkovým pufrem a denaturovány povařením (5 min, 95 °C). V aparatuře pro elektroforézu byl připraven 10% separační a 15% zaostřovací polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm. Do jamek zaostřovacího gelu byly aplikovány vzorky s obsahem 50 μg proteinů/standard molekulové hmotnosti. Elektroforéza byla provedena v migračním pufru při proudu 60 mA. Po rozdělení proteinů následoval jejich přenos na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu v tankovém uspořádání v přenosovém pufru (60 min, 400 mA, 4 °C).

Po ukončení přenosu proteinů byla membrána 3× promyta (5 min, TBS) pro odstranění přenosového pufru, blokována (1 h, TBS/T/mléko, 20 °C) a inkubována s primární králičí protilátkou (kaspasa-3, TBS/T/mléko, 1:1000, 4 °C, přes noc), 3× promyta (10 min, TBS/T) a následně inkubována se sekundární kozí protilátkou značenou křenovou peroxidasou (goat anti-rabbit IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:20 000, 2 h, 20 °C). Poté byla

membrána 3× promyta (10 min, TBS/T) a proteiny následně detekovány pomocí chemiluminiscenčního systému Immun-StarTM a fotografického filmu.

Postup stanovení aktinu:

Postup byl stejný jako u stanovení kaspasy-3 s tím rozdílem, že byla použita primární kozí protilátka k detekci aktinu (goat polyclonal IgG actin, I-19, TBS/T/BSA, 1:1000, 4 °C, přes noc) a následně sekundární králičí protilátka značená křenovou peroxidasou (rabbit anti-goat IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:10 000, 2 h, 20 °C). Proteiny byly detekovány stejným způsobem jako u stanovení kaspasy-3.

b) Aktivita kaspasy-3

Princip stanovení aktivity kaspasy-3: aktivní kaspasa je schopná štěpit fluorochromy (deriváty kumarinu), kterými je značen peptid (Asp-Glu-Val-Asp, DEVD). Množství odštěpeného fluorochromu je měřeno fluorescenčně (Ochu *et al.*, 1998).

Roztoky pro stanovení aktivity kaspasy-3:

Lyzační pufr: HEPES (0,05 mol·l⁻¹), pH 7,4, Triton X-100 (0,5%, v/v), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), DTT (0,005 mol·l⁻¹)

Reakční pufr: HEPES (0,02 mol·l⁻¹), pH 7,1, EDTA (0,002 mol·l⁻¹), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), DTT (0,005 mol·l⁻¹)

Zásobní roztok substrátu pro kaspasu-3: Ac-DEVD-AMC v DMSO (0,01 mol·l⁻¹)

Zásobní roztok inhibitoru pro kaspasu-3: Ac-DEVD-CHO v DMSO (0,002 mol·l⁻¹)

Reakční směs se substrátem: 995 µl reakčního pufru, 5 µl substrátu Ac-DEVD-AMC (0,05 mmol·l⁻¹)

Reakční směs se substrátem a inhibitorem: 995 µl reakčního pufru, 5 µl substrátu Ac-DEVD-AMC (0,05 mol·l⁻¹), 0,5 µl inhibitoru Ac-DEVD-CHO (0,001 mmol·l⁻¹)

Příprava vzorků:

K buněčné linii HepG2 nebo kultuře potkaních hepatocytů na 6-jamkové desce byly přidány SG a CH v koncentračním rozmezí 1-5 µmol·l⁻¹ a DHSG a DHCH v koncentračním rozmezí 10-50 µmol·l⁻¹. Kontrolní buňky byly inkubovány s příslušným objemem DMSO. Po inkubaci 3 a 6 h (37 °C, 5% CO₂) bylo z buněk odsáto médium, buňky byly opláchnuty ledovým PBS, seškrábány do 0,5 ml PBS a centrifugovány (10 min, 150×g, 4 °C). Supernatant byl odsát a pelet byl lyzován v 50 µl lyzačního pufru (15 min, 4 °C) a znovu centrifugován (20 min, 11390×g, 4 °C). V supernatantu byla

stanovena koncentrace proteinů (Bradford, 1976), supernatant byl zamražen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně použit na stanovení aktivity kaspasy-3.

Postup: supernatant byl rozmražen (4 μl) a smíchán s 80 μl reakční směsi se substrátem nebo reakční směsi se substrátem a inhibitorem. Po inkubaci (1 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) bylo 20 μl odebráno, smícháno se 180 μl dH_2O a byla změřena fluorescence při $\lambda_{\text{EX } 380}$; $\lambda_{\text{EM } 450}$ nm na luminiscenčním spektrometru *LS 50 B*. Aktivita kaspasy-3 byla vyhodnocena podle následujícího vztahu:

$$\text{Aktivita kaspasy-3 (IU}\cdot\text{g}^{-1}) = \left(\frac{(F_{V+S} - F_{V+I})}{(F_{K+S} - F_{K+I})} / c \right) \cdot 100$$

F_{V+S} ...fluorescence vzorku se substrátem (buňky inkubované s alkaloidy)

F_{V+I} ...fluorescence vzorku se substrátem a inhibitorem (buňky inkubované s alkaloidy)

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

F_{K+I} ...fluorescence kontroly se substrátem a inhibitorem (buňky inkubované s DMSO)

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

4.4.1.3 Studium transformace SG, CH, DHSG a DHCH na lidských hepatocytech

Transformace (metabolizace) byla prováděna na primárních kulturách lidských hepatocytů a následná analýza pomocí metody HPLC/MS-IT.

Příprava vzorků pro HPLC/MS-IT analýzu:

Suspenze hepatocytů byly inkubovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na rotační odparce po dobu 1 a 2 h s SG a CH ($5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DHSG a DHCH ($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Po uplynutí doby inkubace byl odebrán 1 ml suspenze buněk a centrifugován (10 min, $150\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Médium bylo odebráno na analýzu, buňky byly propláchnuty PBS a centrifugovány (10 min, $150\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

K 0,5 ml média bylo přidáno stejné množství 1 % HCl v methanolu, směs byla vortexována a centrifugována (10 min, $15000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a supernatant byl nanesen na kolonu. K buňkám bylo přidáno 0,2 ml 1 % HCl v methanolu, buňky byly sonikovány 10 s, vortexovány a centrifugovány (2 min, $15000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl nanesen na kolonu.

HPLC/MS-IT analýza:

HPLC/MS-IT analýza byla prováděna na chromatografickém systému *Shimadzu Class VP* (Shimadzu, Japonsko) s chromatografickou kolonou *Eclipse XDB-CN* 150 mm \times 2,1 mm, 5 μm (Agilent Technologies, USA), v mobilní fázi 10% metanol (v/v)/1% octová kyselina v gradientu se 100 % methanolem (B). Program gradientu:

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 $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, nastříkované množství vzorku bylo $10 \mu\text{l}$. Teplota nástřiku byla $10 \text{ }^\circ\text{C}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Kapalinový chromatograf byl on-line napojen na hmotnostní spektrometr LCQ Fleet, vybavený iontovou pastí. Vzorky byly ionizovány elektrosprejem v pozitivním modu s následujícími parametry: napětí zdroje $4,75 \text{ kV}$, teplota kapiláry $375 \text{ }^\circ\text{C}$, napětí na kapiláře 30 V . Dusík byl použit jako sušící plyn a helium jako kolizní plyn. Průtok sušících plynů (sheath, auxiliary a sweep) byl $50, 5$ a 1 relativních jednotek. Sledována byla intenzita MS^2 fragmentů s použitím CID (kolizně indukovaná

disociace; aplikována byla energie o velikosti 35% maximální intenzity) u vybraných MS/MS přechodů (SG $332,17 \rightarrow 304,17$, CH $348,17 \rightarrow 333,17$, DHSG $334,17 \rightarrow 319,17$ a DHCH $350,25 \rightarrow 335,17 \text{ m/z}$).

4.4.2 Studium biologické aktivity DHSG, Sangrovitu a *sanguiritrinu* – *In vivo*

4.4.2.1 Vliv DHSG na vybrané fyziologické parametry potkana při dlouhodobém podávání

4.4.2.1.1 Průběh experimentu

Potkani kmene Wistar (18 samců, tělesná hmotnost $240 \pm 8 \text{ g}$) byli chováni za standardních podmínek v boxech po 2 zvířatech s volným přístupem k potravě a vodě, při pokojové teplotě $23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ s 12 hodinovým cyklem světlo/tma. Potkani byli rozděleni do 3 skupin po 6ti zvířatech. Skupina 1 (kontrolní) byla krmena 90 dní standardní dietou, skupina 2 dietou obsahující 100 mg DHSG/kg krmiva a skupina 3 dietou obsahující 500 ppm DHSG . V průběhu experimentu byla sledována spotřeba krmiva, hmotnost zvířat ($2 \times$ týdně) a sbírán trus. Obsah SG a DHSG v krmivu a trusu byl monitorován metodou HPLC/MS-Q.

Experiment byl ukončen po 90 dnech odběrem krve a orgánů v celkové anestezii (fentanyl- $0,04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti; medetomidin- $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti; diazepam- $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti). Krev byla odebrána z vnitřní hrdelní žíly do zkumavky s heparinem (Sarstedt, Německo) a z aortálního rozvětvení do zkumavky s Na_2EDTA (Sarstedt, Německo). Část krve byla odebrána pro analýzu poškození DNA. Zbytek krve byl centrifugován (10 min , $420 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), získaná plasma byla rozdělena na alikvoty, které byly uchovány při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Erytrocyty (buněčná část krve) byly promyty PBS, rozděleny na alikvoty a zamraženy na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Plasma byla použita pro stanovení

parametrů klinické biochemie (sodík, draslík, chloridy, bilirubin, cholesterol, močovina, kreatinin, alaninaminotransferasa (ALT), aspartátaminotransferasa (AST), gama-glutamyltransferasa (GMT), alkalická fosfatasa (ALP), cholinesterasa (CHE), celkový protein a prealbumin), pro stanovení obsahu alkaloidů, celkové antioxidační kapacity (TAC), hladiny celkových SH-skupin, produktů pokročilé oxidace proteinů (AOPP) a produktů lipoperoxidačního poškození (TBARS). Erytrocyty byly použity na stanovení hladiny glutathionu (GSH), TBARS, enzymové aktivity katalasy, glutathionperoxidasy (GPx) a superoxiddismutasy (SOD). Játra byla opláchnuta vychlazeným PBS, zvážena a část byla použita pro stanovení parametrů oxidačního stresu – TAC, GSH, TBARS, aktivity SOD, GPx, katalasy, celkového množství cytochromu P450 (cyt P450) a pro analýzu poškození DNA. Játra, ledviny, srdce, mozek a brzlík byly zváženy; část jater, ledvin, svalů, srdce, mozku, jazyka a tenkého střeva byla odebrána pro HPLC/MS-Q analýzu a část jater, ledvin, srdce, tenkého střeva, jazyka a dásní byla odebrána pro histologickou analýzu.

4.4.2.1.2 Stanovení obsahu alkaloidů (SG, DHSG) v dietě a biologických vzorcích

Obsah alkaloidů v dietě, trusu, moči, plasmě a vybraných orgánech byl stanoven pomocí metody HPLC/MS-Q.

Příprava vzorků:

Dieta (5 g) byla extrahována 12 h 1 % HCl v methanolu (350 ml) v Soxhletově extraktoru a odpařena na vakuové odparce při 47 °C na objem cca 20 ml. Objem byl doplněn okyseleným methanolem na 40 ml. Ředěním (2×) mobilní fázi B byl připraven vzorek pro HPLC/MS-Q analýzu. Naředěný vzorek byl centrifugován (2 min, 12000×g, 20 °C) a supernatant (10 µl) byl aplikován na HPLC kolonu. Vzorky moči a plasmy (0,4 ml) byly smíchány s methanolem (0,6 ml respektive 0,8 ml), vortexovány a centrifugovány (15 min, 12000×g, 4 °C). Supernatant byl podroben HPLC/MS-Q analýze. Vzorky tkání a trusu byly homogenizovány v 1-heptansulfonové kyselině (0,01 mol·l⁻¹) v 95% acetonitrilu. Homogenát byl vortexován a centrifugován (15 min, 9700×g, 4 °C) a supernatant byl následně odpařen při 47 °C v dusíkové atmosféře. Odparek byl rozpuštěn v methanolu, filtrován přes 0,45 µm teflonový filtr a podroben HPLC/MS-Q analýze.

Mobilní fáze pro HPLC/MS-Q analýzu:

Mobilní fáze A: mravenčan amonný (0,01 mol·l⁻¹); mobilní fáze B: methanol

HPLC/MS-Q analýza:

HPLC/MS-Q analýza byla provedena na chromatografickém systému *HP 1100* (Hewlett-Packard, Německo) s chromatografickou kolonou *Zorbax SB-CN* (Agilent, USA). Analýza byla prováděna na Ústavu chemie a biochemie, Agronomické fakultě, MZLU Brno.

4.4.2.1.3 Biochemická analýza

Biochemické parametry krevní plasmy: sodík, draslík, chloridy, bilirubin, cholesterol, močovina, kreatinin, ALT, AST, GMT, ALP, CHE, celkový protein a prealbumin byly stanoveny na analyzátoru *Ilab 600* (Instrumentation Laboratory, Španělsko) v Oddělení laboratorní medicíny v Nemocnici Šternberk.

4.4.2.1.4 Parametry oxidačního stresu

Příprava vzorků:

- a) Játra – po rozmražení byl připraven 10% homogenát ve vychlazeném PBS
- b) Erytrocyty – po rozmražení byl připraven 1% a 10% lyzát ve vychlazeném PBS
- c) Plasma byla použita ke stanovení přímo

Stanovení množství proteinů ve vzorcích:

Množství proteinů v plasmě a játrech bylo stanoveno podle kapitoly 4.4.2.1.a.

Stanovení produktů lipoperoxidace

Princip metody: kyselina thiobarbiturová (TBA) reaguje s produkty peroxidace polynenasycených mastných kyselin, zejména růžového malondialdehydu, za tvorby komplexu, jehož množství je stanoveno fotometricky při 535 nm (Buege *et al.*, 1978). Látky reagující s TBA se obecně označují jako „thiobarbituric acid reactivities substances“ (TBARS).

Reakční směs pro stanovení TBARS:

Kyselina trichloroctová (TCA, $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), TBA ($0,918 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Postup: 50 μl plasmy/250 μl jaterního homogenátu/100 μl 10% lyzátu erytrocytů bylo smícháno s 1000 μl reakční směsi a zahřáto (30 min, $90 \text{ }^\circ\text{C}$). Po ochlazení a centrifugaci (10 min, $600\times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) byla měřena absorbance. Slepý vzorek byl připraven stejným postupem, ale bez zahřívání. Množství produktů lipoperoxidace (TBARS) bylo vypočítáno podle následujícího vztahu:

$$\text{Produkty lipoperoxidace (mol}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{(A_{vz} - A_{sl})}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{\u0159ed\u011bn\u00ed}$$

A_{vz} ...absorbance vzorku

A_{sl} ...absorbance slep\u00e9ho nepova\u017een\u00e9ho vzorku

ε ...mol\u00e1rn\u00ed absorb\u011bn\u00ed koeficient ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$)

L ...d\u00e9lka optick\u00e9 dr\u00e1hy (cm)

c ...koncentrace b\u00edlkovin ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

Stanoven\u00ed hladiny redukovan\u00e9ho glutathionu

Princip metody: množství glutathionu (GSH) je stanoveno reakc\u00ed 5,5'-dithiobis(benzoov\u00e9) kyseliny (DTNB) s GSH v alkalick\u00e9m prost\u0159ed\u00ed, kde vznik\u00e1 \u017elut\u00fd 5-thio-2-nitrobenzo\u00e1t (TNB), jeho\u017e absorbance je m\u011b\u0159ena p\u0159i 412 nm (Carlberg *et al.*, 1985).

Roztoky pro stanoven\u00ed GSH:

GSH pufr: Tris ($0,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), EDTA ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 8,9

Reak\u010dn\u00ed sm\u011bs: DTNB ($3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v GSH pufru

Postup: 400 μl 10% lyz\u00e1tu erytrocyt\u016f/400 μl jatern\u00edho homogen\u00e1tu bylo p\u0159id\u00e1no ke 100 μl 25% TCA, prom\u00edch\u00e1no na vortexu a centrifugov\u00e1no (15 min, $4310\times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Slep\u00fd vzorek obsahoval m\u00edsto p\u0159\u00edslu\u0161n\u00e9ho vzorku 5% TCA. Ke 20 μl supernatantu bylo p\u0159id\u00e1no 200 μl reak\u010dn\u00ed sm\u011bsi. Po 4 min byla zm\u011b\u0159ena absorbance. Mno\u017estv\u00ed GSH bylo vypo\u010dit\u00e1no podle n\u00e1sleduj\u00edc\u00edho vztahu:

$$\text{Hladina GSH (mol}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{(A_a - A_b)}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{\u0159ed\u011bn\u00ed}$$

A_a ...absorbance vzorku

A_b ...absorbance slep\u00e9ho vzorku

ε ...mol\u00e1rn\u00ed absorb\u011bn\u00ed koeficient ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$)

L ...d\u00e9lka optick\u00e9 dr\u00e1hy (cm)

c ...koncentrace b\u00edlkovin ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

Hladina celkov\u00fdch SH-skupin

Princip metody: stanoven\u00ed celkov\u00fdch SH-skupin vyu\u017e\u00edv\u00e1 stejn\u00fd princip jako stanoven\u00ed GSH (viz v\u00fd\u0161e) (Hu *et al.*, 1994).

Postup: 100 μl plasmy bylo sm\u00edch\u00e1no s 300 μl GSH pufru, 20 μl DTNB ($4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 1580 μl methanolu a v\u0161e bylo prom\u00edch\u00e1no na vortexu. Po inkubaci (20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) byl

vzorek centrifugován (10 min, 600×g, 4 °C) a poté změřena absorbance supernatantu. Hladina celkových SH-skupin byla vypočítána podle následujícího vztahu:

$$\text{Hladina SH-skupin (mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{)} = \frac{(Avz - Aa - Ab)}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

Avz...absorbance vzorku

Aa...absorbance vzorku obsahujícího vše kromě DTNB

Ab...absorbance vzorku obsahujícího vše kromě plasmy

ε ...molární absorbní koeficient ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$)

L...délka optické dráhy (cm)

c...koncentrace bílkovin ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

Aktivita superoxiddismutasy (SOD)

Princip metody: aktivita SOD byla stanovena nepřímo v systému nitrotetrazoliová modř (NBT)/NADPH/fenazin methosulfát (PMS). Reakční směs produkuje superoxidový anion, který reaguje s NBT za vzniku modrého produktu, jehož množství je stanoveno fotometricky při 560 nm. Vychytávání generovaného superoxidového aniontu působením SOD je nepřímo úměrné intenzitě vzniklého produktu (Ewing *et al.*, 1995).

Roztoky pro stanovení SOD:

SOD pufr: KH_2PO_4 ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), EDTA ($0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4

Reakční směs: NBT ($62 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NADH ($98 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v SOD pufru

PMS: PMS ($33 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v SOD pufru

Extrakce jaterního homogenátu: ke 30 mg KH_2PO_4 , 250 μl chloroformu a 900 μl vody bylo přidáno 100 μl jaterního homogenátu. Směs byla vortexována a centrifugována (30 min, 1080×g, 4 °C). Slepý extrakt obsahoval místo příslušného biologického vzorku 100 μl PBS. Po extrakci byly vzorky 10× ředěny PBS.

Postup: k 25 μl extraktu/1% lyzátu erytrocytů bylo přidáno 200 μl reakční směsi. Reakce byla spuštěna 25 μl PMS. Po 5 min byla měřena absorbance. Aktivita SOD byla vyjádřena v $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, což je množství enzymu, které je potřebné k 50% inhibici rychlosti redukce NBT. Aktivita byla vypočítána podle následujícího vztahu:

$$\text{Aktivita SOD (U}\cdot\text{g}^{-1}\text{)} = \frac{(Aa - Ab) - (Avz - Ab)}{(Aa - Ab)} \cdot 2 \cdot \text{ředění}$$

Avz...absorbance vzorku

Aa...absorbance slepého vzorku (25 μl PMS, 25 μl pufru a 200 μl reakční směsi)

Ab...absorbance pozadí (50 μl pufru a 200 μl reakční směsi)

Aktivita glutathionperoxidasy (GPx)

Princip metody: ke stanovení aktivity GPx byl využit systém GSH/glutathionreduktasa/NADPH/kumenhydroperoxid. V reakci katalyzované GPx je GSH oxidován kumenhydroperoxidem a vznikající oxidovaný glutathion (GSSG) je zpětně redukován glutathionreduktasou (GSHred) za spotřeby NADPH, jehož pokles je monitorován při 340 nm (Tappel *et al.*, 1978).

Roztoky pro stanovení GPx:

GPx pufr: Tris (50 mmol·l⁻¹), EDTA (0,1 mmol·l⁻¹), pH 7,6

Reakční směs: GSH (0,3875 mmol·l⁻¹), NADPH (0,186 mmol·l⁻¹), GSHred (1,55 U·ml⁻¹) v GPx pufru, kumenhydroperoxid v diH₂O (0,1 %, m/v)

Postup: ke 20 μl 1% lyzátu erytrocytů/jaterního homogenátu bylo přidáno 200 μl reakční směsi. Po inkubaci (5 min, 37 °C) bylo přidáno 10 μl kumenhydroperoxidu a byla měřena změna absorbance za 1 min. Aktivita GPx byla vypočítána podle následujícího vztahu:

$$\text{Aktivita GPx (mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\Delta A_{340}}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

ΔA_{340} ...změna absorbance za minutu

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

L...délka optické dráhy (cm)

c...koncentrace bílkovin (g·l⁻¹)

Aktivita katalasy

Princip metody: katalasa katalyzuje přeměnu peroxidu na vodu a jeho úbytek je pozorován fotometricky při 240 nm (Beers *et al.*, 1952).

Roztoky pro stanovení katalasy:

Fosfátový pufr: KH₂PO₄ (50 mmol·l⁻¹), pH 7,0

Peroxid vodíku (30 mmol·l⁻¹) ve fosfátovém pufru

Postup: 40 μl jaterního homogenátu/1% lyzátu erytrocytů bylo smícháno s 1960 μl fosfátového pufru, reakce byla nastartována 0,5 ml peroxidu vodíku a byla měřena absorbance při 240 nm po dobu 30 sekund. Aktivita katalasy byla vypočítána podle následujícího vztahu:

$$\text{Aktivita katalasy (mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\Delta A_{240}}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

ΔA_{240} ...změna absorbance vzorku za minutu

ε ... molární absorpční koeficient ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)

L... délka optické dráhy (cm)

c... koncentrace bílkovin ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

Celková antioxidační kapacita (TAC)

Princip metody: celková antioxidační kapacita byla stanovena cyklickou voltametrií (Kohen *et al.*, 2000). Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový puls s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku vzorku. Redukční schopnost látky se vyhodnocuje ze získaného záznamu, cyklického voltamogramu. Z jeho křivky je možné odečíst hodnotu půlvlnového anodického potenciálu oxidačního píku $E_{a/2}$ a odpovídající hodnotu anodického proudu I_a . Čím je hodnota $E_{a/2}$ menší, tím snadněji látka odevzdává elektrony a může být lepším redukčním činidlem.

Postup: plasma a jaterní homogenát (10%) byly zředěny fosfátovým pufrům (KH_2PO_4 , 50 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 7,4) v poměru 2:1. Měření bylo provedeno s použitím Potenciostatu/Galvanostatu model 273 v rozmezí od -0,2 do 1,0 V, rychlosti $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ při pokojové teplotě. Pracovní elektroda byla před každým měřením leštěna $0,05 \mu\text{m}$ oxidem křemičitým. Ze získaných voltamogramů byl odečten $E_{a/2}$ charakterizující oxido-redukční vlastnosti látek (typ) a I_a charakterizující množství těchto aktivních látek.

Hladina produktů pokročilé oxidace proteinů (AOPP)

Princip metody: oxidované proteiny v prostředí jodidu draselného absorbují při 340 nm. Koncentrace oxidačně modifikovaných proteinů byla zjištěna s využitím kalibrační křivky chloraminu-T (Witko-Sarsat *et al.*, 1996).

Postup: ke 200 μl chloraminu-T (0, 1, 2, 5, 10 a 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) nebo ředěné plasmy v PBS (1:5) bylo přidáno 10 μl KI ($1,16 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 20 μl kyseliny octové a ihned byla měřena absorbance při 340 nm.

4.4.2.1.5 Stanovení množství hemoglobinu

Princip metody: hemoglobin se v přítomnosti kyanidu mění na kyanomethemoglobin, jehož absorbance je měřena spektrofotometricky při 540 nm (Evelyn *et al.*, 1938).

Roztok pro stanovení hemoglobinu:

NaHCO_3 ($12 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), KCN ($0,77 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($0,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Postup: k 10 μl lyzátu erytrocytů (1% a 10% lyzát) bylo přidáno 200 μl roztoku a po 10 min byla změřena absorbance při 540 nm. Množství hemoglobinu bylo vypočítáno podle následujícího vztahu:

$$\text{Koncentrace hemoglobinu (mol}\cdot\text{l}^{-1}) = \frac{Aa - Ab}{\varepsilon \cdot L} \cdot \text{ředění}$$

Aa...absorbance vzorku

Ab...absorbance slepého vzorku (PBS)

ε ...molární absorbní koeficient ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$)

L...délka optické dráhy (cm)

4.4.2.1.6 Celkové množství cytochromů P450

Princip metody: redukovaný cyt P450 poskytuje v komplexu s oxidem uhelnatým charakteristické absorbní spektrum s maximem při 450 nm (Omura *et al.*, 1964).

Roztoky pro izolaci mikrosomů z jater:

Homogenizační pufr: sacharosa ($0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), EDTA ($0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4

Promývací pufr: KCl ($0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Tris ($0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4

Zpracování tkáně: jaterní mikrosomy byly izolovány ultracentrifugací. Ke vzorku jater (1-2 g) byl přidán čtyřnásobný objem homogenizačního pufru, játra byla homogenizována ($3\times$, 10 s) a poté centrifugována (15 min, $800\times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Supernatant byl znovu centrifugován (20 min, $10000\times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) a nový supernatant byl přenesen do ultracentrifugačních zkumavek, doplněn homogenizačním pufrem a opět centrifugován (90 min, $35000\times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). K získanému sedimentu byl přidán promývací pufr, pelet byl zhomogenizován ručním homogenizátorem (Potter Elvehjemův homogenizátor) a následovala centrifugace (90 min, $35000\times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Pelet byl rozmíchán v 0,3 ml promývacího pufru, následovala opět homogenizace homogenizátorem, ve vzorku mikrosomů byla změřena koncentrace proteinů (viz kapitola 4.4.1.2.a), mikrosomy byly rozděleny na alikvoty a zamraženy na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Stanovení cyt P450:

Mikrosomy byly $50\times$ zředěny promývacím pufrem (40 μl mikrosomů a 1960 μl pufru), bylo přidáno 30 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a směs byla vortexována. Roztok byl přepipetován do kyvet a přístroj byl vynulován. Poté byla jedna z kyvet nasycena CO a následně změřena absorbance při 450 a 500 nm. Celkový obsah cyt P450 byl vypočítán podle následujícího vztahu:

$$\text{Celkový obsah cyt P450 (mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{)} = \frac{A_{450} - A_{500}}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

A_{450} ...absorbance vzorku při 450 nm

A_{500} ...absorbance vzorku při 500 nm

ε ...molární absorpční koeficient ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$)

L...délka optické dráhy (cm)

c...koncentrace bílkovin ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

4.4.2.1.7 Western blot analýza cytochromu P450 1A1/2 (CYP1A1/2)

Příprava vzorků: Jaterní mikrosomy byly připraveny dle kapitoly 4.4.2.1.6. Vzorky z každého zvířete ze skupiny byly naředěny na stejnou koncentraci a smíchány ve stejném objemu, byly připraveny směsné vzorky. Směsné vzorky byly naředěny 0,8× vzorkovým pufrem a denaturovány povařením (5 min, 95 °C) (viz kapitola 4.4.1.2.a). Jako pozitivní kontrola indukce CYP1A1/2 byly použity mikrosomy z jater potkanů, kterým byl intraperitoneálně aplikován β -naftoflavon (Shon *et al.*, 2004).

Následující kroky byly provedeny podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1.2.a s těmito rozdíly: doba přenosu z gelu na membránu byla 100 min, byla použita primární kozí protilátka CYP1A1 (CYP1A1 G-18, goat polyclonal IgG, TBS/T/BSA, 1:500 a sekundární králičí protilátka značená křenovou peroxidasou (rabbit anti-goat IgG HRP, TBS/T/mléko, 1:10 000).

4.4.2.1.8 Histologická analýza

Tkáňové vzorky jater, ledviny, srdce, tenkého střeva, jazyka a dásní byly ihned po odběru fixovány v Bakerově směsi (10% formaldehyd, 35 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CaCl_2 ve vodě), odvodněny a zality do parafinu. Poté byly nakrájeny na 7 μm silné řezy na rotačním mikrotomu. Řezy byly barveny hematoxylinem – eosinem, Alcionovou modří a reakcí PAS. Preparáty byly vyhodnoceny s použitím světelného mikroskopu *Olympus BX 40*. Histologická analýza byla prováděna na Ústavu histologie a embryologie, LF UP, Olomouc.

4.4.2.1.9 Stanovení poškození DNA metodami Comet assay a ^{32}P -Postlabeling

Comet assay (jednobuněčná gelová elektroforéza)

Princip metody: metoda sleduje poškozené DNA v jednotlivých buňkách, které jsou fixovány v agarosovém gelu. Po lýze membrán se provádí elektroforéza, při které dojde v elektrickém poli k migraci fragmentů jaderné DNA, což se projeví vznikem komet, které jsou pozorovány mikroskopicky po obarvení DNA fluorescenčním barvivem (Tice *et al.*, 1990).

Roztoky pro stanovení poškození DNA:

Lyzační pufr: NaCl ($2,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), EDTA ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Tris ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 10,0

Neutralizační pufr: Tris ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4

Roztok na elektroforézu: NaOH ($0,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), EDTA ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Fluorescenční barvivo: Ethidium bromid ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Izolace lymfocytů: ke 30 μl krve byl přidán 1 ml 10% FCS v PBS, vzorek byl promíchán a inkubován 30 min na ledě. Po inkubaci byla směs podvrstvena 100 μl Histopaku 1077 a centrifugována (3 min, $200\times g$, 4°C). Po centrifugaci byly lymfocyty (střední bílá vrstva mezi PBS a Histopakem) přepipetovány do 1 ml 10% FBS v PBS a opět centrifugovány (3 min, $200\times g$, 4°C). Poté byl pelet odsát do sucha, rozsuspendován v 50 μl 10% FCS v PBS a přidán k 85 μl 1% nízkotuhnoucí agarosy vytemperované na 37°C .

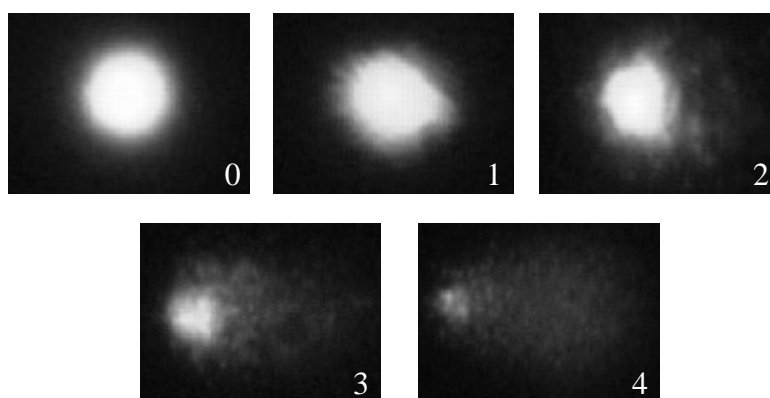
Příprava sklíček: mikroskopická sklíčka ($76\times 26 \text{ mm}$) byla vyvařena v 6% peroxidu vodíku (30 min), následně byla důkladně promyta v diH_2O a usušena. Poté byla potažena z jedné strany 1% agarosou, usušena volně na vzduchu a následně v sušárně (30 min, 60°C). Před pokusem bylo na každé potažené sklíčko aplikováno 85 μl vysokotuhnoucí agarosy (1%) a přikryto krycím sklíčkem. Po ztuhnutí agarosy (15 min, 4°C) bylo krycí sklíčko sejmuto.

Příprava buněčných preparátů: 85 μl izolovaných lymfocytů obsahující asi $2\cdot 10^4$ buněk v 1% nízkotuhnoucí agarose bylo přeneseno na vrstvu vysokotuhnoucí agarosy, překryto krycím sklíčkem a ochlazen na 4°C (5 min). Po zatuhnutí agarosy bylo krycí sklíčko sejmuto a podložní sklíčka s buňkami zafixovanými v gelu byla přenesena do vychlazeného lyzačního pufru (60 min, 4°C) a následně do roztoku pro elektroforézu (40 min, 4°C), aby došlo k rozvolnění šroubovice DNA. Poté byla provedena elektroforetická separace DNA (20 min, 20 V, 4°C). Po elektroforéze byla sklíčka $3\times$ promyta neutralizačním pufrem (5 min) a usušena.

Vyhodnocení: Roztok ethidium bromidu ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byl aplikován na plochy agarosy s buňkami a opět přikryt krycím sklíčkem. Poškození DNA (vzniklé „kometky“) bylo pozorováno mikroskopicky s využitím fluorescenčního mikroskopu *Olympus IX 70* a programu *Olympus MicroImage*. Poškození bylo vyhodnoceno na 100 jádrech/sklíčko. Buňky byly vizuálně rozděleny do skupin od 0 (nepoškozené) do 4 (maximálně poškozené; obr. 6). Každá kometka byla zařazena do skupiny podle uvedeného stupně poškození. Pro každé sklíčko bylo spočítáno celkové poškození (viz vztah níže), které se pohybovalo v rozmezí od 0-400 arbitrárních jednotek.

$$\text{Celkové poškození} = \frac{(N_0 \cdot 0 + N_1 \cdot 1 + N_2 \cdot 2 + N_3 \cdot 3 + N_4 \cdot 4)}{N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4} \cdot 100$$

N_0, N_1, N_2, N_3, N_4 ...množství buněk v jednotlivých skupinách od 0 do 4



Obrázek 6. Příklady poškozené buněčné DNA pro vizuální hodnocení.

³²P-Postlabeling

Princip metody: metoda detekuje modifikované nukleotidy z hydrolyzované DNA. (Stiborova *et al.*, 2008). Tato metoda byla prováděna na Katedře Biochemie, PřF UK, Praha.

4.4.2.2 Farmakokinetika DHSG

4.4.2.2.1 Průběh experimentu s nepřerušným enterohepatálním oběhem

Potkani kmene Wistar (86 samců, tělesná hmotnost 260 ± 10 g) byli chováni za stejných podmínek jako v předchozím experimentu (viz kapitola 4.4.2.1.1).

DHSG byl potkanům podáván gastrickou sondou v dávkách 9,1 mg/kg a 91 mg/kg tělesné hmotnosti potkana v objemu 1 ml vody. Zvířata (3 zvířata na každý časový úsek) byla uspána (viz kapitola 4.4.2.1.1) a po 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28 a 32 h byla odebírána krev. Krev byla odebrána z břišní aorty do Na_2EDTA

zkumavek, centrifugována (10 min, 420×g, 4 °C) a získaná plasma a erytrocyty byly zamraženy na -80 °C. Všem potkanům byla také odebrána játra a po opláchnutí PBS zamražena na -80 °C. Stanovení alkaloidů v plasmě a játrech bylo provedeno dle kapitoly 4.4.2.1.2.

4.4.2.2.2 Průběh experimentu s přerušným enterohepatálním cyklem

Potkani kmene Wistar (46 samců, tělesná hmotnost 260 ± 10 g) byli chováni za stejných podmínek jako v předchozím experimentu (viz. kapitola 4.4.2.1).

DHSG byl potkanům podán gastrickou sondou v dávce 91 mg/kg tělesné hmotnosti v objemu 1 ml vody. Bezprostředně po orální aplikaci DHSG byly potkanům v anestezii podvázány žlučovody a byla odebírána krev v intervalech 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 a 9 h (3 zvířata na každý časový úsek). Zpracování krve a jater a bylo provedeno stejným způsobem jako v kapitole 4.4.2.1.1, stanovení alkaloidů v plasmě dle kapitoly 4.4.2.1.2.

4.4.2.3 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na vybrané fyziologické parametry potkana při dlouhodobém podávání

4.4.2.3.1 Průběh experimentu

Potkani kmene Wistar (30 samců, tělesná hmotnost 312 ± 12 g) byli chováni za stejných podmínek jako v kapitole 4.4.2.1.1. Potkani byli rozděleni do 5 skupin po 6ti zvířatech. Skupina 1 (kontrolní) byla krmena 90 dní standardní dietou, skupina 2 dietou obsahující 100 ppm Sangrovitu (2 ppm SG), skupina 3 dietou obsahující 7000 ppm Sangrovitu (140 ppm SG), skupina 4 dietou obsahující 14000 ppm Sangrovitu (280 ppm SG) a skupina 5 dietou obsahující 600 ppm *sanguiritrinu* (367 ppm SG). V průběhu experimentu byla sledována spotřeba krmiva, hmotnost zvířat (2× týdně) a sbírán trus. Obsah SG a DHSG v krmivu a trusu byl monitorován metodou HPLC/MS-Q.

Experiment byl ukončen po 90 dnech odběrem krve a orgánů v celkové anestezii. V biologickém materiálu bylo provedeno měření parametrů hematologie, klinické biochemie, parametrů oxidačního stresu a poškození DNA (viz. kapitola 4.4.2.1). Ve vzorcích plasmy, moči, trusu, jater, ledvin, srdce, tenkého střeva a jazyku byla provedena stanovení SG, CH, DHSG a DHCH pomocí HPLC/MS-Q analýzy (viz kapitola 4.4.2.1.2). Histologická analýza jater, srdce, ledvin, tenkého střeva a jazyku byla provedena podle kapitoly 4.4.2.1.9.

4.4.2.4 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na zánět tlustého střeva

4.4.2.4.1 Průběh experimentu

Potkani kmene Wistar (75 samců, tělesná hmotnost 266 ± 19 g) byli chováni za stejných podmínek jako v kapitole 4.4.2.1.1. Potkani byli rozděleni do 5 skupin. Skupina 1 (kontrolní, 5 zvířat) a 5 (5% dextransulfát sodný, DSS; 10 zvířat) byly krmeny 14 dní standardní dietou, skupina 2 (20 zvířat) dietou obsahující 500 ppm Sangrovitu (9 ppm SG), skupina 3 (20 zvířat) dietou obsahující 15000 ppm Sangrovitu (270 ppm SG) a skupina 4 (20 zvířat) dietou obsahující 600 ppm *sanguiritrinu* (270 ppm SG). Skupinám 2-5 byl druhý týden experimentu podáván DSS v pitné vodě. Po 14 dnech od započetí experimentu byli potkani usmrceni v anestezii a byla jim odebrána krev do Na_2EDTA zkumavek a zpracována postupem uvedeným v kapitole 4.4.2.1.1. Játra a slepé střevo byly opláchnuty PBS a zváženy. Tenké a tlusté střevo byly podélně rozstříženy, opláchnuty PBS, tlusté střevo bylo změřeno a zamraženo na -80 °C. Část tenkého i tlustého střeva byla fixována v Bakerově roztoku a následně použita na histologickou analýzu (viz kapitola 4.4.2.1.8). Část krve byla použita na stanovení krevního obrazu. Krev, plasma i tlusté střevo byly použity na stanovení parametrů oxidačního stresu: GSH, SH-skupiny, TBARS, C-reaktivní protein (CRP), aktivita myeloperoxidasy (MPO) a glutathiontransferasy (GST). Homogenát střeva byl použit na stanovení exprese cyklooxygenasy-2 (COX-2) a na stanovení obsahu alkaloidů pomocí metody HPLC/MS-IT.

Rozdílné počty zvířat ve skupinách byly zvoleny s ohledem na statistické vyhodnocení studie. Experimentální skupiny krmené testovanými látkami měly 20 zvířat (požadovaný počet dle norem Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) a kontrolní skupina ($n=5$) a skupina zvířat, které byl podáván 5% DSS ($n=10$) byly z etických důvodů zmenšeny.

4.4.2.4.2 Stanovení krevního obrazu

Krevní obraz (počet erytrocytů, leukocytů a trombocytů, hematokrit a hemoglobin) byl stanoven na hematologickém automatickém analyzátoru *ABX Micros ABC Vet* (Horiba, Velká Británie).

4.4.2.4.3 Měření aktivity enzymů

Stanovení hladiny GSH, TBARS a SH-skupin bylo provedeno podle kapitoly 4.4.2.1.4.

Příprava vzorků:

- a) Střevo – po rozmražení byl připraven 10% homogenát ve vychlazeném PBS
- b) Erytrocyty – po rozmražení byl připraven 10% lyzát ve vychlazeném PBS
- c) Plasma byla použita ke stanovení přímo

Stanovení množství proteinů ve vzorcích:

Množství proteinů v plasmě a střevě bylo stanoveno podle kapitoly 4.4.2.1.a.

Aktivita glutathiontransferasy (GST)

Princip metody: GST katalyzuje tvorbu konjugátu 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) s glutathionem, jehož absorbance je měřena spektrofotometricky při 340 nm. Jednotka enzymové aktivity je definována jako množství enzymu, které katalyzuje tvorbu 1 μmol S-2,4-dinitrofenylglutathionu za minutu (Warholm *et al.*, 1985).

Roztoky na stanovení aktivity GST:

GST pufr: KH₂PO₄ (0,1 mol·l⁻¹), pH 6,5

Reakční směs: GST pufr, CDNB (20 mmol·l⁻¹) v 96% ethanolu, redukovaný GSH (20 mmol·l⁻¹) v diH₂O

Postup: k 10 μl lyzátu erytrocytů/homogenátu bylo přidáno 170 μl GST pufru a 10 μl GSH. Po přidavku 10 μl CDNB byla měřena absorbance při 340 nm po dobu 3 min. Aktivita GST byla vypočítána podle následujícího vztahu:

$$\text{Aktivita GST (mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\Delta A_{340}}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

ΔA₃₄₀...změna absorbance vzorku za minutu

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

L...délka optické dráhy (cm)

c...koncentrace bílkovin (g·l⁻¹)

Aktivita myeloperoxidasy (MPO)

Princip metody: MPO je marker lokálního zánětu a je produkována aktivovanými neutrofily a makrofágy (Quiroz *et al.*, 2009). MPO rozkládá peroxid vodíku a současně dochází k oxidaci substrátu tetramethylbenzidinu (TMB), čímž se tvoří modře zbarvený produkt, který se po zastavení reakce pomocí H₂SO₄ mění na žlutý. Následně je změřena absorbance žlutého produktu při 450 nm (Marquez *et al.*, 1997).

Roztoky pro stanovení aktivity MPO:

MPO pufr: KH_2PO_4 ($0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), HTAB (5%, m/v), pH 5,4

Reakční směs: TMB v DMSO ($1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), peroxid vodíku ($0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v MPO pufru, H_2SO_4 ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v diH_2O

Zpracování tkáně: k 50 mg tkáně byl přidán 1 ml MPO pufru, tkáň byla zhomogenizována, následně zesonikována (30 s, 4 °C) a zcentrifugována (10 min, $9700\times g$, 4 °C).

Postup: ke 20 μl supernatantu bylo přidáno 150 μl pufru a 10 μl TMB a reakce byla nastartována 20 μl peroxidu vodíku. Reakce byla po 3 min inkubace při 37 °C zastavena přidávkem 10 μl H_2SO_4 a byla změřena absorbance při 450 nm. Aktivita MPO byla vypočítána podle následujícího vztahu:

$$\text{Aktivita MPO (mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{A_{450}}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

ΔA_{450} ...změna absorbance vzorku za minutu

ε ...molární absorbní koeficient ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$)

L...délka optické dráhy (cm)

c...koncentrace bílkovin ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

Stanovení hladiny C-reaktivního proteinu

CRP je marker akutního zánětu produkovaný v játrech a adipocytech na podnět interleukinu-6 (Jailal *et al.*, 2004).

Princip metody: princip metody je založen na imunochemické detekční metodě (ELISA) využívající enzymově značenou králičí CRP protilátku. Enzymová reakce je doprovázena barevnou změnou substrátu TMB. Koncentrace CRP ve vzorku byla stanovena pomocí kalibrační křivky standardu CRP v koncentračním rozmezí 1,5-130 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ke stanovení koncentrace byl použit komerční kit od firmy Biovendo (ČR).

4.4.2.4.4 Western blot analýza COX-2

Příprava vzorků: Tlusté střevo (150-200 mg) bylo zhomogenizováno v trojnásobku objemu PBS a 100 \times zředěno. Ve vzorcích byla stanovena koncentrace proteinů (viz kapitola 4.4.2.1.a). Vzorky z každého zvířete ze skupiny byly naředěny na stejnou koncentraci a smíchány ve stejném objemu (směsné vzorky). Směsné vzorky byly naředěny 0,8 \times vzorkovým pufrům a denaturovány povařením (5 min, 95 °C) (viz. kapitola 4.4.1.2.a).

Následující elektroforetická separace proteinů, jejich přenos a detekce byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1.2.a. Pro separace jednotlivých proteinů byla použita rozdílná koncentrace zaostřovacího polyakrylamidového gelu (12%), doba přenosu z gelu na membránu byla 100 min, primární králičí protilátka COX-2 byla ředěna v BSA v poměru 1:500. Sekundární kozí protilátka byla ředěna v 5% mléko/TBS-T v poměru 1:10 000.

4.4.2.4.5 Histologická analýza

Tkáňové vzorky tenkého a tlustého střeva byly zpracovány stejným způsobem jako v kapitole 4.4.2.1.8. Bylo sledováno osm parametrů: destrukce epitelu, dilatace krypt, redukce pohárkových buněk, zánětlivý infiltrát, edém, kongesce, tvorba kryptových abscesů a atrofie. Každý parametr byl hodnocen podle histologického skóre (stupně poškození) od 0-3 (tab. 2). Histologická analýza byla provedena na Ústavu histologie a embryologie, LF UP, Olomouc.

Tabulka 2. Histologické skóre.

Rozsah	0	1	2	3
Histologický nález	normální	mírný/ložiskový	střední/zonální	těžký/difúzní

4.4.2.4.6 HPLC/MS-IT analýza střeva

Obsah SG, CH, DHSG a DHCH byl stanoven metodou HPLC/MS-IT.

Příprava vzorků:

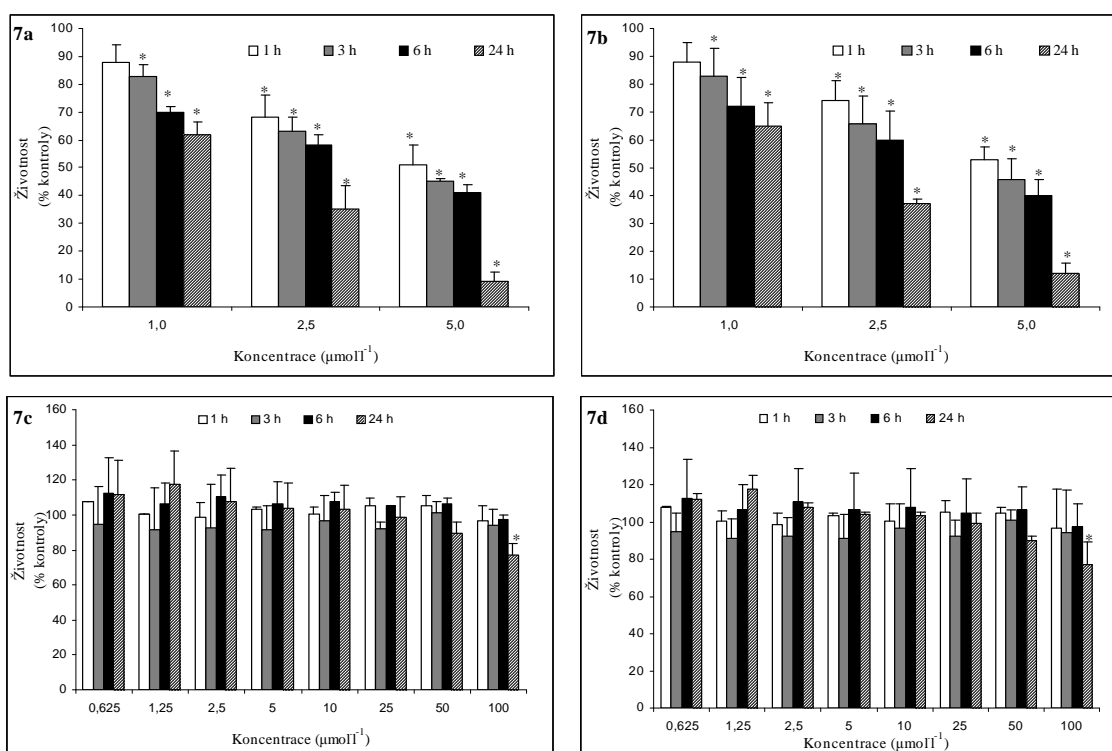
Vzorky tlustého střeva (0,5 g) byly homogenizovány ve 2 ml okyseleného methanolu (1 % HCl). Homogenát byl vortexován, centrifugován (5 min, 3500×g, 4 °C) a supernatant (0,5 ml) byl odpařen v dusíkové atmosféře při 40 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 250 µl vodného roztoku methanolu (70 %, v/v) a centrifugován (10 min, 15000×g, 4 °C). Na kolonu bylo naneseno 10µl supernatantu. HPLC/MS-IT analýza byla provedena podle kapitoly 4.4.1.3.

5. VÝSLEDKY

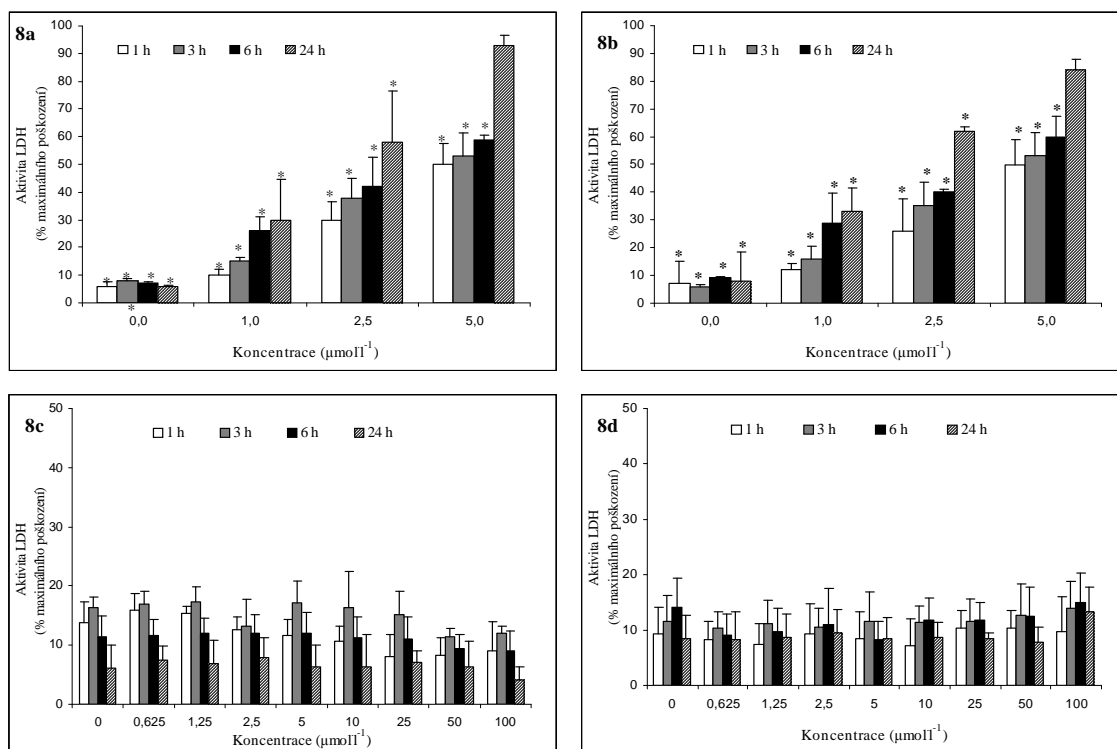
5.1 BIOLOGICKÁ AKTIVITA SG, CH, DHSG a DHCH – *In vitro*

5.1.1 Cytotoxicita SG, CH, DHSG a DHCH

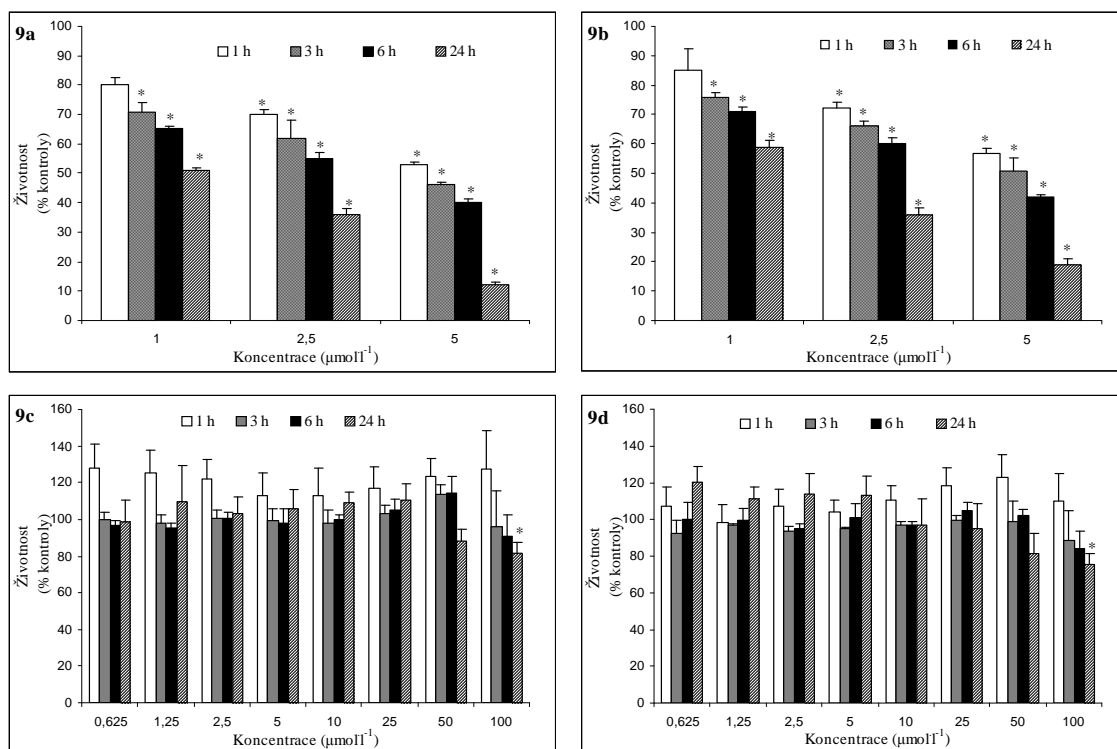
Pro stanovení toxicity SG, CH, DHSG a DHCH byly použity potkaní hepatocyty a buněčná linie HepG2. Toxicita byla sledována pomocí životnosti buněk (MTT test) a měřením aktivity laktátdehydrogenasy (LDH) uvolněné do média. Buňky byly inkubovány v bezsérovém médiu s SG, CH ($1-5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a jejich dihydroderiváty DHSG, DHCH ($0,625-100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo detergentem Tritonem-X (1%, v/v) po dobu 1, 3, 6 a 24 h. Triton byl použit jako pozitivní kontrola pro měření LDH (100% poškození buněk). SG i CH vykazovaly koncentračně závislou toxicitu u obou typů buněk, která se prohlubovala s dobou inkubace (obr. 7-10). Toxicita SG a CH na potkaních hepatocytech se v koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 24 h blížila 100% poškození buněk (obr. 7-8). DHSG a DHCH neměly toxický účinek do $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyvolala po 24 h statisticky významné snížení životnosti u obou typů buněk. Při měření aktivity LDH byla naměřená data srovnatelná s kontrolními buňkami (obr. 7-10).



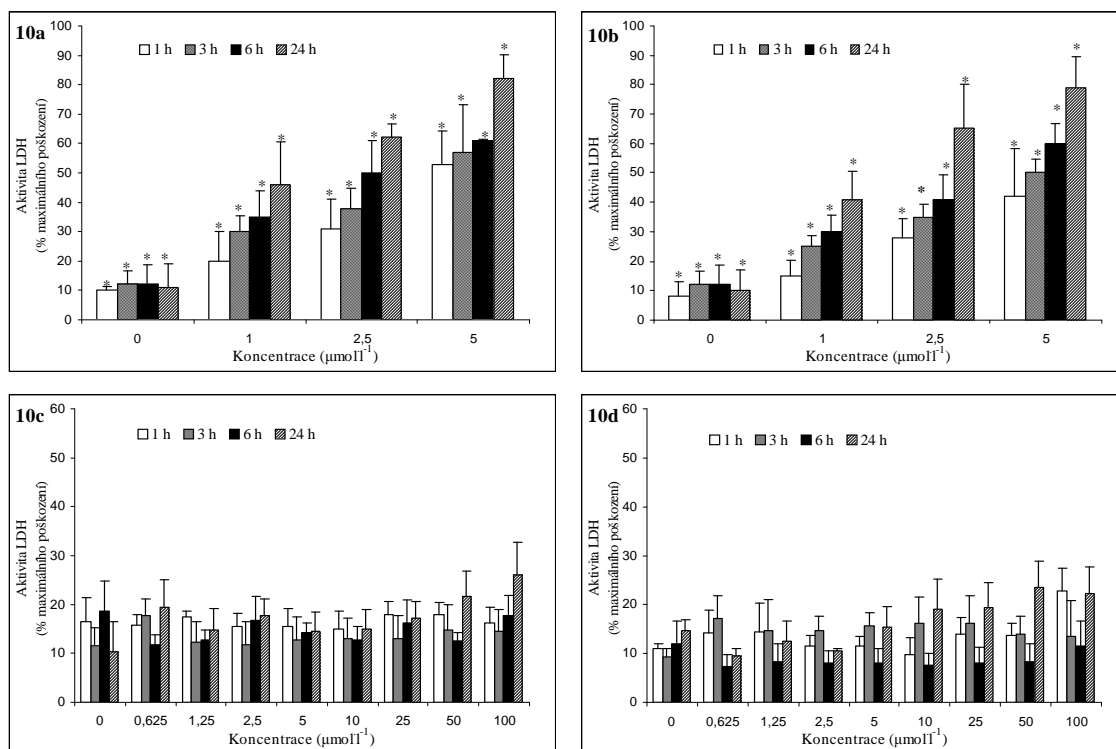
Obrázek 7. Toxicita alkaloidů stanovená MTT testem v potkaních hepatocytech. SG (7a), CH (7b), DHSG (7c), DHCH (7d). * Hodnota je statisticky významně odlišná od kontroly ($p < 0,05$).



Obrázek 8. Toxicita alkaloidů v potkaních hepatocytech vyjádřená jako aktivita LDH. SG (8a), CH (8b), DHSG (8c), DHCH (8d). * Hodnota je statisticky významně odlišná od buněk inkubovaných s tritonem ($p < 0,05$).



Obrázek 9. Toxicita alkaloidů stanovená MTT testem v buňkách HepG2. SG (9a), CH (9b), DHSG (9c), DHCH (9d). * Hodnota je statisticky významně odlišná od kontroly ($p < 0,05$).



Obrázek 10. Toxicita alkaloidů v buňkách HepG2 vyjádřená jako aktivita LDH. SG (10a), CH (10b), DHSG (10c), DHCH (10d). * Hodnota je statisticky významně odlišná od buněk inkubovaných s tritonem ($p < 0,05$).

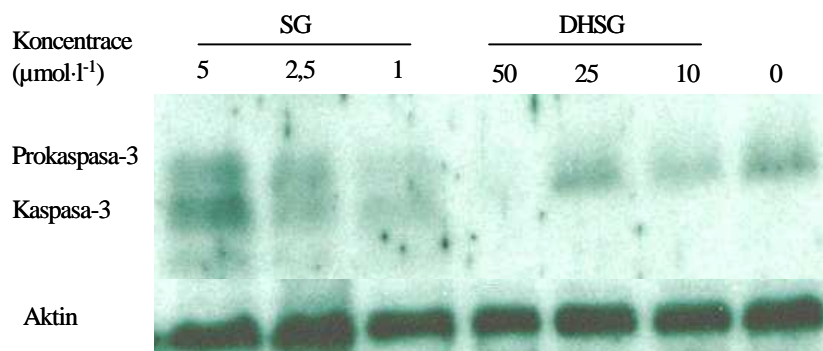
5.1.2 Účinek SG, CH, DHSG a DHCH na expresi a aktivitu kaspasy-3

V předchozích studiích bylo prokázáno, že SG a CH vyvolávají apoptózu buněk indukci proapoptického proteinu Bax a inhibicí antiapoptického proteinu Bcl-2, které se podílí na aktivaci/deaktivaci kaspasy-3 (Weerasinghe *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2008). Byl sledován vliv SG, CH, DHSG a DHCH na expresi kaspasy-3 a její aktivitu na modelu potkaních hepatocytů a buněčné linii HepG2.

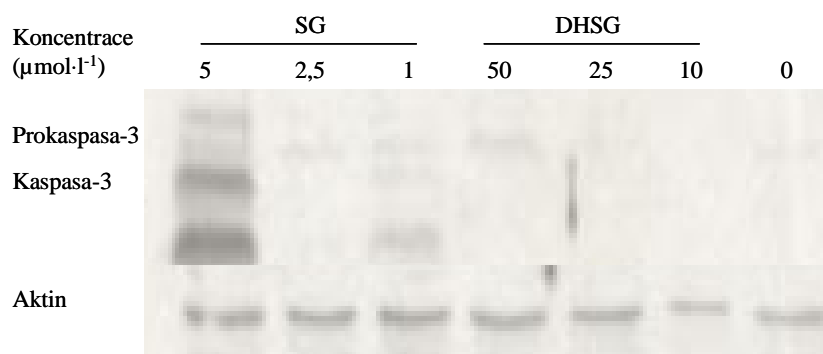
5.1.2.1 Vliv SG, CH, DHSG a DHCH na expresi kaspasy-3

Buněčná linie HepG2 a potkaní hepatocyty byly inkubovány s SG, CH ($1-5 \mu\text{mol l}^{-1}$) a DHSG, DHCH ($10-50 \mu\text{mol l}^{-1}$). SG indukoval expresi kaspasy-3 v koncentracích $1-5 \mu\text{mol l}^{-1}$ po 3 hodinové inkubaci (obr. 11) a v koncentraci $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ po inkubaci 6 h (obr. 12) u linie HepG2 a u potkaních hepatocytů (data neuvěděna). CH indukoval expresi kaspasy-3 pouze v koncentraci $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ po 3 i 6 hodinové inkubaci (obr. 13, 14) v buňkách HepG2 a v potkaních hepatocytech (data neuvěděna). Dihydroderiváty

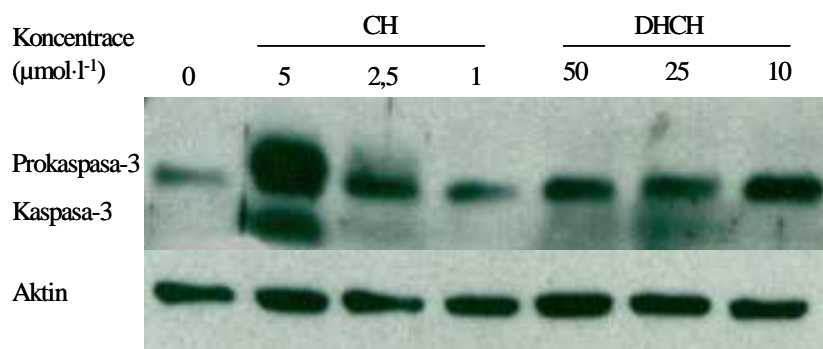
neindukovaly expresi kaspasy-3 (obr. 11-14). Uvedená data jsou reprezentativními výsledky ze tří nezávislých experimentů.



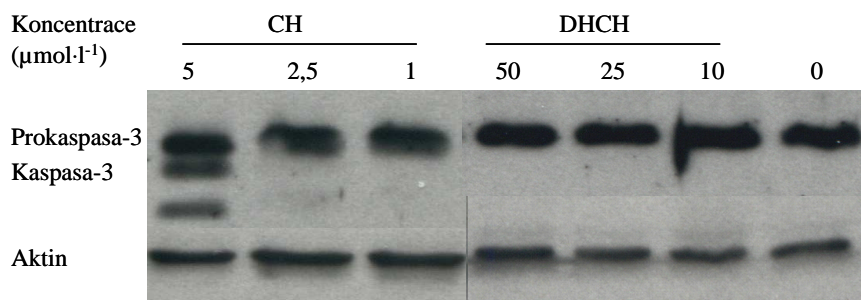
Obrázek 11. Vliv SG a DHSG na expresi kaspasy-3 v buňkách HepG2 po inkubaci 3 h.



Obrázek 12. Vliv SG a DHSG na expresi kaspasy-3 v buňkách HepG2 po inkubaci 6 h.



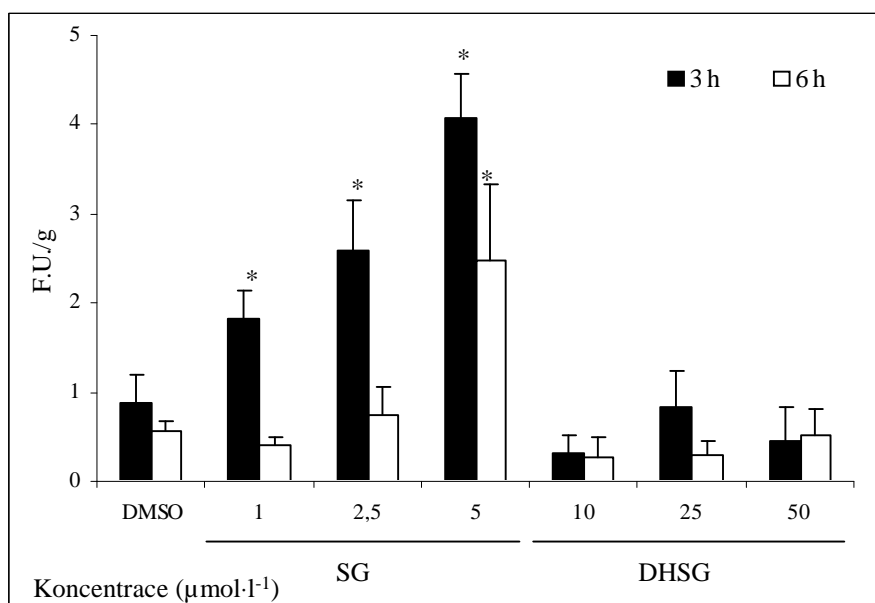
Obrázek 13. Vliv CH a DHCH na expresi kaspasy-3 v buňkách HepG2 po inkubaci 3 h.



Obrázek 14. Vliv CH a DHCH na expresi kaspasy-3 v buňkách HepG2 po inkubaci 6 h.

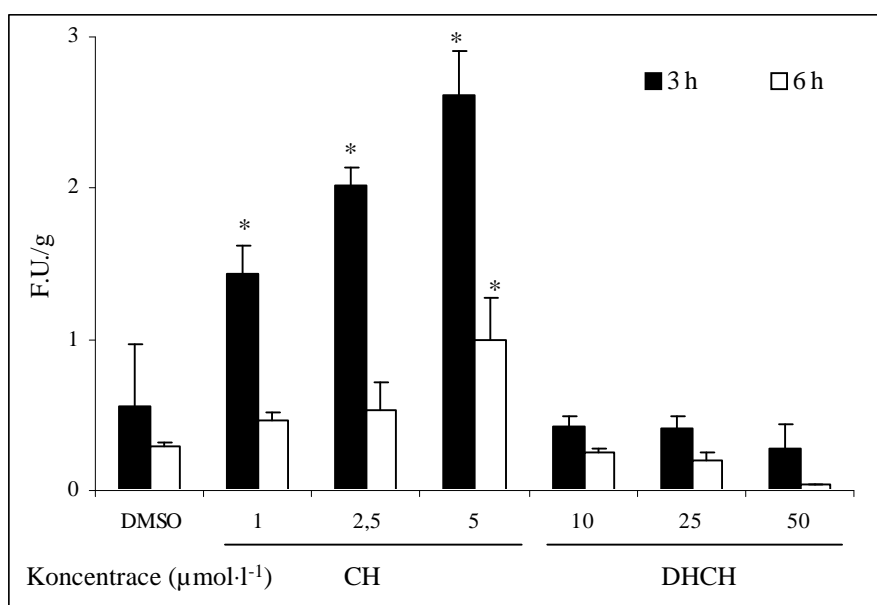
5.1.2.2 Vliv SG, CH, DHSG a DHCH na aktivitu kaspasy-3

Buněčná linie HepG2 a potkaní hepatocyty byly vystaveny účinku SG, CH (1-5 µmol·l⁻¹) a DHSG, DHCH (10-50 µmol·l⁻¹). SG (obr. 15, 17) i CH (obr. 16, 18) v koncentracích 1-5 µmol·l⁻¹ zvyšovaly aktivitu kaspasy-3 v potkaních hepatocytech po 3 hodinové inkubaci. V buňkách HepG2 zvyšovaly SG v koncentracích 2,5-5 µmol·l⁻¹ a CH v koncentraci 5 µmol·l⁻¹ aktivitu kaspasy-3. Po 6 h došlo k poklesu této aktivace. Aktivita kaspasy-3 nebyla ovlivněna po 3 a 6 hodinové inkubaci s dihydroderiváty (obr. 15-18).



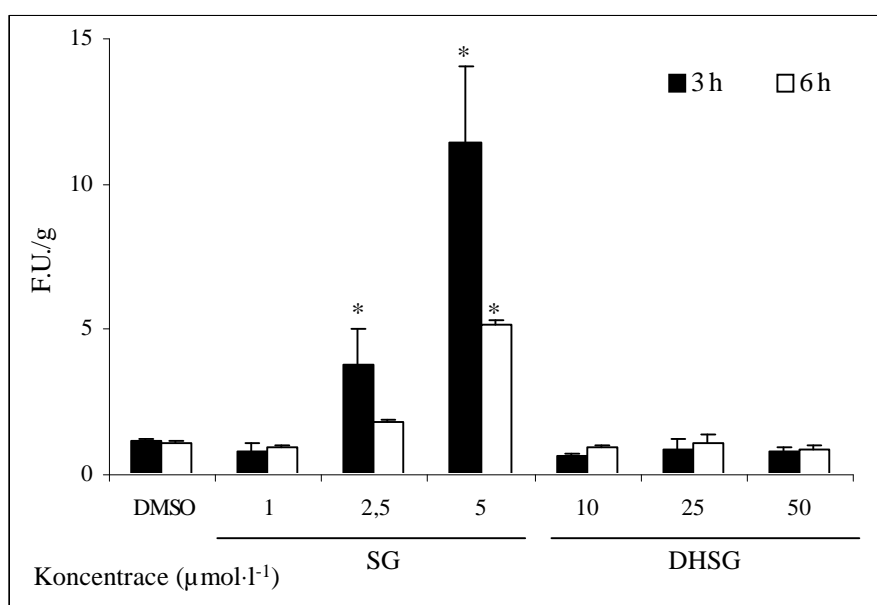
Obrázek 15. Vliv SG a DHSG na aktivitu kaspasy-3 v potkaních hepatocytech.

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



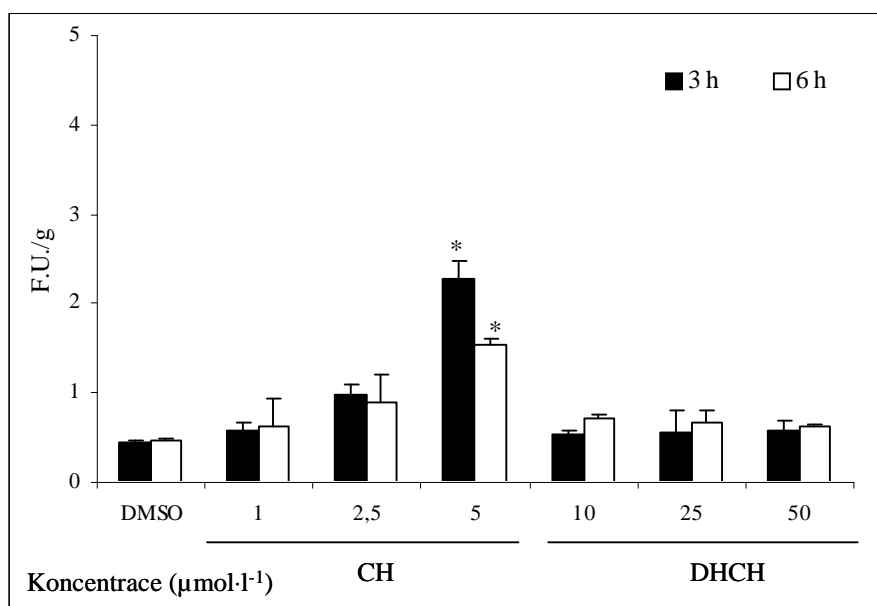
Obrázek 16. Vliv CH a DHCH na aktivitu kaspasy-3 v potkaních hepatocytech.

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



Obrázek 17. Vliv SG a DHSG na aktivitu kaspasy-3 v buňkách HepG2.

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

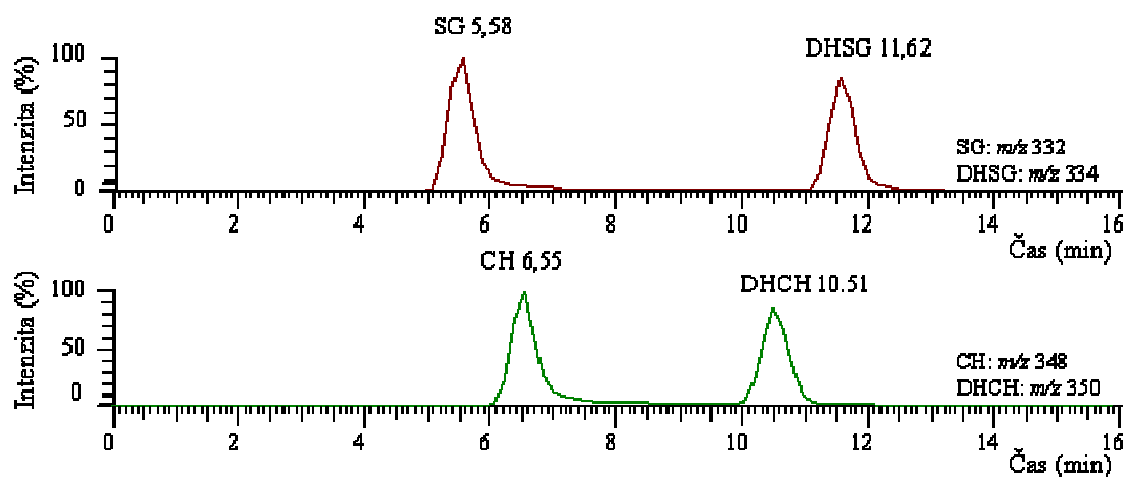


Obrázek 18. Vliv CH a DHCH na aktivitu kaspasy-3 v buňkách HepG2.

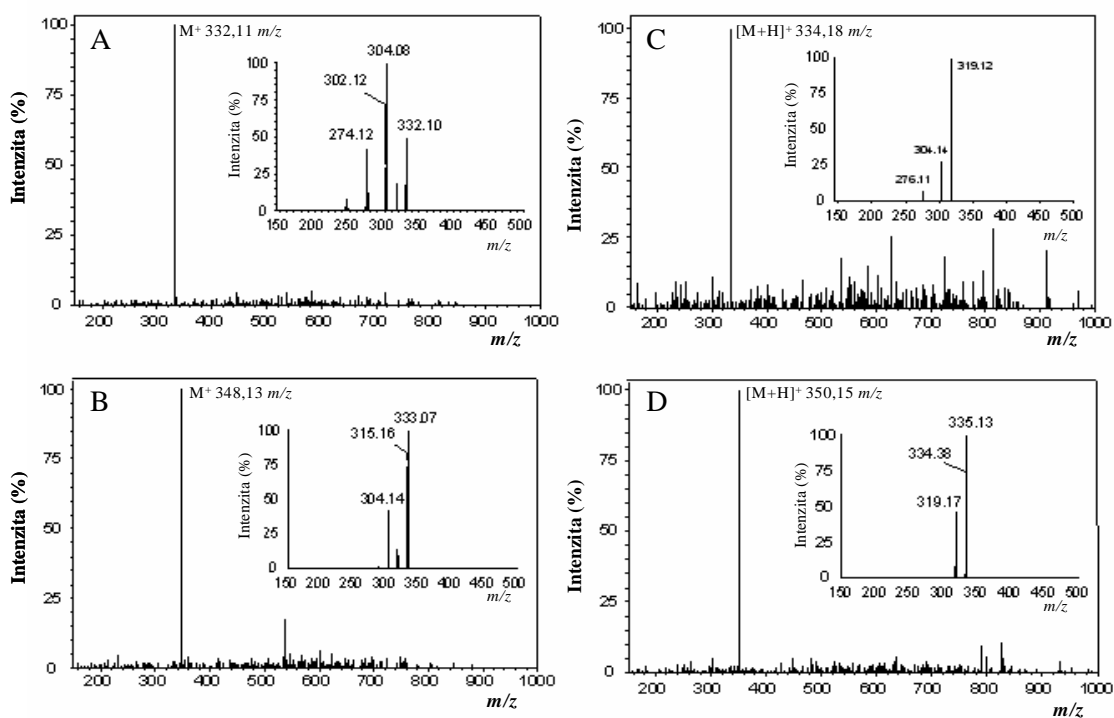
* Hodnota je statisticky významně odlišná od kontroly ($p < 0,05$).

5.1.3 Transformace SG, CH, DHSG a DHCH na lidských hepatocytech

Lidské hepatocyty byly inkubovány 1 a 2 h s SG a CH ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DHSG a DHCH ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Médium a buňky byly analyzovány metodou HPLC/MS-IT. Příklad chromatogramů standardů alkaloidů s jejich retenčními časy je zobrazen na obrázku 19. Na základě MS spekter jednotlivých alkaloidů byly extrahovány chromatogramy (obr. 20). Z naměřených dat vyplynulo, že SG, CH, DHSG a DHCH vstupují do buněk srovnatelně rychle. SG a CH byly metabolizovány na dihydroderiváty. Po 2 hodinové inkubaci hepatocytů s SG bylo v buňkách nalezeno 9× více SG než DHSG, po 2 hodinové inkubaci buněk s CH bylo v buňkách nalezeno 3× více CH než DHCH, z čehož vyplývá, že CH je metabolizován rychleji než SG. V inkubační směsi byly nalezeny další minoritní metabolity, jejichž identifikace zatím nebyla provedena. Při inkubaci buněk s DHSG či DHCH bylo zpětně oxidováno na SG či CH přibližně 3-5 % (tab. 3). Mimo přeměny DHCH na CH byl v buněčné suspenzi detekován další majoritní metabolit s m/z 336. Na identifikaci tohoto metabolitu se v současné době intenzivně pracuje. Díky vysoce citlivému stanovení v kombinaci s nedostatečnou čistotou alkaloidů, použitých pro experiment, byly v buňkách inkubovaných se SG nalezeny stopy CH, respektive v buňkách inkubovaných s DHCH byl nalezen SG (tab. 3).



Obrázek 19. HPLC/MS-IT chromatogram standardů SG, CH, DHSG a DHCH ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Záznam byl extrahován z celkového iontového toku při m/z jednotlivých alkaloidů uvedených v obrázku.



Obrázek 20. Záznam MS spekter jednotlivých alkaloidů. SG (A), CH (B), DHSG (C), DHCH (D). Výřez znázorňuje MS^2 spektra po štěpení molekulového píku.

Tabulka 3. Distribuce SG,CH, DHSG a DHCH v hepatocytech a médiu.

Vzorek	Buňky						Médium					
	SG	DHSG	CH	DHCH	poměr SG/DHSG	poměr CH/DHCH	SG	DHSG	CH	DHCH	poměr SG/DHSG	poměr CH/DHCH
Koncentrace	(ng·ml ⁻¹)						(ng·ml ⁻¹)					
SG 1 h	291,44	33,51	3,94	-	9/1	-	263,1	-	-	-	-	-
SG 2 h	259,36	16,63	1,91	-	16/1	-	228,88	26,16	-	-	9/1	-
DHSG 1 h	108,02	3116,42	-	-	1/29	-	79,79	1643,79	-	-	1/20	-
DHSG 2 h	132,09	3302,12	-	-	1/25	-	103,96	1953,82	-	-	1/19	-
CH 1 h	-	-	195,91	78,26	-	3/1	-	-	154,63	-	-	-
CH 2 h	-	-	147,47	47,57	-	3/1	-	-	127,91	-	-	-
DHCH 1 h	2,73	-	52,74	2006,45	-	1/38	-	-	36,18	1190,82	-	1/33
DHCH 2 h	3,21	-	84,00	1994,94	-	1/24	2,57	-	40,19	1187,75	-	1/30

Hepatocyty byly inkubovány s SG a CH (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DHSG a DHCH (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

5.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA DHSG, SANGUIRITRINU A SANGROVITU – *In vivo*

V 90ti denních studiích byly potkanům v dietě podávány DHSG (100 a 500 ppm), *sanguiritrin* (600 ppm) a Sangrovit (100, 7000 a 14000 ppm). Byl sledován vliv na zdraví potkanů, na hematologické parametry, parametry klinické biochemie a vliv na morfologii vybraných orgánů. Současně byla sledována distribuce SG, CH, DHSG a DHCH ve vybraných orgánech a tělesných tekutinách. Vzhledem k tomu, že SG vyvolává oxidační stres a interkaluje do DNA byly současně sledovány vybrané parametry oxidačního stresu a genotoxicita testovaných látek. U DHSG byla měřena základní farmakokinetická data.

5.2.1 Vliv DHSG na vybrané fyziologické parametry u potkana při dlouhodobém podávání

Potkani byli krmeni standardní dietou (skupina 1) a dietami obsahujícími 100 ppm DHSG (skupina 2) a 500 ppm DHSG (skupina 3). V průběhu experimentu nebylo pozorováno žádné zhoršení zdravotního stavu všech zvířat.

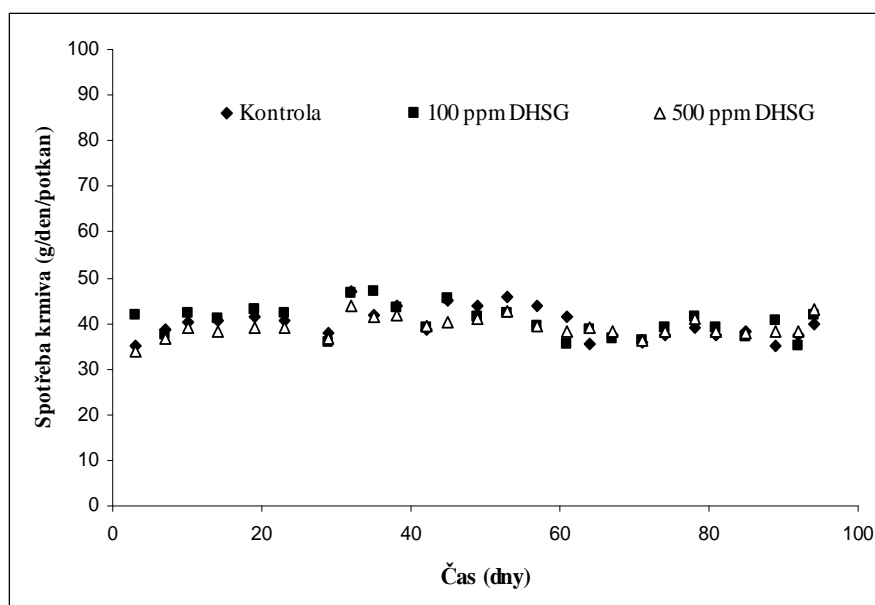
5.2.1.1 Vliv DHSG na spotřebu krmiva, celkovou hmotnost a hmotnost orgánů

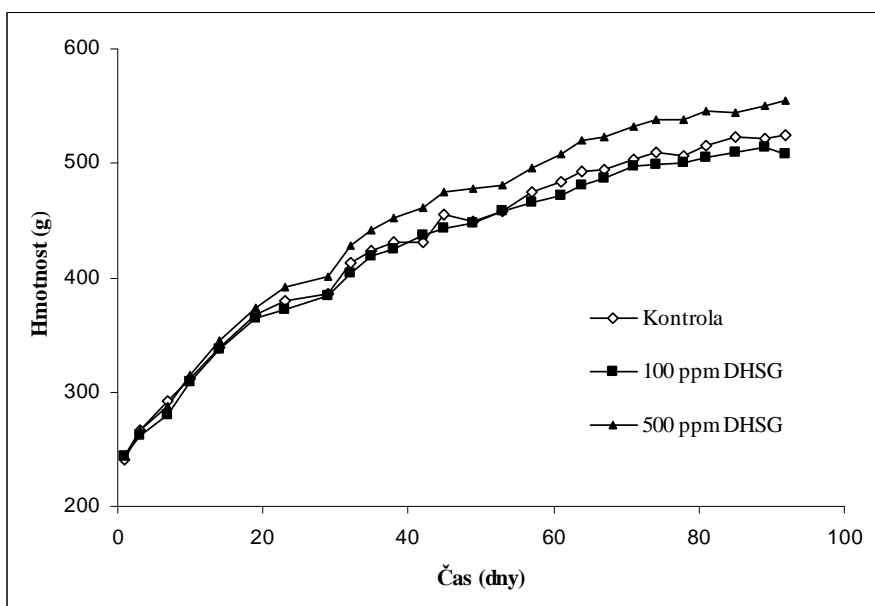
Denní spotřeba krmiva se pohybovala okolo 40 g/den u všech skupin (obr. 21). Denní dávka DHSG byla pro skupinu 2 v průměru 12,4 mg/den/potkan a pro skupinu 3 byla 58,2 mg/den/potkan. Hmotnost vybraných orgánů (jater, srdce, ledvin, mozku a brzlíku) byla po ukončení experimentu srovnatelná u všech skupin zvířat (tab. 4), také nebyly pozorovány makroskopické změny orgánů. Hmotnost zvířat u skupiny 3 byla statisticky významně zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou (tab. 4). Na obrázku 22 jsou zaznamenány růstové charakteristiky skupin zvířat.

Tabulka 4. Celková hmotnost zvířat a hmotnost orgánů.

Skupiny	1	2	3
Hmotnost (g)	Kontrola	100 ppm DHSG	500 ppm DHSG
Celková hmotnost	526 ± 29	511 ± 23	553 ± 64*
Játra	12,75 ± 1,58	12,17 ± 0,96	13,35 ± 1,75
Pravá ledvina	1,63 ± 0,33	1,63 ± 0,21	1,69 ± 0,18
Levá ledvina	1,68 ± 0,32	1,61 ± 0,17	1,66 ± 0,16
Srdce	1,38 ± 0,18	1,42 ± 0,08	1,42 ± 0,19
Brzlík	0,41 ± 0,09	0,40 ± 0,16	0,44 ± 0,10
Mozek	2,00 ± 0,13	1,95 ± 0,12	2,05 ± 0,10
Hmotnost orgánů/celková hmotnost (%)			
Játra	2,42 ± 0,20	2,39 ± 0,26	2,41 ± 0,14
Pravá ledvina	0,31 ± 0,06	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03
Levá ledvina	0,32 ± 0,06	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,02
Srdce	0,26 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,04
Brzlík	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,01
Mozek	0,38 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,05

Celková hmotnost i hmotnost orgánů byly vyjádřeny jako průměr ± SD ze 6 zvířat. Hmotnosti orgánů byly vztaženy na celkovou hmotnost. * Hodnota je statisticky významně odlišná od kontrolní skupiny a skupiny krmené 100 ppm DHSG ($p < 0,05$).

**Obrázek 21. Vliv DHSG na spotřebu krmiva.**



Obrázek 22. Vliv DHSG na hmotnost potkanů.

5.2.1.2 Vliv DHSG na parametry klinické biochemie

Ve vzorcích plasmy byly stanoveny následující parametry: sodík, draslík, chloridy, bilirubin, cholesterol, močovina, kreatinin, ALT, AST, GMT, ALP, CHE, celkový protein a prealbumin. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. U skupiny zvířat krmené 100 ppm DHSG došlo ke statisticky významnému snížení hladiny ALT v porovnání s kontrolní skupinou. Tento pokles hladiny ALT nesignalizuje patologické změny v játrech, jelikož se hodnota pohybuje ve fyziologickém rozmezí.

Tabulka 5. Parametry klinické biochemie v plasmě.

Skupiny		1	2	3
Parametr	Jednotka	Kontrola	100 ppm DHSG	500 ppm DHSG
Sodík	mmol·l ⁻¹	146,0 ± 1,9	146,0 ± 2,6	145,2 ± 1,9
Draslík	mmol·l ⁻¹	3,85 ± 1,00	3,50 ± 0,10	3,97 ± 0,76
Chloridy	mmol·l ⁻¹	95,7 ± 1,6	96,8 ± 1,0	95,2 ± 1,2
Bilirubin	μmol·l ⁻¹	1,57 ± 0,28	1,78 ± 0,40	1,42 ± 0,41
Cholesterol	μmol·l ⁻¹	1,43 ± 0,23	1,70 ± 0,41	1,38 ± 0,27
Močovina	mmol·l ⁻¹	6,02 ± 1,66	6,60 ± 1,36	6,52 ± 1,35
Kreatinin	μmol·l ⁻¹	54,5 ± 5,1	54,0 ± 7,3	58,5 ± 4,5
ALT	μkat·l ⁻¹	1,03 ± 0,11	0,76 ± 0,13*	0,90 ± 0,13
AST	μkat·l ⁻¹	1,50 ± 0,15	1,43 ± 0,29	1,64 ± 0,16
GMT	μkat·l ⁻¹	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
ALP	μkat·l ⁻¹	1,28 ± 0,29	1,13 ± 0,50	1,16 ± 0,15
CHE	μkat·l ⁻¹	5,7 ± 0,8	5,5 ± 1,9	5,5 ± 0,5
Celkový protein	g·l ⁻¹	73,0 ± 2,2	69,3 ± 5,0	69,5 ± 1,8
Prealbumin	g·l ⁻¹	0,062 ± 0,017	0,058 ± 0,010	0,070 ± 0,026

* Hodnota je statisticky významně odlišná od kontrolní skupiny ($p < 0,05$).

5.2.1.3 Vliv DHSG na hematologické parametry

Ve vzorcích krve byly sledovány následující parametry: hematokrit, hemoglobin, počet erytrocytů, leukocytů a trombocytů a střední objem erytrocytů. U měřených hodnot nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami zvířat (tab. 6).

Tabulka 6. Hematologické parametry.

Skupiny		1	2	3
Parametr	Jednotka	Kontrola	100 ppm DHSG	500 ppm DHSG
Hematokrit	l	0,45 ± 0,04	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,02
Hemoglobin	g·l ⁻¹	159,8 ± 10,2	159,2 ± 5,5	162,3 ± 7,6
Erytrocyty	tera·l ⁻¹	9,1 ± 0,87	8,9 ± 0,44	9,008 ± 0,3
Střední objem erytrocytů	fl	49,7 ± 1,5	51,0 ± 2,2	51,0 ± 2,5
Leukocyty	giga·l ⁻¹	5,38 ± 1,23	5,02 ± 1,18	6,40 ± 1,63
Trombocyty	giga·l ⁻¹	832,5 ± 114,1	881,3 ± 44,7	895,7 ± 103,0

5.2.1.4 Vliv DHSG na parametry oxidačního stresu a celkové množství cytochromu P450

Ve vzorcích plasmy byla sledována celková antioxidační kapacita (TAC) a produkty pokročilé oxidace proteinů (AOPP), hladina SH-skupin a produkty lipoperoxidačního poškození (TBARS). Ve vzorcích erytrocytů byly měřeny hladiny TBARS, glutathionu (GSH) a aktivity glutathionperoxidasy (GPX), katalasy a superoxiddismutasy (SOD). Ve vzorcích jater byly měřeny hladiny TBARS, GSH, aktivity GPX, katalasy, SOD a obsah cyt P450. U měřených hodnot nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinami zvířat kmenými experimentálními dietami (tab. 7).

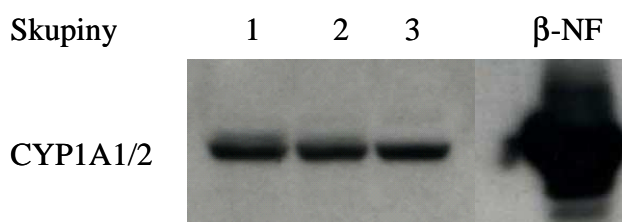
Tabulka 7. Parametry oxidačního stresu v plasmě, erytrocytech a játrech a hladiny jaterního cytochromu P450.

Skupiny		1	2	3
Parametr	Jednotka	Kontrola	100 ppm DHSG	500 ppm DHSG
TAC ^a	nA·g ^{-1(d)}	18,54 ± 3,69	19,61 ± 7,10	22,13 ± 3,8
AOPP ^a	μmol·l ⁻¹	35,85 ± 6,13	33,30 ± 3,44	40,37 ± 7,4
SH-skupiny ^a	mmol·g ^{-1(d)}	2,56 ± 0,46	2,74 ± 0,44	2,79 ± 0,5
TBARS ^a	nmol·g ^{-1(d)}	376,4 ± 33,1	397,9 ± 25,3	406,3 ± 37,4
GSH ^b	μmol·g ^{-1(e)}	10,06 ± 2,15	9,99 ± 1,18	10,58 ± 2,05
TBARS ^b	mmol·g ^{-1(e)}	379,2 ± 62,8	419,3 ± 59,7	417,0 ± 64,7
GPX ^b	μmol·min ⁻¹ ·g ^{-1(e)}	165,4 ± 29,9	148,1 ± 25,9	142,2 ± 29,9
Katalasa ^b	μmol·min ⁻¹ ·g ^{-1(e)}	30,84 ± 6,96	28,64 ± 3,09	30,42 ± 4,0
SOD ^b	U·g ^{-1(e)}	1,17 ± 0,28	1,11 ± 0,17	0,92 ± 0,1
TAC ^c	μA·g ^{-1(d)}	0,135 ± 0,025	0,140 ± 0,024	0,150 ± 0,02
GSH ^c	μmol·g ^{-1(d)}	16,70 ± 1,50	16,50 ± 0,99	17,37 ± 2,3
TBARS ^c	nmol·g ^{-1(d)}	150,4 ± 10,8	158,0 ± 23,0	153,3 ± 15,8
GPX ^c	μmol·min ⁻¹ ·g ^{-1(d)}	263,4 ± 16,2	264,1 ± 34,6	220,8 ± 37,2
Katalasa ^c	μmol·min ⁻¹ ·g ^{-1(d)}	29,80 ± 5,01	29,44 ± 3,9	26,79 ± 5,2
SOD ^c	U·g ^{-1(d)}	2,74 ± 0,57	2,54 ± 0,46	2,92 ± 0,8
Cyt P450 ^c	μmol·g ^{-1(d)}	0,36 ± 0,05	0,33 ± 0,07	0,39 ± 0,09

^a Plasma; ^b Erytrocyty; ^c Játra; ^d Hodnota je vyjádřena na 1 gram proteinu; ^e Hodnota je vyjádřena na 1 gram hemoglobinu.

5.2.1.5 Vliv DHSG na expresi CYP1A1/2

Expres CYP1A1/2 byla sledována ve směsných vzorcích mikrosomů z šesti zvířat příslušné skupiny. Jako pozitivní kontrola indukce exprese CYP1A1/2 byly použity mikrosomy z jater potkana, kterému byl intraperitoneálně podán β -naftoflavon (β -NF). Výsledky ukázaly, že DHSG nemá vliv na expresi CYP1A1/2 (obr. 23).



Obrázek 23. Vliv DHSG na expresi CYP1A1/2 v játrech.

5.2.1.6 Vliv DHSG na jadernou DNA

Schopnost DHSG poškodit DNA a vyvolat tvorbu jednovláknových zlomů DNA byla stanovena v lymfocytech jednobuněčnou elektroforézou. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v poškození DNA mezi kontrolní skupinou zvířat a skupinami zvířat krmených DHSG (tab. 8).

Tabulka 8. Vliv DHSG na DNA v periferních lymfocytech.

Skupiny	1	2	3
Parametr	Kontrola	100 ppm DHSG	500 ppm DHSG
Poškozené lymfocyty	14,42 \pm 16,30	17,58 \pm 14,29	12,92 \pm 5,88

5.2.1.7 Stanovení DHSG a SG v dietě a biologickém materiálu

Ke zjištění obsahu DHSG a SG v dietě, trusu, plasmě a orgánech byla použita metoda HPLC/MS-Q. Obsah DHSG a SG v plasmě a orgánech je uveden v tabulce 9. Detekční limit DHSG/SG v tkáni byl 178 fg/g, respektive 358 fg/g. DHSG ani SG nebyly nalezeny u zvířat krmených standardní dietou. U plasmatické hladiny DHSG byl sledován značný rozptyl hodnot (0,71-0,38 ng·ml⁻¹), který byl způsoben prodloužením doby hladovění při postupném usmrcování zvířat. V plasmě zvířat krmených 100 ppm DHSG nebyl DHSG detekován. DHSG byl nalezen ve všech tkáních. K největší kumulaci DHSG docházelo

ve střevě, což bylo způsobeno kontaktem trusu se střevní sliznicí. SG byl u zvířat krmených DHSG nalezen pouze v trusu a játrech.

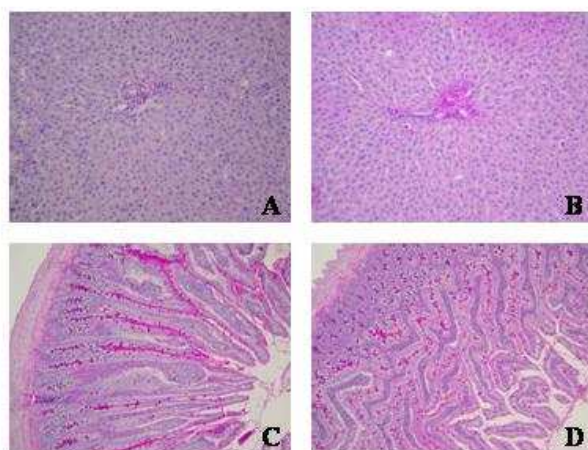
Tabulka 9. Distribuce DHSG/SG v dietě, trusu, plasmě a orgánech.

Skupiny	2	3
	100 ppm DHSG	500 ppm DHSG
Vzorek	DHSG/SG (ng·g ⁻¹)	
Dieta	97 470 ± 7 310/n.d.	478 090 ± 20 630/n.d.
Trus	109,0 ± 6,8/19,7 ± 5,3	704,3 ± 22,5/127,4 ± 0,6
Plasma ^a	n.d./n.d.	0,50 ± 0,13/n.d.
Játra	0,21 ± 0,22/0,19 ± 0,12	0,56 ± 0,33/1,34 ± 1,68
Ledviny	0,32 ± 0,26/n.d.	1,77 ± 0,47/n.d.
Střevo	16,70 ± 4,80/n.d.	84,79 ± 36,11/n.d.
Sval	0,02 ± 0,03/n.d.	0,08 ± 0,06/n.d.
Srdce	0,05 ± 0,05/n.d.	0,31 ± 0,20/n.d.
Jazyk	0,84 ± 0,56/n.d.	5,16 ± 2,46/n.d.
Mozek	0,04 ± 0,02/n.d.	0,21 ± 0,08/n.d.

^a ng·ml⁻¹ plasmy; n.d. – nebyl detekován.

5.2.1.8 Vliv DHSG na morfologii tkání

U žádné z testovaných dávek DHSG v dietě nebyly pozorovány morfologické změny v játrech, srdci, svalu, ledvinách, jazyku a tenkém střevě v porovnání se skupinou zvířat krmenou standardní dietou (obr. 24).



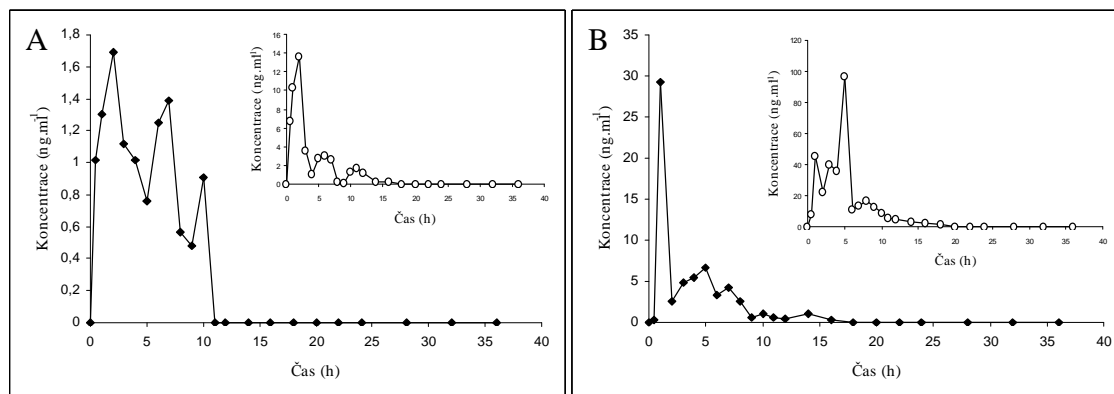
Obrázek 24. Vybrané fotografie jater a tenkého střeva u kontrolní skupiny a skupiny krmené dietou obsahující 500 ppm DHSG (zvětšeno 60×). Játra (A) a tenké střevo (C) kontrolních zvířat, játra (B) a tenké střevo (D) zvířat krmených dietou obsahující 500 ppm DHSG.

5.2.2 Farmakokinetika DHSG

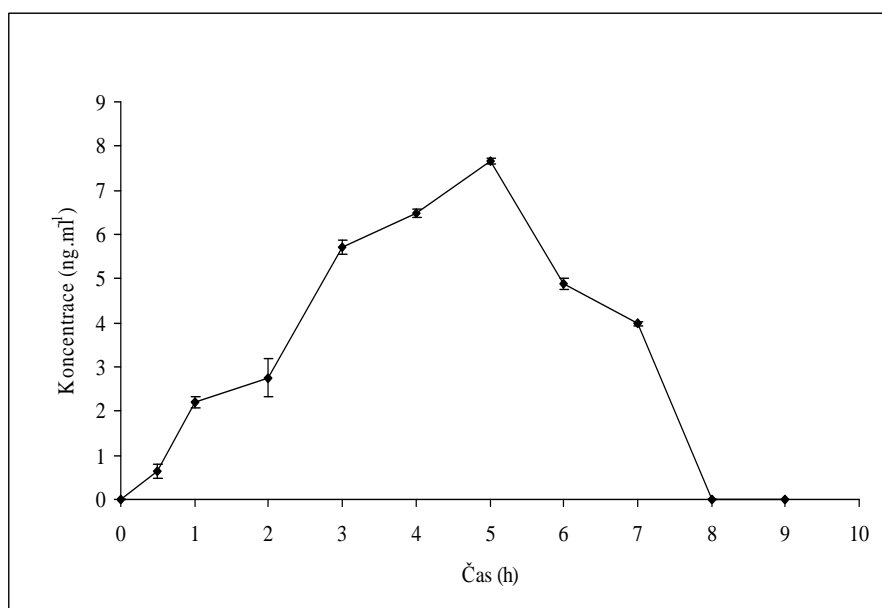
Potkanům byl gastrickou sondou jednorázově podán DHSG v dávkách 9,1 a 91 mg/kg hmotnosti zvířete. Ve druhém experimentu byl potkanům podán DHSG v dávce 91 mg/kg hmotnosti zvířete a následně podvázán žlučovod a přerušen enterohepatální cyklus. Cílem studií bylo zjistit základní farmakokinetická data DHSG (koncentrační maximum - c_{max} , čas dosažení koncentračního maxima - t_{max} a plocha pod křivkou koncentrace látky - $AUC_{0 \rightarrow \infty}$) v plasmě a játrech za fyziologických podmínek a při přerušeném enterohepatálním cyklu.

5.2.2.1 Základní farmakokinetická data

Časová závislost koncentrace DHSG v plasmě a játrech byla určena pro dávky 9,1 a 91 mg/kg (obr. 25). DHSG podávaný v dávce 91 mg/kg byl rychle vstřebáván a koncentračního maxima dosáhl 1 h po aplikaci. V dalších časových intervalech od aplikace byla pozorována další maxima v plasmě i v játrech. Z plasmy a jater byl DHSG zcela vyloučen mezi 10-18 h (obr. 25). Při přerušeném enterohepatálním cyklu bylo po 5 h od aplikace DHSG dosaženo koncentračního maxima. Z plasmy byl DHSG vyloučen do 8 h od podání (obr. 26). Farmakokinetická data v plasmě jsou uvedena v tabulce 10.



Obrázek 25. Distribuce DHSG v plasmě a játrech v závislosti na čase. Koncentrace DHSG v plasmě (●) a játrech (○) při jednorázovém podání gastrickou sondou v koncentracích 9,1 mg/kg (A) a 91 mg/kg (B).



Obrázek 26. Časová křivka distribuce DHSG (91 mg/kg) v plasmě při přerušném enterohepatálním cyklu.

Tabulka 10. Farmakokinetická data DHSG v plasmě.

Koncentrace (mg/kg)	9,1	91	91 (podvázaný žlučovod)
t_{\max} (h)	2	1	5
c_{\max} (ng·ml ⁻¹)	1,69	28,08	7,66
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (mg·ml ⁻¹ ·h ⁻¹)	9,88 ± 0,36	51,86 ± 2,05	38,46 ± 0,48

5.2.3 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na vybrané fyziologické parametry u potkana při dlouhodobém podávání

Potkani byli krmeni standardní dietou (skupina 1) a dietami obsahujícími 100 ppm Sangrovitu (skupina 2), 7000 ppm Sangrovitu (skupina 3), 14000 ppm Sangrovitu (skupina 4) a 600 ppm *sanguiritrinu* (skupina 5). Obsah alkaloidů SG a CH v dietách byl zjištěn metodou HPLC/MS-Q a je uveden v tabulce 11. V průběhu experimentu nebylo pozorováno zhoršení zdravotního stavu zvířat ve všech skupinách.

Tabulka 11. Množství alkaloidů SG a CH vztažené na množství Sangrovitu či *sanguiritrinu*.

Množství Sangrovitu/ <i>sanguiritrinu</i> v krmivu (ppm)	100	7000	14000	600
Množství alkaloidů SG a CH v Sangrovitu/ <i>sanguiritrinu</i> (ppm)	2	140	290	367

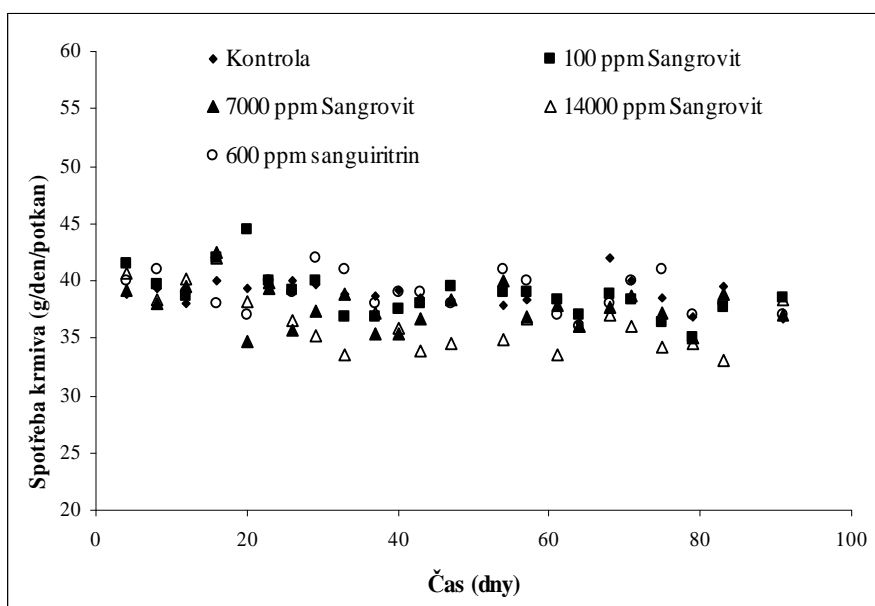
5.2.3.1 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na spotřebu krmiva, celkovou hmotnost a hmotnost orgánů

Denní spotřeba krmiva se pohybovala okolo 38 g/den ve všech skupinách zvířat (obr. 27), Denní dávka SG a CH byla ve skupině 2 průměrně 0,5 mg/den/potkan, ve skupině 3 byla 32,3 mg/den/potkan, ve skupině 4 byla 64,6 mg/den/potkan a ve skupině 5 byla 45,4 mg/den/potkan. Celková hmotnost a hmotnost vybraných orgánů (játra, srdce, ledviny) byla po ukončení experimentu srovnatelná u všech skupin zvířat (tab. 12), také nebyly pozorovány makroskopické změny orgánů. Růstové charakteristiky zvířat prokázaly statisticky nevýznamný nárůst hmotnosti zvířat krmených dietou s obsahem 100 ppm Sangrovitu (obr. 28).

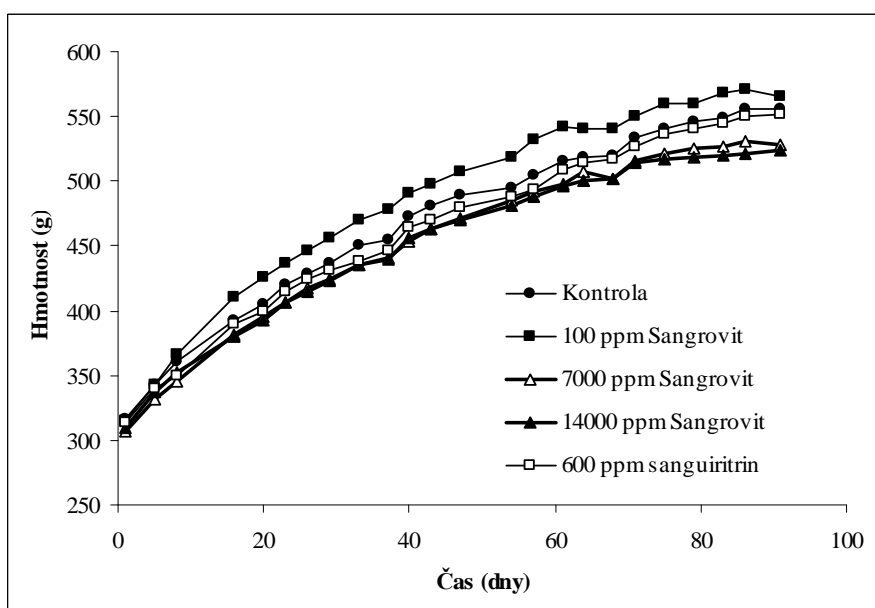
Tabulka 12. Celková hmotnost zvířat a hmotnost orgánů.

Skupiny	1	2	3	4	5
	Kontrola	100 ppm Sangrovit	7000 ppm Sangrovit	14000 ppm Sangrovit	600 ppm <i>sanguiritrin</i>
Hmotnost (g)					
Celková	555 ± 33	566 ± 30	529 ± 32	523 ± 39	541 ± 36
Játra	12,87 ± 0,72	13,37 ± 1,16	11,87 ± 1,28	12,59 ± 0,48	12,48 ± 0,52
Levá ledvina	1,74 ± 0,23	1,84 ± 0,18	1,69 ± 0,14	1,63 ± 0,18	1,69 ± 0,13
Srdce	1,71 ± 0,30	1,62 ± 0,11	1,58 ± 0,15	1,53 ± 0,16	1,66 ± 0,10
Hmotnost orgánů/celková hmotnost (%)					
Játra	2,33 ± 0,21	2,36 ± 0,15	2,24 ± 0,15	2,42 ± 0,20	2,31 ± 0,15
Levá ledvina	0,32 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03
Srdce	0,31 ± 0,07	0,29 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,31 ± 0,03

Celková hmotnost i hmotnost orgánů byly vyjádřeny jako průměr ± SD ze 6ti zvířat. Hmotnosti orgánů byly vztaženy na celkovou hmotnost.



Obrázek 27. Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na spotřebu krmiva.



Obrázek 28. Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na hmotnost potkanů.

5.2.3.2 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na parametry klinické biochemie

Ve vzorku plasmy byly stanoveny následující parametry: sodík, draslík, chloridy, bilirubin, cholesterol, močovina, kreatinin, ALT, AST, GMT, ALP, CHE a celkový protein. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 13. U měřených hodnot nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v parametrech kontrolních zvířat a zvířat krmených dietami obsahujícími Sangrovit nebo *sanguiritrin*.

Tabulka 13. Parametry klinické biochemie v plasmě.

Skupiny		1	2	3	4	5
Parametr	Jednotka	Kontrola	100 ppm Sangrovit	7000 ppm Sangrovit	14000 ppm Sangrovit	600 ppm <i>sanguiritrin</i>
Sodík	mmol·l ⁻¹	146,0 ± 0,9	150,3 ± 10,3	146,7 ± 0,5	145,7 ± 1,0	146,5 ± 1,2
Draslík	mmol·l ⁻¹	4,4 ± 0,8	5,2 ± 2,9	4,2 ± 0,2	4,8 ± 1,3	4,6 ± 0,3
Chloridy	mmol·l ⁻¹	102,0 ± 2,3	105,0 ± 9,9	102,8 ± 1,0	103,7 ± 2,1	103,3 ± 1,0
Bilirubin	μmol·l ⁻¹	1,4 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,6	1,8 ± 0,5	1,8 ± 0,5
Cholesterol	μmol·l ⁻¹	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,9 ± 0,3
Močovina	mmol·l ⁻¹	5,5 ± 0,6	6,2 ± 0,8	5,9 ± 0,4	6,2 ± 0,5	5,4 ± 0,6
Kreatinin	μmol·l ⁻¹	61,2 ± 4,0	59,5 ± 4,2	60,5 ± 8,4	65,0 ± 6,1	62,0 ± 5,0
ALT	μkat·l ⁻¹	0,96 ± 0,17	1,12 ± 0,34	0,89 ± 0,24	1,86 ± 2,39	0,94 ± 0,14
AST	μkat·l ⁻¹	1,66 ± 0,23	1,78 ± 0,37	1,51 ± 0,23	2,12 ± 1,65	1,56 ± 0,22
ALP	μkat·l ⁻¹	1,15 ± 0,06	1,02 ± 0,55	1,28 ± 0,25	1,39 ± 0,33	1,13 ± 0,26
CHE	μkat·l ⁻¹	3,8 ± 0,8	3,3 ± 0,8	3,8 ± 0,4	4,0 ± 0,9	3,8 ± 0,5
Celkový protein	g·l ⁻¹	71,2 ± 2,2	68,0 ± 8,6	67,3 ± 2,2	65,5 ± 3,6	70,5 ± 2,6

5.2.3.3 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na hematologické parametry

Ve vzorcích krve byly sledovány následující parametry: hematokrit, hemoglobin, počet erytrocytů, leukocytů a trombocytů a střední objem erytrocytů. U měřených hodnot nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou zvířat a skupinami zvířat krmených dietami obsahujícími Sangrovit či *sanguiritrin* (tab. 14).

Tabulka 14. Hematologické parametry.

Skupiny		1	2	3	4	5
Parametr	Jednotka	Kontrola	100 ppm Sangrovit	7000 ppm Sangrovit	14000 ppm Sangrovit	600 ppm <i>sanguiritrin</i>
Hematokrit	l	0,48 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,46 ± 0,05	0,46 ± 0,03
Hemoglobin	g·l ⁻¹	156,5 ± 9,7	153,0 ± 4,7	155,2 ± 12,5	152,0 ± 14,4	157,5 ± 3,9
Erytrocyty	tera·l ⁻¹	8,72 ± 0,59	8,63 ± 0,47	8,61 ± 0,65	8,36 ± 0,70	8,64 ± 0,49
Střední objem erytrocytů	fl	55,0 ± 0,9	54,0 ± 2,6	55,2 ± 0,8	54,8 ± 1,7	55,7 ± 1,9
Leukocyty	giga·l ⁻¹	8,95 ± 4,49	5,30 ± 2,26	3,76 ± 0,98	5,93 ± 4,29	5,38 ± 3,33
Trombocyty	giga·l ⁻¹	708,3 ± 100,8	757,8 ± 55,4	760,4 ± 52,1	727,2 ± 145,3	766,5 ± 138,4

5.2.3.4 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na parametry oxidačního stresu a celkové množství cytochromu P450

Ve vzorcích plasmy byla sledována TAC, hladina SH-skupin a TBARS. Ve vzorcích erytrocytů byly měřeny hladiny TBARS, GSH a aktivity glutathiontransferasy (GST), katalasy a SOD. Ve vzorcích jater byly stanovovány hladiny TBARS, GSH, aktivity GST, katalasy, SOD a obsah cytochromu P450. U zvířat krmených Sangrovitem (skupina 3 a 4)

byla prokázána statisticky významně zvýšená aktivita SOD v játrech ve srovnání s kontrolní skupinou. U skupiny zvířat krmených dietou obsahující 14000 ppm Sangrovitu byla pozorována statisticky významně zvýšená hladina GSH v játrech ve srovnání s kontrolní skupinou. Skupina zvířat krmená dietou obsahující *sanguiritrin* (skupina 5) nevykazovala změny v žádném z měřených parametrů ve srovnání s kontrolní skupinou (tab. 15). Za změny pozorované u zvířat skupin 3 a 4 mohou být odpovědný jiné alkaloidy nebo další obsahové látky Sangrovitu.

Tabulka 15. Parametry oxidačního stresu v plasmě, erytrocytech a játrech.

Skupiny		1	2	3	4	5
Parametr	Jednotka	Kontrola	100 ppm Sangrovit	7000 ppm Sangrovit	14000 ppm Sangrovit	600 ppm <i>sanguiritrin</i>
TAC ^a	nA·g ^{-1(d)}	21,78 ± 0,24	26,16 ± 0,61	38,89 ± 0,79	33,01 ± 0,66	24,67 ± 0,64
SH-skupiny ^a	mmol·g ^{-1(d)}	1,34 ± 0,49	1,54 ± 0,37	1,45 ± 0,53	1,63 ± 0,91	1,65 ± 0,72
TBARS ^a	nmol·g ^{-1(d)}	331,4 ± 38,1	304,7 ± 9,0	348,0 ± 35,3	332,3 ± 46,2	343,1 ± 29,2
GSH ^b	μmol·g ^{-1(e)}	10,77 ± 2,51	13,34 ± 2,25	10,29 ± 2,69	11,36 ± 1,53	11,54 ± 1,79
TBARS ^b	nmol·g ^{-1(e)}	0,55 ± 0,19	0,84 ± 0,44	0,54 ± 0,19	0,56 ± 0,19	0,58 ± 0,20
GPX ^b	μmol·min ⁻¹ ·g ^{-1(e)}	143,0 ± 21,8	148,8 ± 16,1	136,3 ± 28,0	134,6 ± 34,8	138,6 ± 28,8
Katalasa ^b	μmol·min ⁻¹ ·g ^{-1(e)}	9,24 ± 2,51	11,11 ± 1,82	9,73 ± 2,44	10,78 ± 3,09	9,29 ± 2,31
SOD ^b	U·g ^{-1(e)}	3,75 ± 0,20	3,79 ± 0,50	3,89 ± 0,31	4,44 ± 0,66	3,96 ± 0,42
TAC ^c	μA·g ^{-1(d)}	0,98 ± 0,12	1,12 ± 0,15	1,08 ± 0,27	1,28 ± 0,12	1,14 ± 0,16
GSH ^c	μmol·g ^{-1(d)}	17,04 ± 2,02	17,49 ± 1,36	19,12 ± 1,68	20,02 ± 2,16*	17,64 ± 3,81
TBARS ^c	nmol·g ^{-1(d)}	181,4 ± 21,8	169,1 ± 28,5	193,8 ± 28,3	197,7 ± 13,6	186,4 ± 22,7
GPX ^c	μmol·min ⁻¹ ·g ^{-1(d)}	179,0 ± 23,3	171,7 ± 30,0	199,6 ± 58,4	198,2 ± 35,2	185,7 ± 41,0
Katalasa ^c	μmol·min ⁻¹ ·g ^{-1(d)}	16,74 ± 2,83	16,92 ± 2,97	18,42 ± 4,04	17,83 ± 2,59	17,02 ± 2,56
SOD ^c	U·g ^{-1(d)}	5,31 ± 1,47	5,52 ± 1,04	6,76 ± 0,80*	6,78 ± 0,38*	6,08 ± 0,68
Cyt P450 ^c	μmol·g ^{-1(d)}	0,54 ± 0,07	0,51 ± 0,09	0,55 ± 0,14	0,50 ± 0,07	0,57 ± 0,08

^a Plasma; ^b Erytrocyty; ^c Játra; ^d Hodnota je vyjádřena na 1 g proteinu; ^e Hodnota je vyjádřena na 1 g hemoglobinu, * Hodnota je statisticky významně odlišná od kontrolní skupiny ($p < 0,05$).

5.2.3.5 Stanovení SG/DHSG a CH/DHCH v biologickém materiálu

Stanovení SG, CH, DHSG a DHCH bylo prováděno pomocí metody HPLC/MS-Q v trusu, plasmě, moči a vybraných orgánech. V moči všech zvířat nebyly alkaloidy nalezeny. Vzhledem k rychlé eliminaci nebyly alkaloidy detekovány ani v plasmě zvířat krmených dietou obsahující Sangrovit. Ve všech orgánech zvířat krmených dietou obsahující *sanguiritrin* nebo 14000 ppm Sangrovitu byl nalezen DHSG. DHSG, CH a DHCH byly nalezeny ve střevě všech testovaných skupin. V játrech skupiny zvířat

krmené *sanguiritrinem* byly nalezeny SG, CH, DHSG a DHCH. Všechny alkaloidy byly nalezeny v trusu (tab. 16).

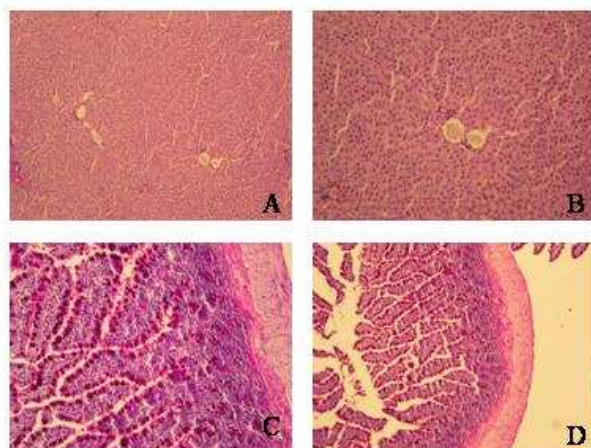
Tabulka 16. Distribuce SG, CH, DHSG a DHCH v trusu, plasmě a orgánech.

Skupiny	2		3		4		5	
	100 ppm Sangrovit		7000 ppm Sangrovit		14000 ppm Sangrovit		600 ppm <i>sanguiritrin</i>	
Vzorek	SG	DHSG	SG	DHSG	SG	DHSG	SG	DHSG
	CH	DHCH	CH	DHCH	CH	DHCH	CH	DHCH
	(ng·g ⁻¹)	(ng·g ⁻¹)	(ng·g ⁻¹)	(ng·g ⁻¹)	(ng·g ⁻¹)	(ng·g ⁻¹)	(ng·g ⁻¹)	(ng·g ⁻¹)
Trus	2616 ± 382	n.d.	76160 ± 8456	2680 ± 347	212160 ± 2703	4521 ± 219	273333 ± 38724	73310 ± 5230
	1560 ± 184	n.d.	18592 ± 1274	2107 ± 196	53120 ± 2678	4309 ± 452	52875 ± 9609	6120 ± 1092
Plasma ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.k.	n.d.	0,33 ± 0,11
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.k.	0,12 ± 0,14	n.d.
Játra	n.d.	n.d.	n.d.	0,04 ± 0,02	n.d.	0,51 ± 0,22	2,32 ± 1,13	0,44 ± 0,25
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,59 ± 2,66	1,93 ± 1,57
Ledviny	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,22 ± 0,04	n.d.	1,14 ± 0,52
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sval	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,08 ± 0,03	n.d.	0,14 ± 0,09
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Srdce	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,07 ± 0,02	n.d.	3,81 ± 0,76
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Jazyk	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,10 ± 0,05	n.d.	58,25 ± 18,97
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Střevo	n.d.	0,04 ± 0,02	n.d.	1,15 ± 0,42	n.d.	2,56 ± 0,64	n.d.	9,09 ± 1,43
	0,02 ± 0,01	7,31 ± 2,65	3,96 ± 1,23	32,23 ± 7,85	8,24 ± 4,48	91,63 ± 29,11	15,64 ± 8,63	135,95 ± 103,69

^a μg·ml⁻¹ plasmy; n.d. – nebyl detekován; n.k. – nebyl kvantifikován

5.2.3.6 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na morfologii tkání

U žádné ze skupin zvířat krmených standardní dietou nebo dietami s obsahem Sangrovitu nebo *sanguiritrinu* nebyly pozorovány morfologické změny v játrech, srdci, ledvinách, tenkém střevě a jazyku. Na obrázku 29 jsou uvedeny vybrané tkáně (játra a tenké střevo) zvířat z kontrolní skupiny a skupiny krmené dietou obsahující 14000 ppm Sangrovitu. Fotografie byly vybrány na základě pozorovaných změn parametrů oxidačního stresu v játrech (SOD a GSH). Mikroskopické změny jater nebyly pozorovány.



Obrázek 29. Vybrané fotografie jater a tenkého střeva kontrolních zvířat a zvířat krmených dietou s obsahem 14000 ppm Sangrovitu (A a D-zvětšeno 40×; B a C-zvětšeno 60×). Játra (A) a tenké střevo (C) kontrolních zvířat, játra (B) a tenké střevo (D) zvířat krmených dietou s obsahem 14000 ppm Sangrovitu.

5.2.4 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na zánět tlustého střeva

V experimentu byla sledována schopnost Sangrovitu či *sanguiritrinu* snížit poškození střeva potkanů vyvolané dextransulfátem sodným (DSS). Potkani byli 14 dní krmeni standardní dietou (skupina 1 a skupina 5) a dietami obsahujícími 500 ppm Sangrovitu (skupina 2), 15000 ppm Sangrovitu (skupina 3) a 600 ppm *sanguiritrinu* (skupina 4). Potkanům ve skupinách 2-5 byl druhý týden experimentu podáván 5% DSS ve vodě. V průběhu experimentu byl sledován zdravotní stav zvířat a testem okultního krvácení stanovována krev ve stolici. Tři zvířata krmená dietou s obsahem 15000 ppm Sangrovitu během experimentu uhynula.

5.2.4.1 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na spotřebu krmiva, celkovou hmotnost a hmotnost orgánů

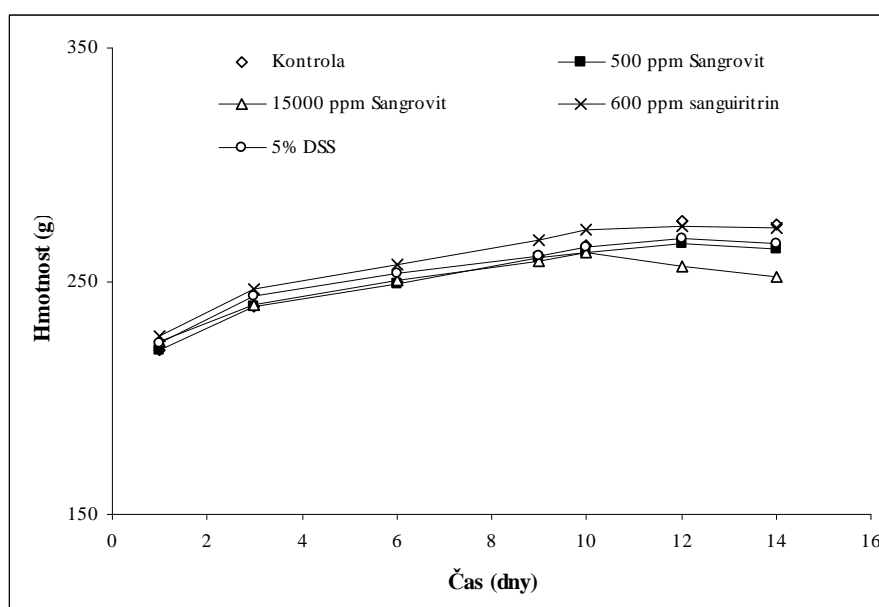
Denní spotřeba krmiva se pohybovala okolo 18 g/den u všech skupin. Denní dávka SG byla pro skupinu 2 v průměru 0,6 mg/den/potkan, pro skupinu 3 byla 19,3 mg/den/potkan a pro skupinu 4 byla 19,8 mg/den/potkan. Na obrázku 30 jsou zaznamenány růstové charakteristiky zvířat. Od 12. dne experimentu bylo u zvířat, kterým byl podáván 5% DSS, pozorováno statisticky nevýznamné snížení hmotnosti. U skupiny zvířat krmených dietou s obsahem 15000 ppm Sangrovitu byl pozorován statisticky významně nižší váhový přírůstek v porovnání se skupinami 2 a 4 (tab. 17). Po ukončení experimentu

nebyly pozorovány makroskopické změny orgánů. Hmotnost jater byla statisticky významně vyšší a délka střeva statisticky významně nižší ve všech skupinách zvířat v porovnání s kontrolní skupinou. Hmotnost slepého střeva byla statisticky významně vyšší u skupin zvířat krměných dietou obsahující Sangrovit v porovnání s kontrolní skupinou (tab. 17).

Tabulka 17. Celková hmotnost, hmotnost orgánů a délka střeva.

Skupiny	1	2	3	4	5
	Kontrola	500 ppm Sangrovit	15000 ppm Sangrovit	600 ppm <i>sanguiritrin</i>	5 % DSS
Hmotnost (g)				<i>sanguiritrin</i>	
Celková hmotnost	274,6 ± 18,3	264,1 ± 17,4	253,0 ± 21,1	272,6 ± 22,5	266,3 ± 22,2
Váhový přírůstek	54,6 ± 10,5	43,9 ± 12,6*	30,9 ± 15,6*#	45,9 ± 15,4	42,6 ± 11,4
Játra	7,22 ± 0,64	8,11 ± 0,79*	8,12 ± 1,28	8,37 ± 0,81*	7,88 ± 1,08
Slepé střevo	1,27 ± 0,11	1,53 ± 0,26*	1,56 ± 0,24*	1,48 ± 0,22*	1,56 ± 0,27*
Hmotnost orgánů/celková hmotnost (%)					
Játra	2,62 ± 0,11	3,07 ± 0,25*	3,22 ± 0,40*	3,08 ± 0,25*	2,95 ± 0,22*
Slepé střevo	0,46 ± 0,05	0,58 ± 0,11*	0,62 ± 0,08*#	0,54 ± 0,08	0,58 ± 0,10*
Délka střeva (cm)	19,2 ± 0,6	14,7 ± 2,1*	15,0 ± 1,6*	15,3 ± 1,5*	15,8 ± 2,0*

Celková hmotnost i hmotnost orgánů byly vyjádřeny jako průměr ± SD z 5ti zvířat (skupina 1), 20ti zvířat (skupina 2 a 4), 17ti zvířat (skupina 3) a 10ti zvířat (skupina 5). Hmotnosti orgánů byly vztaženy na celkovou hmotnost zvířete. * Hodnota je statisticky významně odlišná od kontrolní skupiny 1 ($p < 0,05$). # Hodnota je statisticky významně odlišná od skupiny 4 ($p < 0,05$), × hodnota je statisticky významně odlišná od skupiny 3 ($p < 0,05$).



Obrázek 30. Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na hmotnost potkanů.

5.2.4.2 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na hematologické parametry

Ve vzorcích krve byly sledovány následující parametry: hematokrit, hemoglobin, počet erytrocytů, leukocytů a trombocytů a střední objem erytrocytů. U měřených hodnot byly prokázány statisticky významně zvýšené hladiny leukocytů a snížené hladiny hemoglobinu a hematokritu ve všech skupin zvířat v porovnání s kontrolní skupinou. Zvířata krmená dietami s obsahem Sangrovitu měla statisticky významně sníženou hladinu erytrocytů v porovnání s kontrolní skupinou (tab. 18). Snížené hladiny hemoglobinu a hematokritu vypovídaly o ztrátách krve poškozenou sliznicí střeva, což bylo opakovaně prokázáno testem okultního krvácení.

Tabulka 18. Hematologické parametry.

Skupiny		1	2	3	4	5
		Kontrola	500 ppm Sangrovit	15000 ppm Sangrovit	600 ppm <i>sanguiritrin</i>	5% DSS
Parametr	Jednotka					
Leukocyty	$\text{giga}\cdot\text{l}^{-1}$	$2,94 \pm 0,41$	$5,48 \pm 3,35^*$	$5,77 \pm 2,79^*$	$5,32 \pm 3,37^*$	$5,33 \pm 2,18^*$
Erytrocyty	$\text{tera}\cdot\text{l}^{-1}$	$8,74 \pm 0,47$	$6,62 \pm 2,19^*$	$6,73 \pm 2,17^*$	$7,19 \pm 2,14$	$7,32 \pm 2,16$
Trombocyty	$\text{giga}\cdot\text{l}^{-1}$	$719,6 \pm 70,9$	$780,4 \pm 89,7$	$753,4 \pm 232,3$	$824,6 \pm 64,8^*$	$799,9 \pm 91,8$
Hemoglobin	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$164,0 \pm 8,7$	$121,6 \pm 36,3^*$	$133,5 \pm 48,6^*$	$131,2 \pm 35,6^*$	$133,2 \pm 36,2^*$
Hematokrit	l	$0,49 \pm 0,21$	$0,37 \pm 0,12^*$	$0,37 \pm 0,12^*$	$0,39 \pm 0,12^*$	$0,41 \pm 0,12^*$

* Hodnota je statisticky významně odlišná od kontrolní skupiny 1 ($p < 0,05$).

5.2.4.3 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na parametry oxidačního stresu a markery zánětu

Ve vzorcích plasmy byly stanoveny hladiny CRP, SH-skupin a TBARS. Ve vzorcích erytrocytů byly měřeny hladiny TBARS, GSH a aktivity GST a ve vzorcích střeva byly měřeny hladiny TBARS, GSH a aktivity GST a MPO. U zvířat skupiny 5 byla prokázána statisticky významně zvýšená hladina GSH v erytrocytech v porovnání se skupinou 1. Zvířata ostatních skupin měla tuto hladinu srovnatelnou s kontrolní skupinou. Aktivita MPO byla statisticky významně zvýšena v skupinách 2, 4 a 5 v porovnání s kontrolní skupinou. Statisticky významně nižší aktivitu MPO měla zvířata skupin 2 a 3 v porovnání se skupinou 5, které byla podávána standardní dieta a 5% DSS. Zvířata skupiny 4 měla nejvyšší aktivitu MPO. Zvířata krmená dietou s obsahem 15000 ppm Sangrovitu vykazovala statisticky významně vyšší hladinu TBARS a vyšší aktivitu GST ve střevě v porovnání se skupinou 4 (tab. 19).

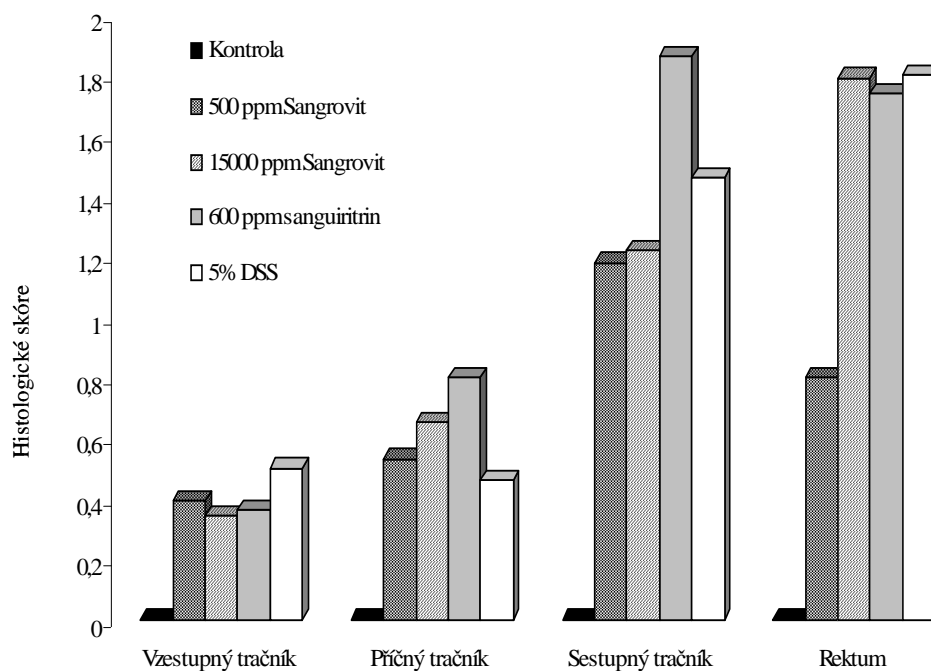
Tabulka 19. Parametry oxidačního stresu v erytrocytech, plasmě a střevě.

Skupiny		1	2	3	4	5
Parametr	Jednotka	Kontrola	500 ppm Sangrovit	15000 ppm Sangrovit	600 ppm <i>sanguiritrin</i>	5% DSS
GST ^a	nkat·g ⁻¹	2,79 ± 1,21	2,61 ± 1,18	3,25 ± 0,77	2,59 ± 0,77	2,91 ± 1,10
GSH ^a	mmol·g ⁻¹	160,72 ± 54,27	217,99 ± 85,30	203,91 ± 77,45	203,74 ± 90,45	305,71 ± 206,24*
TBARS ^a	nmol·g ⁻¹	725,46 ± 161,31	569,89 ± 482,34	736,45 ± 513,94	668,12 ± 416,59	749,87 ± 655,54
TBARS ^b	nmol·g ⁻¹	33,06 ± 10,00	31,04 ± 20,60	31,94 ± 15,97	30,15 ± 14,76	37,73 ± 23,09
SH-skupiny ^b	μmol·l ⁻¹	7,92 ± 0,54	15,62 ± 34,49	7,79 ± 1,68	9,46 ± 5,08	8,64 ± 1,88
MPO ^c	nkat·g ⁻¹	0,33 ± 0,07	0,77 ± 0,40*^{*,×}	0,55 ± 0,34^{#,*}	1,13 ± 0,61^{*,*}	0,86 ± 0,31*
TBARS ^c	nmol·g ⁻¹	210,81 ± 102,08	349,22 ± 478,57	645,76 ± 880,45[#]	236,10 ± 285,70	559,94 ± 822,94
GSH ^c	mmol·g ⁻¹	292,92 ± 134,15	325,59 ± 27,26	431,92 ± 252,69	361,02 ± 268,48*	429,97 ± 110,83
GST ^c	nkat·g ⁻¹	2,25 ± 0,92	3,05 ± 2,47	4,99 ± 3,87[#]	2,68 ± 2,20	3,01 ± 1,53

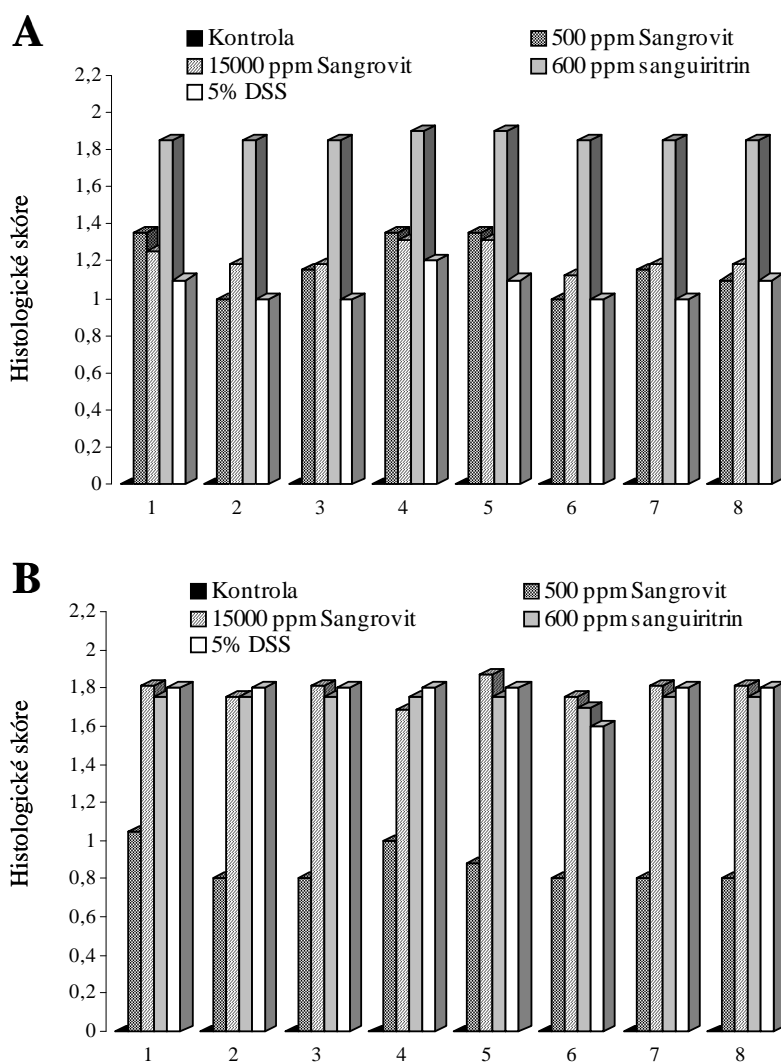
^a Erytrocyty; ^b Plasma; ^c Střevo; ^d Hodnota je vyjádřena na 1 g hemoglobinu; ^e Hodnota je vztažena na 1 g proteinu, * hodnota je statisticky významně odlišná od skupiny 1, # hodnota je statisticky významně odlišná od skupiny 4 ($p < 0,05$), × hodnota je statisticky významně odlišná od skupiny 3 ($p < 0,05$), • hodnota je statisticky významně odlišná od skupiny 5.

5.2.4.4 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na morfologii střeva

Tenké střevo (část vstupující do slepého střeva) a čtyři úseky tlustého střeva (vzestupný, příčný a sestupný tračník a rektum) byly podrobeny histologické analýze. U žádné z testovaných skupin zvířat nebyly nalezeny morfologické změny tkáně tenkého střeva. Ve vzestupném a příčném tračníku bylo u zvířat skupin 2-5 pozorováno mírné poškození struktury střeva srovnatelné pro všechna zvířata. V sestupném tračníku zvířat skupin 2-5 bylo pozorováno středně těžké poškození struktury střeva (obr. 31). Skupina zvířat, které byl podáván 5% DSS měla těžké, difúzní poškození sliznice tlustého střeva v oblasti rekta. Ve skupině zvířat krměných 500 ppm Sangrovitu bylo pozorováno zlepšení morfologie střeva v oblasti rekta a zvířata vykazovala pouze mírné ložiskové změny tlustého střeva. *Sanguiritrin* (600 ppm) a Sangrovit (15000 ppm) v dietě nesnižovaly v oblasti rekta poškození struktury střeva vyvolané 5% DSS (obr. 32). Ve vzestupném, příčném a sestupném tračníku nebyl pozorován vliv Sangrovitu ani *sanguiritrinu* na poškození střeva (obr. 31). Dávka 500 ppm Sangrovitu snižovala v oblasti rekta poškození způsobené DSS o 45 %. Celkové histologické skóre z průměrných hodnot osmi hodnocených parametrů všech částí tlustého střeva je znázorněno na obrázku 31.



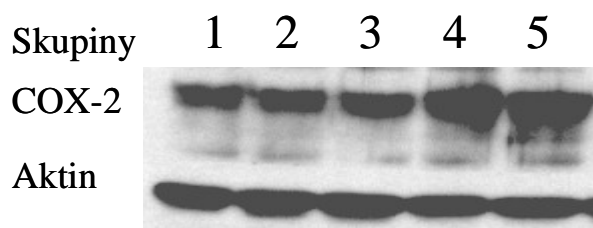
Obrázek 31. Celkové histologické skóre tlustého střeva. Výsledky jsou průměrnými hodnotami z osmi sledovaných parametrů (destrukce epitelu, dilatace krypt, redukce pohárkových buněk, zánětlivý infiltrát, edém, kongesce, tvorba kryptových abscesů, atrofie).



Obrázek 32. Histologické skóre částí tlustého střeva. Histologické skóre sestupného tračníku (A) a rekta (B). Destrukce epitelu (1), dilatace krypt (2), redukce pohárkových buněk (3), zánětlivý infiltrát (4), edém (5), kongesce (6), tvorba kryptových abscesů (7), atrofie (8).

5.2.4.5 Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na expresi COX-2

Expresie proteinů byla stanovena pomocí Western blotu ze směsných vzorků tlustého střeva. Zvířata, kterým byl podáván 5% DSS, měla statisticky významně zvýšenou hladinu COX-2. *Sanguiritrin* tuto zvýšenou hladinu nesnižoval, zatímco obě skupiny zvířat krmené dietou obsahující Sangrovit statisticky významně snižovaly hladinu COX-2 indukovanou DSS (obr. 33).



Obrázek 33. Vliv Sangrovitu a *sanguiritrinu* na expresi COX-2.

Kontrolní skupina (1), skupina krmená dietou s obsahem 500 ppm Sangrovitu (2), skupina krmená dietou s obsahem 15000 ppm Sangrovitu (3), skupina krmená dietou s obsahem 600 ppm *sanguiritrinu*, skupina krmená 5% DSS (5).

5.2.4.6 Stanovení SG, CH, DHSG a DHCH v tlustém střevě

Stanovení alkaloidů bylo prováděno pomocí metody HPLC/MS-IT ve vzorcích tlustého střeva. Tlusté střevo všech testovaných skupin zvířat obsahovalo v největší míře SG (tab. 20).

Tabulka 20. Distribuce SG, CH, DHSG a DHCH v tlustém střevě

Skupiny	2	3	4
	500 ppm	15000 ppm	600 ppm
Koncentrace ng·g ⁻¹	Sangrovit	Sangrovit	<i>sanguiritrin</i>
SG	6,81	186,49	153,52
CH	0,98	26,43	19,69
DHSG	0,36	11,19	5,87
DHCH	0,6	20,25	22,32

6. DISKUSE

Na světovém trhu je několik přípravků humánní a veterinární medicíny k zevnímu a vnitřnímu použití, které obsahují kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy. I když jsou dlouhodobě využívány, nacházíme v literatuře nové informace o jejich terapeutických, ale i nežádoucích účincích. S podivem je však velmi málo známo o jejich metabolických přeměnách u savců a jejich bezpečnosti při dlouhodobé topické či orální aplikaci.

V disertační práci byla pozornost zaměřena na metabolismus SG, CH a jejich dihydroderivátů. Literární údaj, že SG je metabolizován na toxický metabolit 3,4-benzakridin (Tandon *et al.*, 1993), nebyl potvrzen (Psotova *et al.*, 2006a; Food and Drug Administration, 2003). V *in vitro* a *in vivo* experimentech bylo prokázáno, že se SG metabolizuje na dihydroderivát DHSG (Deroussent *et al.*, 2010; Psotova *et al.*, 2006a). Deroussent *et al.* se zabývali studiem metabolických přeměn SG a CH na potkaních jaterních mikrosomech s neindukovanými a indukovanými formami cytochromu P450, na buněčné linii Ad293 transfekované lidskými rekombinantními cytochromy P450 a u potkana po jednorázové perorální aplikaci. Na modelu mikrosomů detekovali jako dominantní metabolit DHSG a dále našli 6 oxidačních metabolitů SG (fáze I) s předpokládanou strukturou. V moči potkanů byly nalezeny metabolity SG konjugované s kyselinou glukuronovou. Jako možné cesty metabolismu SG byly navrženy i) redukce za tvorby dihydroderivátů, ii) hydroxylace na kruhu B za účasti cytochromu P450 1A1/2, iii) otevření heterocyklu na kruhu D a následná *O*-demethylace methoxyskupiny za vzniku 7,8-dihydroxysanguinarinu, iv) otevření heterocyklů na kruhu A a D.

Naše výsledky získané na lidských hepatocytech potvrdily data publikovaná v literatuře. Hlavní metabolickou přeměnou SG byla redukce na DHSG. Také CH byl redukován na DHCH. Rychlost metabolizace SG a CH byla odlišná. Po 2 hodinové inkubaci bylo 24 % CH redukováno na DHCH, zatímco u SG to bylo pouze 8 %. Mimo dihydroderivátů byly v hepatocytech inkubovaných s SG a CH nalezeny další metabolity, zejména metabolit s *m/z* 336. Množství ostatních metabolitů bylo nízké a podléhaly následným metabolickým přeměnám: *O*-demethylaci, hydroxylaci a konjugačním reakcím. Nalezené látky jsou pravděpodobně strukturně shodné s metabolity publikovanými Deroussent *et al.* (2010). Předpokládáme, že jak z SG, tak z CH může vznikat až 12 metabolitů. Ke strukturní identifikaci metabolitů nemáme odpovídající standardy. Pokusy o jejich syntézu byly zatím neúspěšné.

Metabolické přeměny DHSG a DHCH nebyly doposud studovány. My jsme zjistili, že v lidských hepatocytech dochází k zpětné oxidaci 3-5 % dihydroderivátů. Tyto výsledky jsou ve shodě s nálezem SG v játrech potkanů, kteří byli krmeni 90 dní dietou s různými koncentracemi DHSG. Mechanismus oxidace DHSG na SG nebyl zatím vysvětlen, ale předpokládáme, že se na oxidaci mohou podílet nespecifické jaterní oxidoreduktasy. Další možnou skutečností je oxidace dihydroderivátů vzdušným kyslíkem v průběhu přípravy vzorku pro HPLC analýzu.

Vzhledem k rozdílným fyzikálně chemickým vlastnostem SG a DHSG vs. CH a DHCH by se daly očekávat rozdíly v rychlosti prostupu těchto látek do hepatocytů. Ze získaných dat je zřejmé, že všechny tyto alkaloidy vstupují, případně se váží na povrch hepatocytu, stejně intenzivně.

Jak bylo zmíněno v úvodu, SG a CH jsou vzhledem k přítomnosti iminiové vazby reaktivní molekuly interagující s SH-peptidy a proteiny (enzymy, receptory a přenašeče) a tak ovlivňují řadu signálních drah, včetně apoptózy. Vzhledem k tomu, že jsou SG a CH savci přeměňovány na dihydroderiváty, je otázkou, zda tyto dihydroderiváty ovlivňují metabolické děje v organismu obdobným způsobem jako SG a CH. Další část disertační práce se zaměřila na stanovení cytotoxicity DHSG a DHCH na potkaních hepatocytech a na buněčné linii HepG2 v porovnání s SG a CH. K posouzení vlivu testovaných látek na životnost buněk byla použita metoda založená na redukci tetrazoliových solí buněčnými oxidoreduktasami (MTT test) a sledování poškození buněčné membrány měřením aktivity uvolněné laktátdehydrogenasy do extracelulárního prostředí. Již po 3 hodinové inkubaci SG a CH ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) s oběma typy buněk byla zaznamenána toxicita. Výsledky se shodovaly s údaji, které publikovali Zdařilová *et al.* (2006). Ukázalo se, že dihydroderiváty vykazovaly mírnou toxicitu při nejvyšší použité koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na obou typech buněk až po 24 hodinové inkubaci. Vyšší koncentrace nebyly testovány z důvodů jejich omezené rozpustnosti. Weerasinghe *et al.* (2001) a Wan *et al.* (2008) zjistili, že SG a CH vyvolávají apoptózu indukci proapoptotického proteinu Bax a inhibicí antiapoptotického proteinu Bcl-2, které jsou zapojeny do regulace aktivity kaspasy-3. V této práci jsme studovali zda DHSG a DHCH mohou mít proapoptotický účinek. Výsledky experimentů ukázaly, že DHSG a DHCH v $10\times$ vyšších koncentracích, v porovnání s SG a CH, neaktivovaly proces apoptózy prostřednictvím kaspasy-3. Naopak SG a CH indukovaly aktivaci kaspasy-3 v obou typech použitých buněk, což odpovídá literárním údajům.

Další část práce byla zaměřena na měření farmakokinetických dat DHSG u potkana. DHSG byl po aplikaci gastrickou sondou rychle vstřebán a maximální koncentrace v plasmě bylo dosaženo za 1-2 h po podání. Mimo tohoto koncentračního maxima bylo pozorováno i několik dalších maxim, svědčících o enterohepatální cirkulaci DHSG. Obdobný trend měl koncentrační vzestup DHSG v játrech. Po 18 h od aplikace nebyl DHSG nalezen v plasmě ani játrech. Pro potvrzení, že DHSG podstupuje enterohepatální cirkulaci, byl po jeho podání podvázán žlučovod. Došlo ke zpomalení resorpce DHSG a maximální plasmatické koncentrace bylo dosaženo po 5 h. DHSG byl rychleji vyloučen z organismu, již po 8 h nebyl nalezen v plasmě.

Informace o účincích DHSG na živý organismus jsou rozporuplné. El gamal *et al.* (2007) uvádí, že olej a extrakt z *A. mexicana*, která obsahuje DHSG jako hlavní alkaloid, podávané v dietě po dobu 45 dní vyvolávají enteritidu, steatózu jater a poškození ledvin. Samotná semena podávaná v dávce 10 % (odpovídá 100 ppm DHSG) vyvolávala steatózu jater a enteritidu. Podobné údaje uvádí Babu *et al.* (2006), kteří argemonový olej podávali v dávce odpovídající 50 ppm DHSG. Po aplikaci došlo ke statisticky významným změnám v morfologii vybraných tkání, parametrů hematologie a klinické biochemie. Autoři připouští, že za možnou toxicitu může být zodpovědná argemonová kyselina, ne již dříve zmíněný DHSG.

Vzhledem k tomu, že v *in vitro* experimentech na buněčných kulturách jsme nepozorovali toxicitu DHSG, ověřili jsme, zda dlouhodobé podávání DHSG v dietě ovlivní vybrané parametry u potkana. DHSG byl podáván v krmivu ve stejné dávce jako u El gamal *et al.* 2007 (100 ppm) a v dávce 500 ppm po dobu 90 dní. V průběhu experimentu nebyly pozorovány nežádoucí účinky na zdravotní stav potkanů. DHSG v dietě byl zvířaty dobře snášen. Vyšší dávka DHSG vedla ke statisticky významnému zvýšení hmotnosti zvířat. DHSG v dietě neměl vliv na hmotnost orgánů, parametry hematologie a klinické biochemie. Ve studii byl sledován vliv dlouhodobého podávání DHSG na parametry oxidačního stresu. V literatuře je uváděno, že SG a CH vyvolávají tvorbu reaktivních kyslíkových forem (Matkar *et al.*, 2008). V našem experimentu jsme nepozorovali vliv DHSG na markery oxidačního stresu v plasmě, erytrocytech a játrech. Naše pozornost byla zaměřena také na možné genotoxické účinky DHSG. Stiborová *et al.* (2002) publikovali, že SG může reagovat s DNA za tvorby aduktů. Das *et al.* (2004) uvádí, že SG aplikovaný intraperitoneálně v dávce 10 mg/kg způsobuje poškození DNA kostních buněk. Naše experimenty neprokázaly genotoxicitu DHSG, nebyly nalezeny DNA adukty v játrech ani nebylo pozorováno poškození lymfocytární DNA metodou

jednobuněčné elektroforézy. Rovněž nedošlo k ovlivnění obsahu cytochromu P450. Histologické vyšetření neprokázalo změny ve struktuře tkáně jater, ledvin, srdce, tenkého střeva, svalů, dásní a jazyka. Na možné změny v morfologii dásní a jazyka vyvolané DHSG jsme se zaměřili, protože dlouhodobé používání přípravků ústní hygieny obsahující BA je spojováno s leukoplakii (Damm *et al.*, 1999). Zjistili jsme, že DHSG obsažený v dietě je vylučován z organismu především trusem. Jelikož před ukončením experimentu neměla zvířata 16-20 h přístup k dietě, nebyly v plasmě ani moči zvířat krmených nižší dávkou DHSG alkaloidy nalezeny. Ve skupině zvířat krmených dietou s obsahem 500 ppm DHSG byly nalezeny nízké hladiny DHSG, což koreluje se zjištěnými farmakokinetickými údaji. Ve tkáni střeva byl nalezen DHSG ve větším množství. Malé množství SG i DHSG bylo nalezeno v játrech. Předpokládáme, že SG může vznikat činností střevních bakterií a poté je absorbován do vnitřního prostředí a dostává se do jater. K oxidaci DHSG by mohlo také dojít působením jaterních oxidoreduktas a vzniklý SG by byl vyloučen ve formě konjugátů žlučí do střeva a dále do trusu. V neposlední řadě mohlo dojít k oxidaci DHSG vzdušným kyslíkem při zpracování vzorku na analýzu.

V mechanistických studiích a *in vivo* experimentech byly prokázány cytostatické, antimikrobiální a protizánětlivé účinky SG a CH. Především díky posledním dvěma zmíněným účinkům jsou SG a CH aktivními složkami v přípravcích ústní hygieny (*sanguiritrin*) či krmného aditiva Sangrovit. Kosina *et al.* (2004) v experimentu na prasatech nepozorovali při dlouhodobém krmení *sanguiritrinem* (5 mg/den/kg hmotnosti) žádné změny fyziologických parametrů, stejně tak Psotová *et al.* (2006b), kteří podávali *sanguiritrin* potkanům v dávce 10 mg/den/kg hmotnosti. Pokud byla u potkanů použita dávka 5-60 mg/den/kg hmotnosti, nebyl pozorován vliv na plodnost, reprodukční cyklus a vývoj plodu, obdobně pak u králíků, kterým byla podávána dávka 5-25 mg/den/kg hmotnosti (Keller *et al.*, 1998). Na druhou stranu po intraperitoneální aplikaci SG (5 mg/kg hmotnosti) bylo pozorováno vážné poškození orgánů a kostních buněk (Babu *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2004). Jiná práce uvádí, že intraperitoneální aplikace SG (0,5 mg SG/kg hmotnosti) po dobu 14 dní nevyvolala žádné známky otravy (Singh *et al.*, 2006). Je zřejmé, že způsob aplikace BA hraje významnou roli. V *in vivo* experimentu jsme se pokusili odpovědět na otázku, zda může dlouhodobé užívání Sangrovitu/*sanguiritrinu* ovlivnit biochemické parametry u testovaných zvířat a zda mohou mít příznivý účinek na organismus. Ve studii jsme se zaměřili na sledování vlivu dlouhodobého podávání Sangrovitu v dietě v dávkách 100, 7000 a 14000 ppm po dobu 90

dní. Dávka byla zvolena tak, aby převyšovala doporučenou dávku 20-70 ppm. Pro zjištění vlivu jiných komponent v Sangrovitu, než-li SG a CH, byla připravena dieta, která obsahovala SG a CH ve formě *sanguiritrinu*. *Sanguiritrin* byl podán v dávce 600 ppm a měl srovnatelný obsah SG a CH jako dávka 14000 ppm Sangrovitu. Zvířata krmená dietami s obsahem 14000 ppm Sangrovitu/600 ppm *sanguiritrinu* dostávala průměrně 55 mg SG a CH/den/kg hmotnosti. V průběhu 90ti denního experimentu byly testované diety zvířaty dobře tolerovány a nebyly pozorovány zdravotní problémy. U zvířat krmených dietou s obsahem Sangrovitu nebo *sanguiritrinu* byla tělesná hmotnost a hmotnost orgánů srovnatelná jako u zvířat krmených standardní dietou. Nebyly pozorovány změny v parametrech hematologie a klinické biochemie. Také parametry oxidačního stresu v plasmě, erytrocytech a játrech byly srovnatelné u všech skupin zvířat. Výjimkou byla skupina krmená 14000 ppm Sangrovitu, u které došlo ke zvýšení hladiny glutathionu a aktivity superoxiddismutasy v játrech. Toto zvýšení nebylo pozorováno u skupiny krmené *sanguiritrinem*, z čehož lze usuzovat, že jej mohou vyvolávat také jiné látky než SG a CH. Histologické vyšetření neprokázalo změny ve struktuře tkání jater, ledvin, srdce, jazyku ani tenkého střeva, na rozdíl od publikovaných výsledků, kdy SG podávaný ve vodě v dávce 10 mg/potkan/den vyvolal nekrotické změny tkáně jater (Dalvi *et al.*, 1985). Dále nebyl prokázán vliv na hladinu cytochromu P450 a nedošlo k poškození lymfocytární DNA a tvorbě DNA aduktů v játrech (Stiborova *et al.*, 2008). SG, CH, DHSG a DHCH byly, stejně jako v předešlém experimentu, vylučovány trusem. Dihydroderiváty DHSG a DHCH byly nalezeny ve všech analyzovaných tkáních. V játrech zvířat krmených dietou obsahující *sanguiritrin* byl nalezen SG, CH, DHSG a DHCH. Poměr alkaloidu a příslušného dihydroderivátu byl v případě SG:DHSG 5:1 a v případě CH:DHCH 2:1, z čehož lze vyvodit, že CH je metabolizován snadněji než SG. Tento nálezní potvrzuje údaje z *in vitro* metabolických studií. Ve střevech zvířat krmených jak dietou obsahující Sangrovit, tak *sanguiritrin*, byly nalezeny CH, DHSG a DHCH. SG nebyl, stejně jako v případě zvířat krmených DHSG, ve střevě detekován. DHCH byl ve střevě nalezen v 8-násobném množství než CH, což svědčí o tom, že DHCH je metabolit CH. Otázkou je, zda DHCH vzniká působením bakteriální mikroflóry nebo účinkem střevních enzymů. Vysoký obsah alkaloidů ve stěně střeva může být způsoben kumulací BA v tkáni střeva, pravděpodobně kontaktem s krmivem (trusem). Závěrem je možné říci, že dlouhodobé podávání Sangrovitu v dávce 70-140× vyšší než je doporučená denní dávka, je bezpečné.

Sangrovit je pro své antimikrobiální a protizánětlivé účinky doporučován jako možná náhrada syntetických antibiotik. Zajímalo nás tedy, zda má podávání Sangrovitu nebo *sanguiritrinu* v dietě ochranný vliv na sliznici střeva postižené zánětem. Jako model zánětu byl použit 5% dextransulfát sodný (DSS) podávaný ve vodě. DSS vyvolává vážné poškození stěny střeva, které se projevuje váhovým úbytkem zvířat, zkrácením tlustého střeva, zvýšením počtu leukocytů a zánětlivých markerů a ztrátami krve, způsobenými krvácením do stolice (Elson *et al.*, 1995). Ve studii byly použity dvě koncentrace Sangrovitu (500 a 15000 ppm) a 600 ppm *sanguiritrinu*. Dávka 600 ppm *sanguiritrinu* odpovídala obsahem SG dávce 15000 ppm Sangrovitu. Dávky byly zvoleny podle předešlých experimentů, kde nebyl pozorován toxický efekt těchto látek při dlouhodobém podávání na organismus potkana. DSS podávaný ve vodě vyvolal poškození organismu, které se projevilo zvýšením hmotnosti jater a slepého střeva, zkrácením délky střeva, změnami hematologických parametrů, zvýšením hladiny glutathionu (GSH) v erytrocytech a aktivity myeloperoxidasy (MPO) a exprese cyklooxygenasy-2 (COX-2) ve střevě. DSS způsobil těžké poškození střevní sliznice, zejména v oblasti rekta.

Bylo zjištěno, že *sanguiritrin* a Sangrovit v dávce 15000 ppm podávané v krmivu nesnižovaly poškození střeva způsobené DSS. U zvířat krmených dietou s obsahem 15000 ppm Sangrovitu a *sanguiritrinem* nedošlo k zlepšení stavu zvířat, kterým byl podáván DSS (parametry hematologie a oxidačního stresu). Dávka 500 ppm Sangrovitu způsobila statisticky významné snížení aktivity MPO a inhibici indukce COX-2 ve střevě. Nedošlo však ke zlepšení krevního obrazu. Histologický nález u zvířat krmených 500 ppm Sangrovitu potvrdil, že došlo k mírnému zlepšení zánětlivých změn střeva vyvolaných DSS, zejména v oblasti rekta (o 45 %). Histologický průkaz zlepšení je objektivnější a má větší váhu než nálezy laboratorní medicíny, např. krevního obrazu (Vieira *et al.*, 2009). Z HPLC/MS-IT analýzy bylo zjištěno, že ve tkáni tlustého střeva potkanů krmených dietou s obsahem Sangrovitu a *sanguiritrinu* byl kumulován především SG.

Naše výsledky prokázaly, že SG a CH jsou v organismu metabolizovány na netoxické dihydroderiváty, které se v organismu nekumulují a nevyvolávají nežádoucí účinky při dlouhodobém podávání. BA jsou v organismu metabolizovány na další látky, na jejichž identifikaci dále pracujeme. Vzhledem k tomu, že jsou BA součástí mnoha humánních a veterinárních přípravků, měl by být dále detailněji zkoumána jejich absorpce do vnitřního prostředí, distribuce a eliminace z organismu, jejich metabolismus a vliv na metabolické dráhy.

7. ZÁVĚRY

Disertační práce se zabývala studiem biologické aktivity SG, CH, DHSG a DHCH na vybraných buněčných modelech, jejich metabolickými přeměnami a sledováním vlivu dlouhodobého podávání DHSG, Sangrovitu a *sanguiritrinu* na vybrané fyziologické parametry potkana a vlivu Sangrovitu a *sanguiritrinu* na indukovaný zánět tlustého střeva u potkana. Ze získaných výsledků lze vyvodit následující závěry:

- Při inkubaci SG a CH s lidskými hepatocyty byly identifikovány DHSG a DHCH jako jedny z hlavních metabolitů.
- SG a CH vykazovaly časově a koncentračně závislou toxicitu na hepatomové buněčné linii HepG2 a na potkaních hepatocytech a vyvolávaly apoptosu.
- DHSG a DHCH nevykazovaly toxicitu do koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a neměly vliv na aktivaci kaspasy-3.
- Dlouhodobé podávání diety obsahující 100 a 500 ppm DHSG potkanům nemělo vliv na tělesnou hmotnost, parametry klinické biochemie a hematologie.
- DHSG nezpůsobil genotoxické poškození DNA a neměl vliv na celkový obsah cytochromů P450.
- DHSG nevyvolal strukturní změny ve tkáních jater, ledvin, srdce, tenkého střeva, svalů, jazyka a dásní.
- DHSG byl vylučován převážně trusem, v malém množství se kumuloval ve střevě a spolu s SG v játrech.
- Po podání DHSG došlo k jeho eliminaci z plasmy a jater do 18 h.
- Dlouhodobé podávání krmiva obsahujícího 100, 7000 a 14000 ppm Sangrovitu a 600 ppm *sanguiritrinu* nemělo vliv na tělesnou hmotnost, parametry klinické biochemie a hematologie.
- Sangrovit a *sanguiritrin* nezpůsobily genotoxické poškození DNA a neměly vliv na celkový obsah cytochromů P450.
- Sangrovit a *sanguiritrin* nevyvolaly strukturní změny tkání jater, ledvin, srdce, tenkého střeva a jazyku.
- Sangrovit (500 ppm) chránil sliznici tlustého střeva při zánětu vyvolaném DSS.

-
- Sangrovit (500 ppm) snižoval DSS indukovanou expresi COX-2 a aktivitu MPO ve střevě.

8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

Publikace:

1. Vrublová E., Vostálová J., Večeřa R., Klejdus B., Stejskal D., Kosina P., Zdařilová A., Svobodová A., Lichnovský V., Anzenbacher P., Dvořák Z., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: The toxicity and pharmacokinetics of dihydrosanguinarine in rat: A pilot study. *Food and Chemical Toxicology* 46(7), 2546-53 (2008). IF 2,231
2. Zdařilová A., Vrublová E., Vostálová J., Klejdus B., Stejskal D., Prošková J., Kosina P., Svobodová A., Večeřa R., Hrbáč J., Černochová D., Vičar J., Ulrichová J., Šimánek V. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology* 46(12), 3721-6 (2008). IF 2,231
3. Vacek J., Walterová D., Vrublová E., Šimánek V.: The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycles* 81(8) (2010), *in press*. IF 0,980

Publikace v recenzním řízení:

1. Vrublová E., Vostálová J., Ehrmann J., Palíková I., Vrbková J., Vacek J., Cibíček N., Večeřa R., Ulrichová J., Šimánek V.: Phyto-genetic feed additive Sangrovit modulates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Veterinární Medicína* (2010). IF 0,659

Publikace připravená k odeslání:

1. Vrublová E., Vostálová J., Šimánek V.: Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids a review of preparations for human and veterinary use. *Biomedical Papers Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*

Prezentace na konferencích:

1. Vrublová E., Zdařilová A., Vičar J., Vostálová J., Ulrichová J.: Toxicity of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine on rat hepatocytes. XI. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů. 31.1.-1.2.2007, Brno, Česká republika.
2. Vrublová E.: A 90-day toxicity study of quaternary benzo[c]phenanthridine fraction from *Macleaya cordata* in rat. Seminář MŠM 6198959216. 10.-12.5.2007, Karlov pod Pradědem, Česká republika.

3. Vrublová E., Zdařilová A., Vostálová J., Večeřa R., Ulrichová J., Šimánek V.: A subchronic oral toxicity study of dihydrosanguinarine. 6th International conference of PhD students. 12.-18.8.2007, Miskolc, Maďarsko.
4. Vrublová E.: 90-day toxicity study of animal feed additive Sangrovit[®]. Seminář MŠM 6198959216. 22.-24.5.2008, Karlov pod Pradědem, Česká republika.
5. Vrublová E.: Assessment of sanguiritrin and dihydrosanguinarine oral administration safety in a 90-day pilot experiment in rats. Studentská vědecká konference. 3.-4.9. 2008, Olomouc, Česká republika.
6. Vrublová E.: Methodological evaluation of dextran sulphate sodium – induced colitis as a model of chronic inflammation. XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. 14.-15.4.2009, Brno, Česká republika.
7. Vrublová E., Palíková I., Vostálová J., Cibíček N., Večeřa R., Ehrmann J.: Effect of *Macleaya cordata* and its extract on dextran sulfate sodium induced colitis in rats. Konference vědeckých prací studentů DSP. 8.-9.9.2009, Olomouc, Česká republika.
8. Vrublová E., Palíková I., Vostálová J., Večeřa R., Ehrmann J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Macleaya cordata* attenuates dextran sulfate induced colitis in rats. 35th Federation of European Biochemical Societies Congress. 26.6.-1.7.2010, Göteborg, Švédsko.

OSTATNÍ PRÁCE

Publikace:

1. Turánek J., Wang XF., Knötigová P., Koudelka Š., Dong LF., Vrublová E., Mahdavian E., Procházka L., Sangsura S., Vacek A., Salvatore BA., Neužil J. Liposomal formulation of alpha-tocopheryl maleamide: in vitro and in vivo toxicological profile and anticancer effect against spontaneous breast carcinomas in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15;237(3):249-57 (2009). IF 3,364
2. Jirásko R., Holčápek M., Vrublová E., Ulrichová J., Šimánek V. Identification of new phase II metabolites of xanthohumol in rat *in vivo* biotransformation of hop extracts using high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 4100-4108 (2010). IF 3,756

Prezentace na konferencích:

1. Valentová K., Holčapek M., Vrublová E., Kolářová L., Vostálová J., Ulrichová J., Šimánek V.: Hop prenylflavonoids in rat hepatocytes and microsomes: metabolism and biological activity. XXIV. Xenobiotické symposium. 22.5.-24.5.2007, Liptovský Ján, Slovensko.
2. Vrublová E., Holčapek M., Vostálová J., Švarcová I., Večeřa R., Ehrmann J., Ulrichová J., Šimánek V.: A 90-day safety study of isomerized hop extract in rats. 23.-26.9.2008, PSE Conference, Neapol, Itálie.
3. Vacek J., Kosina P., Vrublová E., Kubala M., Ulrichová J., Šimánek V.: Hmotnostní spektrometrie a vybrané fyzikálně-chemické metody ve výzkumu isochinolinových alkaloidů a jejich interakcí s DNA. 62. sjezd asociací českých a slovenských chemických společností. 28.-30.6.2010, Pardubice, Česká republika.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Internetový zdroj č. 1. <http://www.bioferm.com/cz>. citováno [10.3.2010].

Internetový zdroj č. 2. <http://www.patentstorm.us>. citováno [15.8.2009].

Internetový zdroj č. 3. <http://www.sagra4u.com>. citováno [6.1.2010].

Internetový zdroj č. 4. <http://home.hiroshima-u.ac.jp/shoyaku/photo/Japan/Hiroshima/010722Takeni.jpg>. citováno [10.3.2010].

Internetový zdroj č. 5. http://www.walmark.eu/cz/Stranky/aktualni_nabidka_produkту.aspx?nl_product_id=42. citováno [20.5.2010].

Adamkova H., Vicar J., Palasova J., Ulrichova J., Simanek V. (2004). Macleya cordata and Prunella vulgaris in oral hygiene products - their efficacy in the control of gingivitis. *Biomedical Papers Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 148, 103-105.

Angelova Z., Georgiev S., Roos W. (2002). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 20, 72-83.

Arakawa H., Clark W.G., Psenak M., Coscia C.J. (1992). Purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from elicited Sanguinaria canadensis cell cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 299, 1-7.

Babu C.K., Khanna S.K., Das M. (2006). Safety evaluation studies on argemone oil through dietary exposure for 90days in rats. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1151-1157.

Bai L.-P., Zhao Z.-Z., Cai Z., Jiang Z.-H. (2006). DNA-binding affinities and sequence selectivity of quaternary benzophenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine, and nitidine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 5439-5445.

Beers R.F., Sizer I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 195, 133-140.

Bennett R.N., Wallsgrove R.M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanism. *New Phytologist* 127, 617-633.

Bentley K.W. (1998). The isoquinoline alkaloids. *CRC Press, Boca Raton*.

Bergmeyer H.U., Bernt E. (1974). Lactate dehydrogenase: UV-assay with pyruvate and NADH. *In Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press*, pp. 574-579.

Berry M., Edwards A.M., Barrit G.J. (1991). Isolated hepatocytes, preparation, properties and application. *Elsevier, New York*.

Bongui J.B., Blanckaert A., Elomri A., Seguin E. (2005). Constituents of Zanthoxylum heitzii (Rutaceae). *Biochemical Systematic and Ecology* 33, 845-849.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Buege J.A., Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *In Methods in Enzymology* 52. Fleischer S. et al., *Academic Press, London*. pp. 302-310.

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

- Cordell G.A. (1981). Introduction to alkaloids: A biogenetic approach. *John Wiley & Sons Inc., New York*. pp. 509-517.
- Cho H.Y., Rhee H.S., Yoon S.Y., Park J.M. (2008). Differential induction of protein expression and benzophenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholtzia californica* suspension cultures by methyl jasmonate and yeast extract. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 255-262.
- Choi J.G., Kang O.H., Chae H.S., Obiang-Obounou B., Lee Y.S. *et al.* (2009). Antibacterial activity of *Hylomecon hylomeconoides* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160, 2467-2474.
- Creelman R.A., Mullet J.E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 4114-4119.
- Dalvi R.R. (1985). Sanguinarine: its potential, as a liver toxic alkaloid present in the seeds of *Argemone mexicana*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 41, 77-78.
- Damm D.D., Curran A., White D.K., Drummond J.F. (1999). Leukoplakia of the maxillary vestibule-an association with Viadent? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 87, 61-66.
- Das M., Khanna S.K. (1997). Clinicoepidemiological, toxicological, and safety evaluation studies on argemone oil. *Critical Reviews in Toxicology* 27, 273-297.
- Deroussent A., Re M., Hoellinger H., Cresteil T. (2010). Metabolism of sanguinarine in human and in rat: Characterization of oxidative metabolites produced by human CYP1A1 and CYP1A2 and rat liver microsomes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52, 391-397.
- Dinkova-Kostova A.T. (2008). Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: Versatility of effects and mechanisms. *Planta Medica* 74, 1548-1559.
- Dostál J., Slavík J. (2000). Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech. *Chemické listy* 94, 15-20.
- Druz E.A., Kashnikova T.V., Khmyrov A.V., Feldman N.B., Lutsenko S.V. (2009). Safety and efficacy of new antimicrobial liposomal drug in raising broiler chicks. *Russian Agricultural Sciences* 35, 56-58.
- Duke J.A., Ayensu E.S. (1985). Medicinal plants of China. *Springer, New York*.
- Duvoix A., Delhalle S., Blasius R., Schnekenburger M., Morceau F. *et al.* (2004). Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. *Biochemical Pharmacology* 68, 1101-1111.
- Dvořák Z., Šimánek V. (2007). *Current Drug Metabolism* 8, 173-176.
- El gamal A.A., Mohamed O.S.A., Khalid S.A. (2007). Toxicity of *Argemone mexicana* seed, seed oil and their extracts on albino rats. *Journal of Science and Technology* 8.
- Elson C.O., Sartor R.B., Tennyson G.S., Riddell R.H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109, 1344-1367.
- Eun J.P., Koh G.Y. (2004). Suppression of angiogenesis by the plant alkaloid, sanguinarine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, 618-624.

- Evelyn K.A., Malloy H.T. (1938). Micro determination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *The Journal of Biological Chemistry* 126, 655-662.
- Ewing J.F., Janero D.R. (1995). Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry* 232, 243-248.
- 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.
- Faddeeva M.D., Beliaeva T.N. (1997). Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular targets of their action. *Tsitologiya* 39, 181-208.
- 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*. *Phytochemistry* 62, 491-500.
- Food and Drug Administration (2003). 21 CFR Part 356 - Oral Health Care Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Antigingivitis/Antiplaque Drug Products; Establishment of a Monograph.
- Fotie J., Bohle D.S., Olivier M., Gomez M.A., Nzimiro S. (2007). Trypanocidal and antileishmanial dihydrochelerythrine derivatives from *Garcinia lucida*. *Journal of Natural Products* 70, 1650-1653.
- Fox T.S. (2008). Discussion of and clinical guide for: the treatment of neoplasm, proud flesh and warts with sanguinarine and related isoquinoline alkaloids.
- Franz C. (2005). Assessment of Plants/Herbs, Plant/Herb extracts and their naturally or synthetically produced components as "additives" for use in animal production.
- Gakunju D.M., Mberu E.K., Dossaji S.F., Gray A.I., Waigh R.D. *et al.* (1995). Potent antimalarial activity of the alkaloid nitidine, isolated from a Kenyan herbal remedy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 2606-2609.
- Gudev D., Popova-Ralcheva S., Moneva P., Bonovska M., Valchev G. *et al.* (2004). Effect of supplemental Sangrovit on some biochemical indices and leukocytes phagocytic activity in growing pigs. *Archiva Zootechnica* 7, 19-26.
- Haider G., Kislinger T., Kutchan T.M. (1997). Barbiturate induced benzophenanthridine alkaloid formation proceeds by gene transcript accumulation in the California poppy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241, 606-610.
- Halstead C.W., Forster P.I., Waterman P.G. (2006). Alkaloids from the stem bark of an Australian population of *Zanthoxylum ovalifolium*. *Natural Product Research* 20, 940-945.
- Harborne J.B., Baxter H. (1997). Dictionary of plant toxins. *John Wiley & Sons, Inc., New York*.
- Heil M., Bostock R.M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annales Botanici* 89, 503-512.
- Herbert J.M., Augereau J.M., Gleye J., Maffrand J.P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172, 993-999.

- Howell C.R., Stipanovic R.D., Bell A.A. (1972). Dihydrosanguinarine, a product of sanguinarine detoxification by *Verticillium dahliae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2, 364-370.
- Hu J., Zhang W.-D., Shen Y.-H., Zhang C., Xu L. *et al.* (2007). Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 114-117.
- Hu J., Zhang W.D., Liu R.H., Zhang C., Shen Y.H. *et al.* (2006). Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC, and their analgesic and anti-inflammatory activities. *Chemistry & Biodiversity* 3, 990-995.
- Hu M.L. (1994). Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In *Methods in Enzymology* 233. Prior W. A., *Academic Press, London*. pp. 380-385.
- Ignatov A., Neuman M.C., Barg R., Krueger R.J., Coscia C.J. (1997). Immunoblot analyses of the elicited *Sanguinaria canadensis* enzyme, dihydrobenzophenanthridine oxidase: evidence for resolution from a polyphenol oxidase isozyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 347, 208-212.
- Ishikawa T. (2001). Benzo[c]phenanthridine bases and their antituberculosis activity. *Medicinal Research Reviews* 21, 61-72.
- Janovska M., Kubala M., Simanek V., Ulrichova J. (2010). Interaction of sanguinarine and its dihydroderivative with the Na(+)/K(+)-ATPase. Complex view on the old problem. *Toxicology Letters* 196, 56-59.
- Jialal I., Devaraj S., Venugopal S.K. (2004). C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* 44, 6-11.
- Jullian V., Boudry G., Georges S., Maurel S., Sauvain M. (2006). Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhiofolium* Lam. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 348-353.
- Keller K.A., Meyer D.L. (1989). Reproductive and developmental toxicological evaluation of sanguinaria extract. *Journal of Clinical Dentistry* 1, 59-66.
- Klein M., Roos W. (2009). Handling dangerous molecules: transport and compartmentation of plant natural products. In *Plant-derived Natural Products*. Osbourn A. E. *et al.*, *Springer Science+Business Media, LLC*, pp. 253-255.
- Ko F.N., Chen I.S., Wu S.J., Lee L.G., Haung T.F. *et al.* (1990). Antiplatelet effects of chelerythrine chloride isolated from *Zanthoxylum simulans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1052, 360-365.
- Kohen R., Vellaichamy E., Hrbac J., Gati I., Tirosh O. (2000). Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radical Biology & Medicine* 28, 871-819.
- Kosina P., Gregorova J., Gruz J., Vacek J., Kolar M. *et al.* (2010). Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia*, in press.
- Kosina P., Walterova D., Ulrichova J., Lichnovsky V., Stiborova M. *et al.* (2004). Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology* 42, 85-91.
- Kovář J., Stejskal J., Paulová, H. (1986). Reduction of quaternary benzophenanthridine alkaloids by NADH and NADPH. *Collection Czechoslovak Chem. Commun* 51.

- Krane B.D., Fagbule M.O., Shamma M., Gozler B. (1984). The benzophenanthridine alkaloids. *Journal of Natural Products* 47, 1-43.
- Krueger D., Gruber L., Buhner S., Zeller F., Langer R. *et al.* (2009). The multi-herbal drug STW 5 (Iberogast (R)) has prosecretory action in the human intestine. *Neurogastroenterology & Motility*.
- Kutchan T.M. (1996). Heterologous expression of alkaloid biosynthetic genes-a review. *Gene* 179, 73-81.
- Kutchan T.M. (1998). Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In *The Alkaloids Chemistry and Pharmacology* 50. Cordell G. A., *Academic Press, London*. pp. 258-316.
- Larsen A.K., Grondard L., Couprie J., Desoize B., Comoe L. *et al.* (1993). The antileukemic alkaloid fagaronine is an inhibitor of DNA topoisomerases I and II. *Biochemical Pharmacology* 46, 1403-1412.
- Levchik E., Aboiants R.K., Istranov L.P. (1999). Method of protecting of sutures in the stomach and intestines. *Khirurgiia (Mosk)*, 13-15.
- Liu H., Wang J., Zhao J., Lu S., Wang J. *et al.* (2009). Isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* active against plant microbial pathogens. *Natural Product Communications* 4, 1557-1560.
- Ma W.G., Fukushi Y., Tahara S., Osawa T. (2000). Fungitoxic alkaloids from Hokkaido *Papaveraceae*. *Fitoterapia* 71, 527-534.
- Mackraj I., Govender T., Gathiram P. (2008). Sanguinarine. *Cardiovascular Therapeutics* 26, 75-83.
- Mahady G.B., Liu C., Beecher W.W. (1998). Involvement of protein kinase and G proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 48, 93-102.
- Maiti M., Kumar G.S. (2006). Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological perspectives. *Medicinal Research Reviews* 27, 649-695.
- Marquez L.A., Dunford H.B. (1997). Mechanism of the oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determined by transient- and steady-state kinetics. *Biochemistry* 36, 9349-9355.
- Matkar S. S. Wrischnik L. A. Hellmann-Blumberg U. (2008) Production of hydrogen peroxide and redox cycling can explain how sanguinarine and chelerythrine induce rapid apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 477, 43-52.
- McDaniel S., Goldman G.D. (2002). Consequences of using eschariotic agents as primary treatment for nonmelanoma skin cancer. *Archives of Dermatology* 138, 1593-1596.
- Meng F., Zuo G., Hao X., Wang G., Xiao H. *et al.* (2009). Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates. *Journal of Ethnopharmacology* 125, 494-496.
- Militante J.D., Lombardini J.B. (1998). Effect of taurine on chelerythrine inhibition of calcium uptake and ATPase activity in the rat retina. *Biochemical Pharmacology* 55, 557-565.
- Moldéus P., Högberg J., Orrenius S. (1978). Isolation and use of liver cells. In *Methods in Enzymology* 52. Fleischer S. *et al.*, *Academic Press, London*. pp. 60-71.

- Munro I.C., Delzell E.S., Nestmann E.R. (1999). Viadent usage and oral leukoplakia: a spurious association. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 30, 182-196.
- Nakanishi T., Masuda A., Suwa M., Akiyama Y., Hoshino-Abe N. *et al.* (2000). Synthesis of derivatives of NK109, 7-OH benzo[c]phenanthridine alkaloid, and evaluation of their cytotoxicities and reduction-resistant properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10, 2321-2313.
- Navarro V., Delgado G. (1999). Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 223-226.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1237-1247.
- Newman S.E., Roll M.J., Harkrader R.J. (1999). A naturally occurring compound for controlling powdery mildew of greenhouse roses. *Hortscience* 34, 686-689.
- Ochu E.E., Rothwell N.J., Waters C.M. (1998). Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 70, 2637-2640.
- Omura T., Sato R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *The Journal of Biological Chemistry* 239, 2379-2385.
- Pang J.X., Ma R.Q., Liu L.M., Jiang Y.P., Sun L.S. (2005). Total alkaloid of *Macleaya cordata*: in vitro cytotoxic effect on Hep3B cells and in vivo antitumor effect in mice. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 25, 325-328.
- Phillips S.D., Castle R.N. (1981). A review of the chemistry of the antitumor benzo[c]phenanthridine alkaloids nitidine and fagaronine and of the related antitumor alkaloid coralyne. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 18, 223-232.
- Pichard L., Gillet G., Fabre I., Dalet-Beluche I., Bonfils C. *et al.* (1990). Identification of the rabbit and human cytochromes P-450III_A as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem. *Drug Metabolism and Disposition* 18, 711-719.
- Psotova J., Klejdus B., Vecera R., Kosina P., Kuban V. *et al.* (2006a). A liquid chromatographic-mass spectrometric evidence of dihydrosanguinarine as a first metabolite of sanguinarine transformation in rat. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 830, 165-172.
- Psotová J., Večeřa R., Zdařilová A., Anzenbacherová E., Kosina P. *et al.* (2006b). Safety assessment of sanguiritrin alkaloid fraction of *Macleaya cordata* in rats. *Veterinární Medicína* 51, 145-155.
- Queiroz-Junior C.M., Pacheco C.M.F., Fonseca A.H., Klein A., Caliarí M.V. *et al.* (2009). Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. *Mediators of Inflammation* 2009, ID 760837.
- Rawling M.D., Merrifield D.L., Davis S.J. (2009). Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture* 294, 118-122.

- Seifen E., Adams R.J., Riemer R.K. (1979). Sanguinarine: a positive inotropic alkaloid which inhibits cardiac Na⁺,K⁺-ATPase. *European Journal of Pharmacology* 60, 373-377.
- Semkina O.A. (2005). Drug synthesis methods and manufacturing technology: Ointments, Gels, Liniments, and Creams Containing Phytopreparations (A Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 39.
- Sharma B.D., Malhotra S., Bhatia V., Rathee M. (1999). Epidemic dropsy in India. *Postgraduate Medical Journal* 75, 657-661.
- Shon Y.H., Nam K.S. (2004). Inhibition of cytochrome P450 isozymes and ornithine decarboxylase activities by polysaccharides from soybeans fermented with *Phellinus igniarius* or *Agrocybe cylindracea*. *Biotechnology Letters* 26, 159-163.
- Sieuwerts A.M., Klijn J.G., Peters H.A., Foekens J.A. (1995). The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 33, 813-823.
- Singh R., Mackraj I., Naidoo R., Gathiram P. (2006). Sanguinarine downregulates AT1a gene expression in a hypertensive rat model. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 48, 14-21.
- Slaninova I., Slanina J., Taborska E. (2007). Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids--novel cell permeant and red fluorescing DNA probes. *Cytometry A* 71, 700-708.
- Slaninová I., Slanina J., Táborská E. (2008). Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chemické listy* 102, 427-433.
- Stiborova M., Simanek V., Frei E., Hobza P., Ulrichova J. (2002). DNA adduct formation from quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine as revealed by the 32P-postlabeling technique. *Chemico-Biological Interactions* 140, 231-242.
- Stiborova M., Vostalova J., Zdarilova A., Ulrichova J., Hudecek J. et al. (2008). Macleaya cordata extract and Sangrovit genotoxicity. Assessment in vivo. *Biomedical Papers Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 152, 35-39.
- Sun M., Chun J., Lou W., Gao A. (2010). Sanguinarine is a novel inhibitor of survivin and inhibits the growth of prostate cancer cells. *The Journal of Urology* 183, e459.
- Šimánek V. (1985). Benzophenanthridine alkaloids. In *The Alkaloids* 26. Brossi A., Academic Press, New York. pp. 185-240.
- Tanahashi T., Zenk M.H. (1990). New hydroxylated benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *Journal of Natural Products* 53, 579-586.
- Tandon S., Das M., Khanna S.K. (1993). Biometabolic elimination and organ retention profile of argemone alkaloid, sanguinarine, in rats and guinea pigs. *Drug Metabolism Disposition* 21, 194-197.
- Tappel A.L. (1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxides. In *Methods in Enzymology* 52. Fleischer S. et al., Academic Press, London. pp. 506-513.

- Tice R.R., Andrews P.W., Singh N.P. (1990). The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Science* 53, 291-301.
- Turner R. (2009). Tall perennials: Larger-than-life plants for garden of all sizes. *Timber Press, Inc., Portland*.
- US Environmental Protection Agency (2002). Pesticide Fact Sheet: Macleaya extract.
- Vavreckova C., Gawlik I., Muller K. (1996). Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; I. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Medica* 62, 397-401.
- Vavrečková C., Ulrichová J. (1994). Biologická aktivita kvarterních benzo[c]fenantridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu. *Chemické listy* 88, 238-248.
- Veggetti M., Muchnik S., Losavio A. (2008). Effect of purines on calcium-independent acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 154, 1324-1336.
- Vičar J., Soral M., Hlaváč J. (2010). Separace benzo[c]fenantridinových alkaloidů z *Macleaya cordata*. *Chemické listy* 104, 51-53.
- Vieira A., Fang C.B., Rolim E.G., Klug W.A., Steinwurz F. *et al.* (2009). Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. *BMC Research Notes* 2, 221.
- Vieira S.L., Berres J., Reis R.N., Oyarzabal O.A., Coneglian J.L.B. *et al.* (2008a). Studies with sanguinarine like alkaloids as feed additive in broiler diets. *Brazilian Journal of Poultry Science* 10, 67-71.
- Vieira S.L., Oyarzabal O.A., Freitas D.M., Berres J., Pena J.E.M. *et al.* (2008b). Performance of broilers fed diets supplemented with sanguinarine-like alkaloids and organic acids. *The Journal of Applied Poultry Research* 17, 128-133.
- Vichkanova S.A., Tolkachev O.N., Martynova R.G., Arzamastsev E.V. (1982). Sanguiritrin, a new antimicrobial drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 16, 1515-1520.
- Vogel M., Lawson M., Sippl W., Conrad U., Roos W. (2010). Sanguinarine reductase - structure and mechanism of an enzyme of alkaloid detoxication. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Vogel M., Schumann B., Sippl W., Roos W. (2007). How are toxic benzophenanthridine alkaloids managed by the producing cell? *Botanikertagung. University of Hamburg*. 3.-7.9.2007.
- Vrba J., Dolezel P., Vicar J., Modriansky M., Ulrichova J. (2008). Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology In Vitro* 22, 1008-1017.
- Walterova D., Ulrichova J., Valka I., Vicar J., Vavreckova C. *et al.* (1995). Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine: biological activities and dental care applications. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 139, 7-16.

- Wan K.F., Chan S.L., Sukumaran S.K., Lee M.C., Yu V.C. (2008). Chelerythrine induces apoptosis through a Bax/Bak-independent mitochondrial mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 8423-8433.
- Wang G.X., Zhou Z., Jiang D.X., Han J., Wang J.F. *et al.* (2010). In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Veterinary Parasitology*.
- Warholm M., Guthenberg C., Von Bahr C., Mannervik B. (1985). Glutathione transferases from human liver. In *Methods in Enzymology* 113. Meister A., Academic Press, London. pp. 499-504.
- Weerasinghe P., Hallock S., Liepins A. (2001). Bax, Bcl-2, and NF-kappaB expression in sanguinarine induced bimodal cell death. *Experimental and Molecular Pathology* 71, 89-98.
- Weiss D., Baumert A., Vogel M., Roos W. (2006). Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant, Cell & Environment* 29, 291-302.
- Wink M. (2008). Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. In *Ecological Roles of Alkaloids*. Fattorusso E. *et al.*, Wiley-VCH, Weinheim. pp. 1-24.
- Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillère-Blandin C., Nguyen-Khoa T., Nguyen A.T. *et al.* (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International* 49, 1304-1313.
- Wu Y.R., Ma Y.B., Zhao Y.X., Yao S.Y., Zhou J. *et al.* (2007). Two new quaternary alkaloids and anti-hepatitis B virus active constituents from *Corydalis saxicola*. *Planta Medica* 73, 787-791.
- Yang R., Piperdi S., Gorlick R. (2008). Activation of the RAF/mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway mediates apoptosis induced by chelerythrine in osteosarcoma. *Clinical Cancer Research* 14, 6396-6404.
- Ye F., Feng F., Liu W. (2009). Alkaloids from *Macleaya cordata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 34, 1683-1686.
- Yin H.Q., Kim Y.H., Moon C.K., Lee B.H. (2005). Reactive oxygen species-mediated induction of apoptosis by a plant alkaloid 6-methoxydihydrosanguinarine in HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology* 70, 242-248.
- Zdarilova A., Vrubleova E., Vostalova J., Klejdus B., Stejskal D. *et al.* (2008). Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3721-3726.
- Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V. (2006). Quaternary isoquinoline alkaloids sanguinarine and chelerythrine. In vitro and in vivo effects. *Chemické listy* 100, 30-41.
- Zenk M.H. (1994). The formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* 66, 2023-2028.