

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**STUDIUM CYTOTOXICITY ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ
NA ORÁLNÍCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Thi Hoang Huong Bui

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

.....

Thi Hoang Huong Bui

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucí své bakalářské práce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za vstřícný přístup a cenné rady, doc. RNDr. Věře Králové, Ph. D. z Lékařské fakulty v Hradci Králové za ochotu a pomoc s experimentální prací v laboratoři, prof. Egle Milia z University of Sassari za zaslání vzorků přímo z Itálie k otestování a samozřejmě mé rodině a přátelům za podporu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Autor: Thi Hoang Huong Bui

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Název bakalářské práce: Studium cytotoxicity rostlinných extraktů na orálních buněčných liniích

Tato bakalářská práce se zabývá výzkumem cytotoxicity rostlinných extraktů na buňky dutiny ústní. Ve spolupráci s prof. Egle Milia z University of Sassari byly z Itálie zaslány do České republiky tři rostlinné extrakty:

1. *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Mentha spicata* (MMM)
2. *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Thymus vulgaris* (MMT)
3. *Pistacia lentiscus* (PLL)

Cytotoxicita těchto extraktů byla testována na třech buněčných liniích: dysplastických orálních keratinocytech (DOK), lidských gingiválních fibroblastech (HGnF) a lidských periodontálních vazivových fibroblastech (HPLF). Měření bylo uskutečněno kolorimetrickým testem WST-1, u *Pistacia lentiscus* se navíc pozoroval vliv na buněčnou aktivitu metodou xCELLigence RTCA. Provedeným výzkumem bylo zjištěno, že vodné výluhy MMM a MMT neovlivňují buněčnou proliferaci. Vodný výluh PLL se projevil jako cytotoxický od koncentrace 50 µg/ml do 200 µg/ml.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Author: Thi Hoang Huong Bui

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consultant: doc. RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Title of bachelor thesis: Study of cytotoxicity of plant extracts on oral cell lines

This bachelor's thesis investigates cytotoxicity of plant extracts on oral cavity cells. In collaboration with prof. Egle Milia from the University of Sassari, three plant extracts were sent from Italy to Czechia:

1. *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Mentha spicata* (MMM)
2. *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Thymus vulgaris* (MMT)
3. *Pistacia lentiscus* (PLL)

The cytotoxicity of these extracts was tested on three cell lines: dysplastic oral keratinocytes (DOK), human gingival fibroblasts (HGnF) and human periodontal ligament fibroblasts (HPLF). The measurement was carried out by the WST-1 colorimetric assay, and in addition, the effect of *Pistacia lentiscus* on cellular activity was observed by xCELLigence RTCA. The research carried out revealed that MMM and MMT water extracts do not affect cell proliferation. The PLL extract was shown to be cytotoxic from a concentration of 50 µg/ml to 200 µg/ml.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	Studované rostliny	2
2.1.1	Lentišek.....	2
2.1.2	Máta	3
2.1.3	Sléz.....	4
2.1.4	Tymián.....	4
2.1.5	Meduňka	5
2.2	Testy cytotoxicity/analýza životaschopnosti	6
2.2.1	MTT	7
2.2.2	MTS	7
2.2.3	XTT.....	8
2.2.4	WST-1	8
2.2.5	Alamar blue test.....	9
2.2.6	Test neutrální červení.....	9
2.2.7	ATP test	9
2.2.8	Trypan blue test	9
2.2.9	LDH test.....	10
2.2.10	Fluorescenční značení.....	10
2.2.11	XCELLigence RTCA (Real Time Cell Analyzer).....	10
3	Cíl práce.....	12
4	Experimentální část	13
4.1	Biologický materiál.....	13
4.1.1	Dysplastické orální keratinocyty (DOK)	13
4.1.2	Lidské gingivální fibroblasty (HGnF)	13
4.1.3	Lidské periodontální vazivové fibroblasty (HPLF)	13
4.2	Použité chemikálie	14
4.3	Přístrojové vybavení	14
4.4	Spotřební materiál.....	15

4.5	Metodika	15
4.5.1	Příprava rostlinných extraktů.....	15
4.5.2	Příprava pracovních roztoků.....	16
4.5.3	Test cytotoxicity WST-1.....	16
4.5.4	XCELLigence	17
5	Výsledky.....	19
5.1	Stanovení cytotoxicity rostlinných extraktů metodou WST-1	19
5.1.1	Cytotoxicita MMM.....	19
5.1.2	Cytotoxicita MMT	21
5.1.3	Cytotoxicita PLL.....	22
5.2	Stanovení cytotoxicity PLL metodou xCELLigence.....	24
5.2.1	Dysplastické orální keratinocyty	25
5.2.2	Lidské gingivální fibroblasty	25
5.2.3	Lidské periodontální vazivové fibroblasty	26
6	Diskuze.....	27
7	Závěr	31
8	Seznam zkratk.....	32
9	Použitá literatura	34
10	Seznam obrázků a tabulek.....	39

1 ÚVOD

Užívání rostlinných léčivých přípravků a doplňků stravy se v posledních třech desetiletích velmi rozšířilo. Odhaduje se, že 88 % všech zemí používá tradiční medicínu, jako jsou bylinné léky, jóga a další (1).

Přestože terapie zahrnující rostlinné produkty prokázaly slibný potenciál a účinnost, mnoho z nich zůstává netestováno a jejich užívání je buď nedostatečně monitorováno, nebo dokonce není monitorováno vůbec. Důsledkem toho jsou nedostatečné znalosti o způsobu jejich účinku, možných nežádoucích účincích a kontraindikacích. Vzhledem k tomu, že bezpečnost je i nadále hlavním problémem při používání rostlinných přípravků, je proto nezbytné je testovat.

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala, ve spolupráci s prof. Egle Milia z University of Sassari, toxicitou tří rostlinných extraktů:

1. *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Mentha spicata* (MMM)
2. *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Thymus vulgaris* (MMT)
3. *Pistacia lentiscus* (PLL)

Test byl proveden na orálních buněčných liniích – dysplastických orálních keratinocytech (DOK), lidských gingiválních fibroblastech (HGnF) a lidských periodontálních vazivových fibroblastech (HPLF).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Studované rostliny

2.1.1 Lentišek

Pistacia lentiscus (řečík lentišek) je stálezelený keřovitý strom z čeledi ledvinovnickovitých (*Anacardiaceae*), který dorůstá výšky až 4 m. Pochází z oblasti Středozemního moře a je známý pro svou pryskyřici, získávanou z kůry. Ta se ale těžila převážně na řeckém ostrově Chios, podle kterého je známá pod názvem „mastix van Chios“ (2, 3). Pryskyřice svou vůní připomíná borovici a vyrábí se z ní fermež, která se, díky svým dezinfekčním účinkům a schopnosti zastavit krvácení, používá do náplastí (2).

Lentišek má aromatické, drobné, kožovité, 10 cm dlouhé, olivově zelené listy, rozdělené na 3-5 párů lístků. Jeho stonky jsou v mládí načervenalé barvy a v dospělosti šednou. Je dvoudomý, s oddělenými samčími a samičími stromy. Kvetou na jaře a jejich květy jsou velmi malé, zelené a nenápadné. Po samičích květech se na podzim objevují nejedlé jasně červené plody (Obrázek 1), které po dozrání zčernají. Lentišek je sice příbuzný s pistácií (*Pistacia vera*), ale neprodukuje jedlé ořechy (4).



Obrázek 1: *Pistacia lentiscus*

Jeho různé části obsahují řadu chemických sloučenin, které jsou lékařsky významné, jako je již zmíněná pryskyřice, silice, kyselina gallová, antokyany, flavonové glykosidy, triterpenoidy a tokoferol. V tradiční medicíně se díky svým silným antioxidačním, protizánětlivým a antimikrobiálním účinkům používala k léčbě řady onemocnění, například při gastrointestinálních chorobách, ekzémech a infekcích v krku. Pomáhá i při léčbě hypertenze a má diuretické vlastnosti. Uvádí se, že je účinný také při léčbě svrabu

a revmatismu. Tyto zdraví prospěšné vlastnosti lentišku jsou také připisovány různým biologicky aktivním látkám, jako jsou fenolické sloučeniny (3).

2.1.2 Máta

Mentha spicata (máta klasnatá) je léčivá rostlina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Jedná se o plazivou, vytrvalou bylinu se silnou aromatickou vůní, dorůstající výšky 30-100 cm, s různě chlupatými stonky a listy a široce rozprostřeným podzemním oddenkem (5). Pochází z Evropy a Asie a byla zdomácněna v Severní Americe a některých částech Afriky (6). Listy jsou vejčité až kopinaté, 5-9 cm dlouhé a 1,5-3 cm široké, s vroubkovaným okrajem (Obrázek 2). Má charakteristický čtvercový tvar stonku a vytváří růžové nebo bílé květy ve štíhlých klasech (5).



Obrázek 2: *Mentha spicata*

Vyznačuje se schopností syntetizovat silice. Již od pradávna používala marocká populace mátu klasnatou, konkrétně nadzemní části, proti nemocem, včetně cukrovky, zažívacích a respiračních poruch, krčních a kožních onemocnění. Různé populace také používají nadzemní části této rostliny k přípravě čaje (5).

Spektroskopická analýza extraktů a silic pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) a ramanovy spektrometrie odhalila přítomnost několika fytochemických bioaktivních sloučenin patřících do různých tříd sekundárních metabolitů, zejména do tříd flavonoidů, fenolických kyselin a terpenů. Studie *in vitro* a *in vivo* ukázaly, že extrakty a silice vykazují pozoruhodné biologické aktivity, včetně antimikrobiálních, antiparazitárních, protizánětlivých a protinádorových účinků (5).

2.1.3 Sléz

Malva sylvestris (sléz lesní), jednoletá bylina běžně vyskytující se v Asii, Evropě a severní Africe, se řadí do čeledi slézovitých (*Malvaceae*) (7). Květy má zářivě růžové s fialovými liniemi a listy ve tvaru javorového listu s 5-7 laloky (Obrázek 3). Listy a květy této rostliny se po staletí používaly v tradiční medicíně k léčbě různých onemocnění, jako je kašel, nachlazení, průjem a zácpa (8). V minulosti se sléz používal převážně jako léčivý čaj, kvůli velkému množství slizových látek, které svým zmiřujícím účinkem pomáhal proti kašli (2, 9).



Obrázek 3: *Malva sylvestris*

Fytochemická analýza ukázala, že květy a listy *Malva sylvestris* obsahují různé bioaktivní sloučeniny, jako jsou flavonoidy, terpenoidy, deriváty fenolu, kumariny, steroly, třísloviny, saponiny a alkaloidy. Tyto fytochemikálie jsou zodpovědné za mnohé farmakologické aktivity, jako jsou protizánětlivé, antimikrobiální, hepatoprotektivní, projímavé, antiproliferativní a antioxidační vlastnosti (8).

Přestože se často používá v lidské výživě a tradiční medicíně, toxikologické testy ukázaly, že při vysokých dávkách může mít negativní zdravotní účinky (8).

2.1.4 Tymián

Thymus vulgaris (tymián obecný) je vytrvalá bylina patřící do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), původem ze Středomoří. Aromatická rostlina, která se po mnoho staletí celosvětově používá k léčebným a kulinářským účelům. Do západní Evropy byla přinesena benediktiny v 11. století (10, 11). Tvoří nízký polštář větví, které se dřevnatých stonků, které jsou obaleny malými, čárkovitými až vejčitými, tmavě šedozelenými

listy (Obrázek 4). Listy jsou velmi aromatické a často se používají čerstvé nebo sušené jako koření do různých pokrmů. Na konci jara až začátkem léta se na špičkách stonků objevují koncové klasy malých, spirálovitých, bílých nebo růžových květů (12).



Obrázek 4: *Thymus vulgaris*

Má mnoho pozitivních účinků na lidské tělo. Produkuje velké množství silice obsahující široké spektrum látek, hlavně thymol, karvakrol, p-cymen, saponiny, flavonoidové glykosidy aj. Právě tyto látky v silici působí antisepticky, antimykoticky, napomáhají trávení, odstraňují zápach z úst, zabraňují nadýmání a využívají se k ošetření zánětů dutiny ústní a nosohltanu (9, 10). Jonáš a Kuchař (10, s. 317) uvádí: „*Tymián je považován za jednu z nejsilněji působících antibiotických drog.*“

Chemické složení silice závisí na době sběru rostlinného materiálu, fenologické fázi rostliny, oblasti pěstování rostlin a dalších parametrech. Výsledky studií chemického složení silice tymiánu se tedy liší (11). Pomocí GC-MS bylo zjištěno, že hlavní složkou silice je thymol (41 %), karvakrol (8 %), γ -terpinen (11 %) a p-cymen (13 %) (13). Thymol a karvakrol mají antioxidační vlastnosti. V humánní a veterinární medicíně a v ochraně rostlin byla popsána jejich antibakteriální a antimykotická aktivita (11).

2.1.5 Meduňka

Melissa officinalis (meduňka lékařská) je keřovitá trvalka vonící po citronu. Patří do čeledi hluchavkovitých, stejně jako tymián (14). Pochází z Evropy a je jednou z nejoblíbenějších a nejrozšířenějších léčivých rostlin ve střední a jižní Evropě, v oblasti Středomoří a západní Asii (14, 15). Dosahuje výšky 60-100 cm. Měkké, chlupaté listy jsou 2-8 cm dlouhé, jsou tmavě zelené a mají tvar srdce (Obrázek 5). Povrch listů je hrubý a hluboce žilkovaný, okraj je vroubkovaný nebo zubatý a je bohatý na biologicky aktivní

látky (16). Na jaře a v létě vyrůstají v místech, kde se listy setkávají se stonkem, hrozny drobných, světle žlutých květů (15).



Obrázek 5: *Melissa officinalis*

Meduňka je široce používána v asijské tradiční medicíně k léčbě mnoha psychiatrických poruch, jako je deprese, úzkost, nespavost, palpitace vyvolané úzkostí a stres. V klinických studiích na CNS meduňka prokázala anxiolytické, antidepressivní a neuroprotektivní účinky a byly zkoumány její účinky na zlepšení nálady, kognitivní výkon a paměťové funkce (14).

Meduňka má celkově složité chemické složení s mnoha biologicky aktivními sloučeninami, které se liší v závislosti na způsobu extrakce a na části rostliny, která se extrahuje. Chemické studie jejího složení ukázaly, že obsahuje především flavonoidy, terpenoidy, fenolové kyseliny, třísloviny a silici (16).

2.2 Testy cytotoxicity/analýza životaschopnosti

Metody *in vitro* se staly základním kamenem objevování léků a široce se používají při studiu přírodních produktů, surových extraktů a izolovaných sloučenin, a to jak pro screeningové, tak pro mechanistické studie. Většina dosud izolovaných produktů byla testována pouze na několika z nespočtu dostupných modelů buněk a tkání (17).

Ať už zkoumáme cytotoxické, škodlivé nebo ochranné účinky, stanovení koncentrací, které jsou pro buněčný model cytotoxické, by mělo být primárním krokem testování *in vitro*. V závislosti na rozsahu výzkumu a na dalších cílech, jejichž splnění se očekává, může nebo nemusí být cytotoxicita sama o sobě koncovým bodem. Například ve studiích, které se snaží rozluštit farmakologickou aktivitu bylin, které se tradičně používají (u nichž se neočekávají žádné nebo jen nízké toxické účinky), by měla být

omezena toxicita vůči buněčným kulturám *in vitro*, zejména při použití správných dávek nebo inkubačních dob (17).

Hlavní techniky používané k vyšetření a vyhodnocení cytotoxicity bylinných komplexních směsí, mohou být založeny na metabolické aktivitě (testy na bázi tetrazoliových solí, Alamar blue, test neutrální červení a test syntézy ATP), na integritě membrány (test trypanovou modří, LDH test a fluorescenční značení), na morfologických vlastnostech (velikost a tvar buňky, videomikroskopie a bodování buněčného odchlípení) a na růstu buněk (přímé počítání buněk, hodnocení distribuce fází buněčného cyklu, testy založené na měření syntézy DNA, klonogenní test). Testy na bázi tetrazoliových solí jsou pravděpodobně nejpoužívanější testy ke stanovení buněčné životaschopnosti. Mezi tyto testy patří MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium), XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) a WST-1 (4-[3(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát). Jedná se o kolorimetrické testy, působící jako redoxní senzory. Mohou být redukovány metabolicky aktivními buňkami na deriváty formazanu, které mohou být následně rozpuštěny pro spektrofotometrické hodnocení (17). Převratným objevem byl systém xCELLigence, umožňující monitorování dynamických procesů v reálném čase (18).

2.2.1 MTT

MTT test zahrnuje konverzi ve vodě rozpustného žlutého barviva MTT na nerozpustný purpurový formazan působením mitochondriální reduktázy (19). Formazan se potom solubilizuje a koncentrace se stanoví pomocí optické hustoty při 570 nm. Výsledkem je citlivý test s linearitou až na $\sim 10^6$ buněk na jamku 96jamkové destičky (19).

2.2.2 MTS

U MTS se tvoří oproti MTT formazanové produkty, které jsou přímo rozpustné v buněčném kultivačním médiu (20). Formazanové barvivo se kvantifikuje měřením absorbance při 490-500 nm. Test MTS je často popisován jako „jednokrokový“ MTT test, který nabízí pohodlí přidání činidla přímo do buněčné kultury bez přerušovaných kroků vyžadovaných v testu MTT (21).

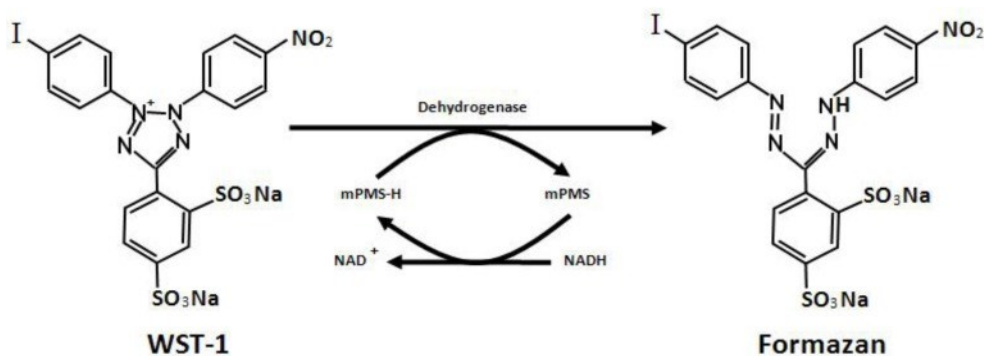
2.2.3 XTT

XTT je založen na redukcí žluté tetrazoliové soli na oranžové formazanové barvivo metabolicky aktivními buňkami. Vytvořené barvivo je rozpustné ve vodných roztocích a je přímo kvantifikováno pomocí skenovacího vícejamkového spektrofotometru. MTS je ve srovnání s XTT rozpustnější a netoxický, což umožňuje buňkám vrátit se do kultury pro další hodnocení. Avšak stejně jako MTS, tak i XTT vyžaduje k účinné redukcí přítomnost fenazin methosulfátu (PMS) (21).

2.2.4 WST-1

WST-1 je rozšířený kolorimetrický test pro stanovení životaschopnosti buněk. V principu WST-1 reaguje s mitochondriální sukcinát-tetrazolium reduktázou za vzniku ve vodě rozpustného formazanu (22). Množství vytvořeného barviva je přímo závislé na metabolické aktivitě buněk. Ve srovnání s MTT a XTT má činidlo WST-1 několik výhod, mezi které patří rozpustnost ve vodě, rychlost, větší stabilita a citlivost (23).

WST-1 se provádí v 96jamkové destičce, kde mohou být buňky ovlivňovány sloučeninami nebo činidly, které mají vliv na proliferaci. Buňky jsou detekovány proliferační reagenií, která je konvertována mitochondriálními dehydrogenázami živých buněk z tetrazoliové soli WST-1 na formazan za přítomnosti elektronového mediátoru (mPMS) a buněčného NADH (Obrázek 6). Absorbance vzniklého produktu je měřena spektrofotometricky. Vzestup buněčné proliferace je spojený se zvýšenou aktivitou mitochondriálních dehydrogenáz, přibude formazanu a dojde tedy k zesílení signálu. Zatímco zeslabení může indikovat toxický efekt složek nebo neoptimální kultivační podmínky (24).



Obrázek 6: Přeměna WST-1 na formazan

2.2.5 Alamar blue test

Alamar blue test je široce používán ke zkoumání cytotoxicity, buněčné proliferace a buněčné metabolické aktivity v různých oblastech toxikologie. Je založen na fluorometrickém redoxním indikátoru resazurinu, modře zbarvené nefluorescenční sloučenině. Po intracelulárním příjmu je oxidovaný resazurin redukován na fluorescenční resorufin díky redukčnímu prostředí cytosolu v buňkách. Resorufin produkuje jasně červenou fluorescenci, kterou lze kvantifikovat (intenzitu fluorescence) a použít jako měřítko životaschopnosti buněk (25). Resazurin je pro buňky netoxický, avšak při interferenci s buněčným redoxním potenciálem může aktivovat produkci reaktivních forem kyslíku, což má za následek zhoršení mitochondriálního dýchání se sníženou rychlostí proliferace (17).

2.2.6 Test neutrální červení

Neutrální červeně je inkorporována pouze živými buňkami, kde se hromadí v lysozomech. Po buněčné lýze může být hodnocena spektrofotometricky a ukazuje lineární korelaci s počtem živých buněk. Při fyziologickém pH je náboj barviva nulový, což mu umožňuje pronikat buněčnými membránami pasivní difúzí. Když barvivo dosáhne lysozomů, kde pH klesne, získá náboj a zůstane zachyceno. Použití vyšších koncentrací nebo delší inkubační doby, stejně jako snížení teploty nebo pH, může vést k vysrážení neutrální červeně, což může přímo ovlivnit buněčnou životaschopnost (17).

2.2.7 ATP test

Bioluminiscence ATP je založena na enzymaticky katalyzované biochemické reakci (26). ATP se tvoří výhradně v mitochondriích a je všeobecně považován za faktor výměny energie, který pohání procesy kontrakce, fosforylace a aktivního transportu. Nejlepší metodou pro měření intracelulárního ATP je použití luciferázy světlušek. Využívá ATP závislost luciferázy, která katalyzuje oxidaci d-luciferinu na oxyluciferin (27). Emitované světlo je kvantifikováno v relativních světelných jednotkách pomocí luminometru a může být převedeno na koncentraci ATP pomocí kalibrační křivky, podle níž se pak odečte množství ATP (26, 27).

2.2.8 Trypan blue test

Využívá selektivního barvení mrtvých buněk trypanovou modří a mikroskopické vyšetření na hemocytometru je jednou z nejčastěji používaných rutinních metod pro

stanovení počtu buněk a procenta životaschopnosti v populaci buněk. Obecnou koncepcí je, že trypanová modř je vyloučena z živých buněk (energeticky závislý proces vyžadující ATP), ale u mrtvých buněk s poškozenou plazmatickou membránou proniká do cytoplazmy a zbarví ji modře. Delší inkubace s roztoky trypanové modři může mít za následek slabé zbarvení životaschopných buněk v populaci, pravděpodobně v důsledku pomalého příjmu molekul barviva. Hlavními nevýhodami této techniky jsou chyby spojené s měřením jediného vzorku, subjektivní úsudek uživatele o určení toho, co je mrtvá buňka nebo zbarvené pozůstatky, nekonzistence mezi operátory, čas a manuální práce spojené s měřením více vzorků (17, 28).

2.2.9 LDH test

Přítomnost mrtvých buněk, které ztratily integritu membrány, lze detekovat měřením markerů, které unikají z cytoplazmy do kultivačního média. Nejběžnějším markerem používaným pro tento typ testu je laktátdehydrogenáza (LDH). Katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát, a přitom přeměňuje NAD^+ na NADH. Redukční kapacita NADH může být použita k redukci různých molekul substrátu na produkty, které jsou buď barevné, fluorescenční nebo luminogenní (28).

2.2.10 Fluorescenční značení

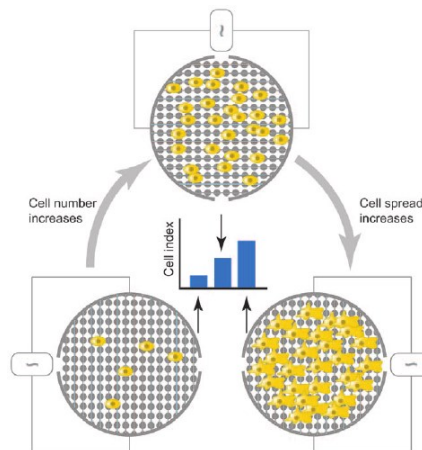
Fluorescenční barviva, která pronikají do buněk v případě narušení integrity membrány a obecně se vážou na DNA a/nebo RNA, svědčí o odumírání nebo již mrtvých buňkách. Tato barviva jsou vhodná pro širokou škálu aplikací, jako je mikroskopické zobrazování, průtoková cytometrie nebo měření fluorescence na mikrotitračních destičkách. Propidium jodid patří mezi nejpoužívanější z těchto fluoroforů. Jakmile je fixován na nukleové kyseliny, vykazuje intenzitu fluorescence 20-30krát vyšší než nevázaná forma (17).

2.2.11 XCELLigence RTCA (Real Time Cell Analyzer)

Systém xCELLigence je technologie, která umožňuje hodnocení buněk v jejich přirozeném prostředí v reálném čase, bez značení, čímž se vyhýbá potenciálně negativním dopadům různých detekčních sloučenin, jako může být i WST-1, na buněčné procesy (18). Optimální *in vitro* kultivační prostředí je zajištěno umístěním destičky v CO_2 inkubátoru po celou dobu měření. Takto je možné sledovat chování buněk až několik dní.

Technologie je založená na impedanci, která neinvazivně monitoruje buněčný stav v reálném čase pomocí zlatých mikroelektrodoých senzorů, k nimž lze generovat elektrické pole, tzv. E-plates (Obrázek 7). Sensory jsou umístěné na dně jamek kultivačních destiček. Toto elektrické pole je modulováno počtem buněk připojených na elektrody a změnami v buněčné morfologii. V nepřítomnosti buněk je impedance elektrod minimální. Pokud jsou však buňky přítomny, přichytí se na povrch elektrodového senzoru, působí jako bariéry elektrického pole a vedou ke zvýšení impedance (18).

Impedanční údaj označovaný jako buněčný index (CI) digitálně vyjadřuje morfologické změny a změny počtu buněk v dané mikroelektronické jamce. Čím větší je tedy cytotoxicita sloučeniny, tím nižší je počet buněk rostoucích na elektrodách a tím nižší je hodnota CI impedance elektrody (18).



Obrázek 7: xCELLigence RTCA – detekce životaschopnosti a motility buněk na základě impedance

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit toxicitu rostlinných extraktů (MMM – *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Mentha spicata*, MMT – *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Thymus vulgaris* a PLL – *Pistacia lentiscus*) na orálních buněčných liniích: dysplastických orálních keratinocytech (DOK), lidských gingiválních fibroblastech (HGnF) a lidských periodontálních vazivových fibroblastech (HPLF). Pro získání výsledků bylo potřeba provést:

- Nasazení buněčných linií na kultivační destičky
- Ovlivnění buněčných linií rostlinnými extrakty
- Test cytotoxicity WST-1
- Měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Dysplastické orální keratinocyty (DOK)

DOK (ECACC 94122104) byly izolovány z kousku dorzálního jazyka od 57letého muže. Po odstranění spinocelulárního karcinomu pacienta, který byl silný kuřák, byla následně odstraněna zbývající dysplazie (lehký až střední stupeň dysplazie) a použita k iniciaci primárních kultivací vedoucích k založení DOK. Buňky obsahují keratinový profil podobný původní dysplazii. Buňky jsou netumorigenní u athymických nahých myší. Kultivace probíhala v DMEM s přidavkem 2 mM glutaminu, 5 µg/ml hydrocortisonu a 10% fetálního bovinního séra (FBS) (29).

4.1.2 Lidské gingivální fibroblasty (HGnF)

HGnF (katalog #2620) od Science Research Laboratories byly izolovány z lidské dásně, kryokonzervovány a dodány zmrazené. Každá lahvička obsahovala přes 5×10^5 buněk v 1 ml objemu (30).

HGnF jsou mezenchymální buňky, které jsou hlavní složkou gingivální tkáně. Zodpovídají za syntézu extracelulární matrix v pojivové tkáni a hrají důležitou roli v hojení ran. Patří mezi jeden z nejvíce dostupných typů savčích buněk a také mezi nejjednodušší typ buněk pro růst v kultuře. Exprimují širokou škálu povrchových molekul včetně CD9, CD26, CD55, CD59, CD63, CD71, CD86, CD95, CD117, ale také mRNA pro proteázou aktivovaný receptor-1 (PAR-1) a PAR-3 (30).

4.1.3 Lidské periodontální vazivové fibroblasty (HPLF)

HPLF (katalog #2630) taktéž od Science Research Laboratories byly získány z lidské periodontální tkáně. Obdobně jako HGnF byly kryokonzervovány a dodány zmrazené v lahvičkách (přes 5×10^5 buněk v 1 ml objemu) (31).

Periodontální vaz je pojivová tkáň lokalizována mezi cementem zubů a alveolární kostí dolní čelisti. Hrají nedílnou roli při údržbě a regeneraci periodontální tkáně. I přes morfologickou podobnost s gingiválními fibroblasty jeví periodontální vazivové fibroblasty (PLF) odlišné funkční aktivity při udržování tkáňové integrity. Je známo, že PLF produkují proteiny extracelulární matrix související s osteoblasty a vykazují vyšší

aktivitu alkalické fosfatázy ve srovnání s gingiválními fibroblasty. Aktivně se podílí na imunitních a zánětlivých procesech u onemocnění periodontu (31).

4.2 Použité chemikálie

- D-MEM (Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium), Sigma Aldrich
- Destilovaná voda
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma Aldrich
- FBS (Fetální bovinní sérum), Gibco
- Kolagen (z lidské placenty), Sigma Aldrich
- PBS bez iontů Ca^{2+} a Mg^{2+}
- Penicilin/Streptomycin, Gibco
- Trypsin 0,05 % + EDTA, Sigma Aldrich
- WST-1 (4-[3(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2*H*-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát), Roche

4.3 Přístrojové vybavení

- Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience
- Centrifuga Allegra™ X-12 R Centrifuge, Beckman Coulter
- Invertovaný mikroskop CK2, Olympus
- Laminární box MSC – ADVANTAGE 1.2, Thermo Scientific
- Laminární box Telstar Bio-II-A/G
- Lednice – BRANDT Apollo
- Pipetboy Swiftpet, Thermo Scientific
- Počítač ASUS
- Počítač HP
- Spektrofotometr Tecan infinite M200pro, Tecan
- Termostat CO₂ Incubateur IG 150, JOUAN
- Termostat Sanyo CO₂ incubator MCO-18 AIC (UV), Sanyo
- Vodní lázeň Memmert
- Vortex MS2 Minishaker, IKA
- xCELLigence RTCA Analyzer, Boehringer Mannheim, Roche

4.4 Spotřební materiál

- 96jamkové mikrotitrační UV destičky s plochým dnem, Nunc, Thermo Scientific
- Automatické pipety a jednorázové špičky, Finnpiquette
- E-plates, Boehringer, Mannheim, Roche
- Injekční stříkačka, Sartorius
- Invertovaný mikroskop, CK2, Olympus
- Korýtko pro multikanálovou pipetu
- Kultivační láhve s filtrem, Nunc, Thermo Scientific
- Láhve pro média, Pyrex
- Mikrozkušavky Eppendorf
- Odměrné sklo – odměrné válce, pipety, kádinky
- Petriho misky
- Počítací komůrky Cellometer Counting Chambers, Nexcelom Bioscience
- Rukavice – latexové, nitrilové
- Stojánky na zkumavky
- Vaničky pro multikanálovou pipetu

4.5 Metodika

4.5.1 Příprava rostlinných extraktů

Prof. Milia byly v Itálii na University of Sassari připraveny tři vodné výluhy:

1. *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Mentha spicata* (MMM)
2. *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Thymus vulgaris* (MMT)
3. *Pistacia lentiscus* (PLL)

Posléze byly lyofilizovány pro stabilní uchování a poslány do České republiky. Před vlastním testováním cytotoxicity bylo naváženo 100 mg každého lyofilizovaného extraktu a přidáno 5 ml redestilované vody. Pomocí sonikace byly extrakty rozpuštěny. Roztoky byly poté sterilizovány přes filtr, kterým se odstranil i mírný zákal. Výsledkem byly tři roztoky (MMM, MMT a PLL) o objemu 5 ml a koncentraci 20 mg/ml, které byly následně rozpipetovány po 500 μ l a vloženy do mrazáku (-20 °C).

4.5.2 Příprava pracovních roztoků

Pro měření bylo potřeba si připravit roztoky rostlinných extraktů (MMM, MMT a PLL) o koncentraci 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml a 200 µg/ml D-MEM média. Nejprve byl ze zásobního roztoku (20 mg/ml) sterilně zhotoven roztok o koncentraci 200 µg/ml a ten byl následně použit na přípravu zbývajících koncentrací (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Postup ředění rostlinných extraktů na jednu 96jamkovou destičku

Množství přidaného extraktu [ml]	Množství přidaného média [ml]	Výsledná koncentrace roztoku [µg/ml]
0,04 (zásobního roztoku)	3,96	200
1 (200 µg/ml roztoku)	1	100
0,5 (200 µg/ml roztoku)	1,5	50
0,1 (200 µg/ml roztoku)	1,9	10
0,01 (200 µg/ml roztoku)	1,99	1

Pro metodu WST-1 byl podle doporučení výrobce připraven pracovní roztok smícháním 9,5 ml D-MEM média s 0,5 ml zásobního roztoku WST-1 (v poměru 20:1).

4.5.3 Test cytotoxicity WST-1

Nasazení a ovlivnění buněčných linií

První den byly nasazeny buňky (DOK, HGnF a HPLF) do 96jamkových destiček po 100 µl suspenze o hustotě 6000 buněk/jamku a nechaly se inkubovat 24 hodin v CO₂ inkubátoru (při 37 °C, 5 % CO₂ a konstantní vlhkosti). Každá destička obsahovala kontroly (buňky inkubované pouze v čistém médiu, bez přidaných extraktů) a slepé vzorky, tzv. blank. Slepé vzorky byly připraveny inkubací média bez buněk.

Další den (po 24 hodinách) se opatrně odsálo médium s ohledem na spodní vrstvu buněk, která by při narušení zkreslila výsledek. Následně bylo k buňkám přidáno 100 µl pracovního roztoku (MMM, MMT a PLL) o koncentraci 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml a 200 µg/ml (viz Tabulka 2). Kontroly a slepé vzorky byly doplněny novým médiem bez extraktu. Poté se destičky opět vložily do CO₂ inkubátoru a buňky se nechaly ovlivnit na 24 hodin.

Tabulka 2: Rozložení koncentrací extraktů na 96jamkové destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank		kontrola	200	100	50	10	1				
B	blank		kontrola	200	100	50	10	1				
C	blank		kontrola	200	100	50	10	1				
D	blank		kontrola	200	100	50	10	1				
E	blank		kontrola	200	100	50	10	1				
F	blank		kontrola	200	100	50	10	1				
G	blank		kontrola	200	100	50	10	1				
H	blank		kontrola	200	100	50	10	1				

Vyhodnocení

Po uběhnutí 24 hodin byly z CO₂ inkubátoru vyjmuty destičky, ze kterých bylo následně opatrně odsáto médium. Do jamek bylo napipetováno po 100 µl pracovního roztoku WST-1 v médiu. Destičky byly uloženy na 2 hodiny do CO₂ inkubátoru (při 37 °C, 5 % CO₂ a konstantní vlhkosti). Poté byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru Tecan infinite M200pro při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 690 nm. Rozdíl těchto měření byl použit na analýzu cytotoxicity rostlinných extraktů.

4.5.4 XCELLigence

Před nasazením buněk byly 16jamkové destičky E-plates připraveny přidáním 80 µl média do každé jamky. Nechaly se inkubovat na hodinu v CO₂ inkubátoru, aby se vytemperovaly. Posléze byly vloženy do stanice xCELLigence RTCA Analyzeru (v CO₂ inkubátoru) a změřilo se pozadí (tzv. background).

Následně byly nasazeny DOK, HGnF a HPLF do 16jamkových destiček E-plate (6000 buněk/jamku po 100 µl buněčné suspenze). Před vložením destiček zpátky do systému se nechaly na 30-60 min stát v laminárním boxu, aby se buňky připravily na přisednutí na dno.

Buňky byly monitorovány v 15minutových intervalech. Po 24 hodinách byl test zastaven a destičky E-plate byly vyjmuty ze systému xCELLigence. Média byla opatrně odstraněna a nahrazena 100 µl extraktu lentišku (PLL) o třech koncentracích (10 µg/ml, 50 µg/ml a 100 µg/ml média), u kontroly bylo staré médium vyměněno za nové (100 µl) viz Tabulka 3. Destičky byly vloženy zpět do systému xCELLigence a buňky byly sledovány po dobu 72 hodin. Výsledky byly vykresleny pomocí softwaru RTCA 2.1.

Tabulka 3: Rozložení koncentrací PLL na E-plate

50	50	50	50	K	K	K	K
100	100	100	100	10	10	10	10

5 VÝSLEDKY

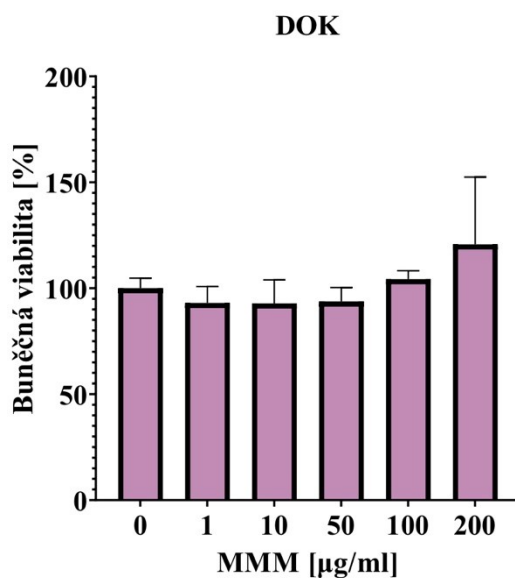
Cytotoxicita každého extraktu (MMM, MMT a PLL) byla testována metodou WST-1 ve třech opakováních. Cytotoxicita řečíku lentišku (PLL) byla navíc ověřena metodou xCELLigence také ve třech opakováních.

5.1 Stanovení cytotoxicity rostlinných extraktů metodou WST-1

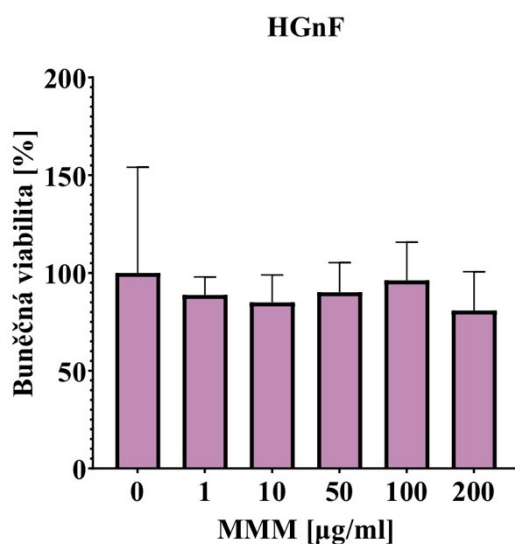
Cytotoxicita jednotlivých extraktů byla sledována u buněk tří orálních buněčných linií pomocí metody WST-1. Pro kontrolu pozadí bylo použito kultivační médium s WST-1 bez buněk (blank). Absorbance slepého vzorku byly odečteny od absorbancí vzorku. Buněčná viabilita (měřeno jako redukce WST-1) byla vynesena vzhledem ke kontrolním buňkám, které byly normalizovány na 100% přežití. Všechny údaje byly vyjádřeny jako průměr ze tří nezávislých měření se směrodatnou odchylkou (SD), pro větší přehlednost byly v grafech vyobrazeny pouze kladné odchylky. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel a následně vyhodnoceny v podobě grafů pomocí programu Graphpad Prism 9.5.1. Statistická významnost byla vypočtena pomocí jednosměrné analýzy rozptylu (one-way ANOVA). Hodnoty P nižší než 0,05 byly považovány za významné.

5.1.1 Cytotoxicita MMM

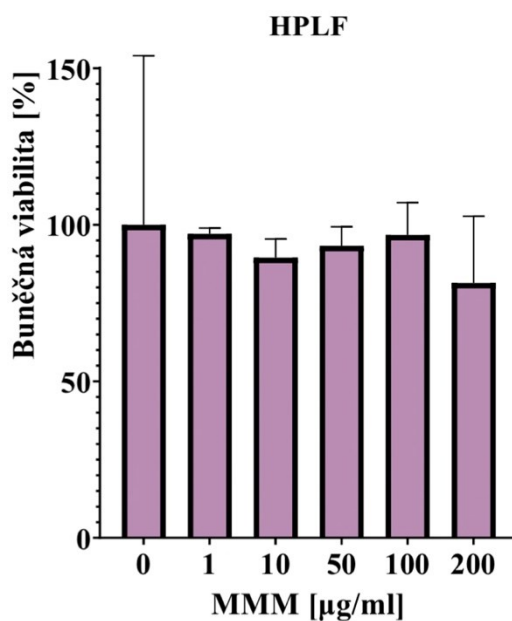
K signifikantnímu snížení viability, vlivem extraktu MMM, nedošlo ani u jedné z tří buněčných linií viz Obrázek 8, Obrázek 9 a Obrázek 10.



Obrázek 8: Graf znázorňující vliv MMM na životaschopnost DOK – metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).



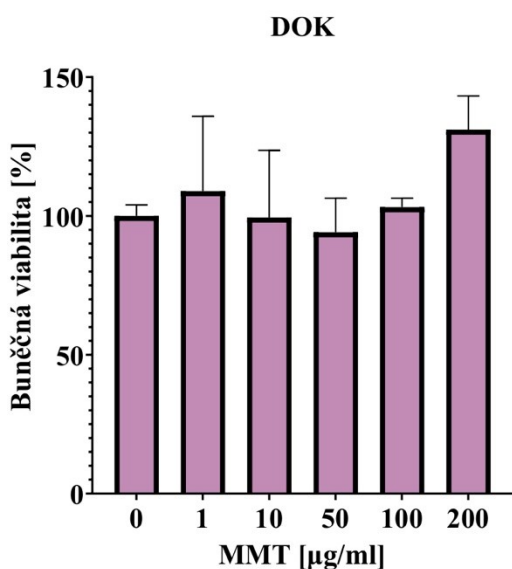
Obrázek 9: Graf znázorňující vliv MMM na životaschopnost HGnF – metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).



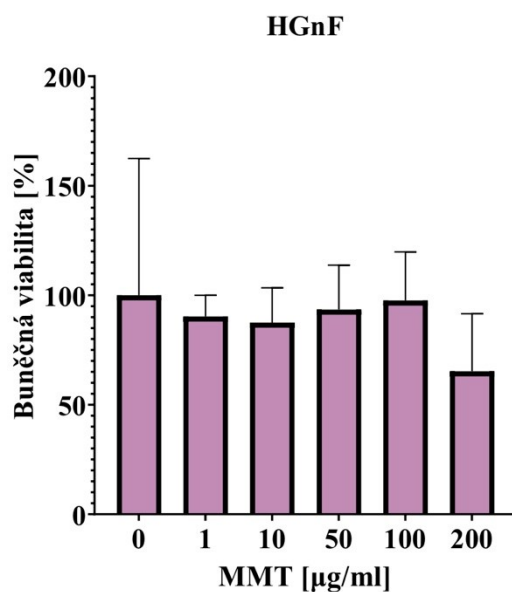
Obrázek 10: Graf znázorňující vliv MMM na životaschopnost HPLF – metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).

5.1.2 Cytotoxicita MMT

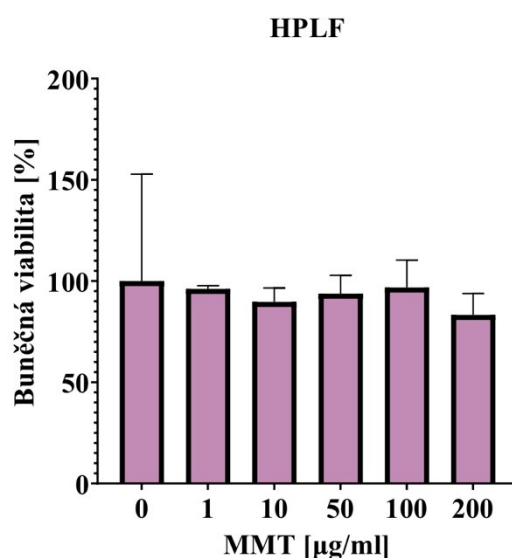
Extrakt MMT, stejně jako extrakt MMM, neměl statisticky významný vliv na buněčnou životaschopnost ani u jedné buněčné linie viz Obrázek 11, Obrázek 12 a Obrázek 13.



Obrázek 11: Graf znázorňující vliv MMT na životaschopnost DOK – metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).



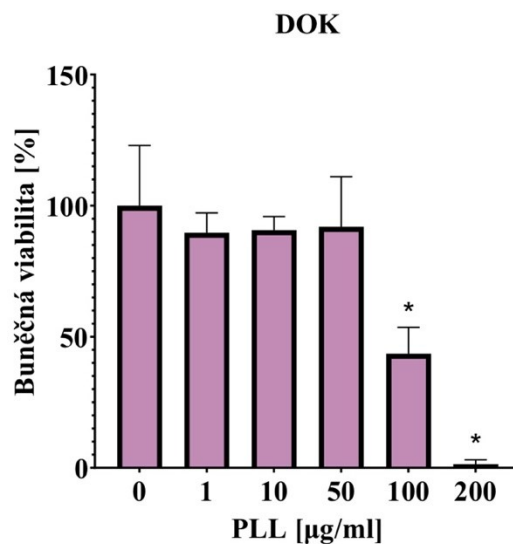
Obrázek 12: Graf znázorňující vliv MMT na životaschopnost HGnF – metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).



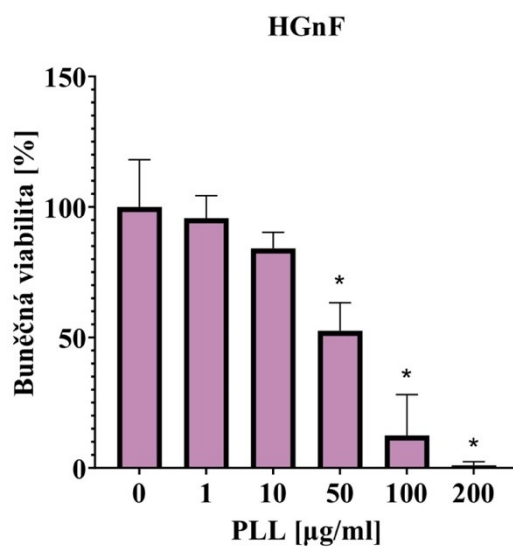
Obrázek 13: Graf znázorňující vliv MMT na životaschopnost HPLF – metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).

5.1.3 Cytotoxicita PLL

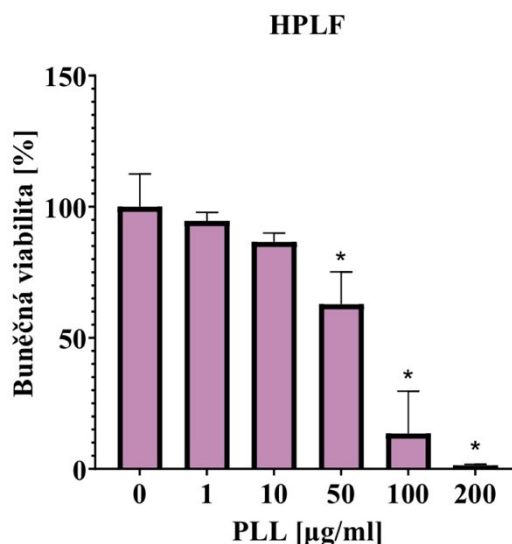
Vyšší koncentrace extraktu PLL způsobily u všech liniích statisticky signifikantní snížení metabolické aktivity oproti kontrole. Pokles viability DOK byl u koncentrací 100 µg/ml a 200 µg/ml viz Obrázek 14. U HGnF a HPLF se projevil tento efekt již od koncentrace 50 µg/ml viz Obrázek 15 a Obrázek 16.



Obrázek 14: Graf znázorňující vliv PLL na životaschopnost DOK, metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).



Obrázek 15: Graf znázorňující vliv PLL na životaschopnost HGnF, metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).



Obrázek 16: Graf znázorňující vliv extraktu PLL na životaschopnost HPLF, metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).

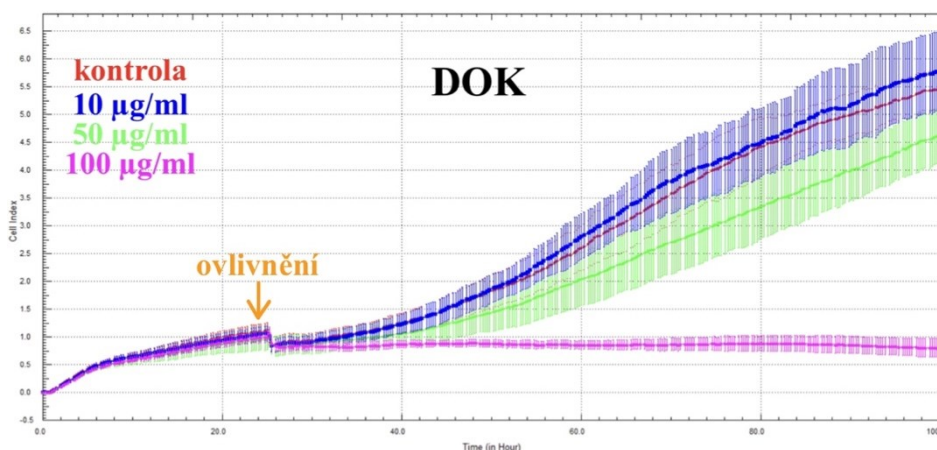
5.2 Stanovení cytotoxicity PLL metodou xCELLigence

Cytotoxicita řečíku lentišku (PLL) byla ověřena metodou xCELLigence RTCA, která umožňuje sledování buněk v reálném čase. Princip experimentu je založen na monitorování buněk přisedlých na dno jamek E-plates. Interakce mezi přisedlými buňkami a mikroelektrodami je zaznamenána jako impedance. Čím více buněk je přisedlých na dně jamky, tím vyšší impedanci přístroj naměří (18). Síla buněčné adheze byla softwarem převedena na buněčný index, tzv. cell index (CI, bezrozměrná veličina). Jak buňky přilnou k E-plates, hodnota CI se od nuly zvyšuje, což je obvykle patrné během prvních 10-15 minut po nasazení. Počáteční nárůst (0-4 h) CI je spojen s připojením a adhezí buněk, následuje šíření a krátká fáze plató.

Po 24 hodinách inkubace buněk byl přidán roztok PLL o různých koncentracích. Při cytotoxických koncentracích PLL buňky začaly odumírat, což se projevilo snížením počtu buněk, které byly přisedlé na dně E-plate a následným snížením měřené impedance, tedy snížením hodnoty CI. Změny buněčného indexu byly zaznamenány pomocí vytvořených křivek v reálném čase. Cytotoxicita PLL byla měřena ve třech nezávislých experimentech, které vyšly velmi podobně, a posléze byl na ukázkou vybrán záznam jednoho měření pro každou buněčnou linii.

5.2.1 Dysplastické orální keratinocyty

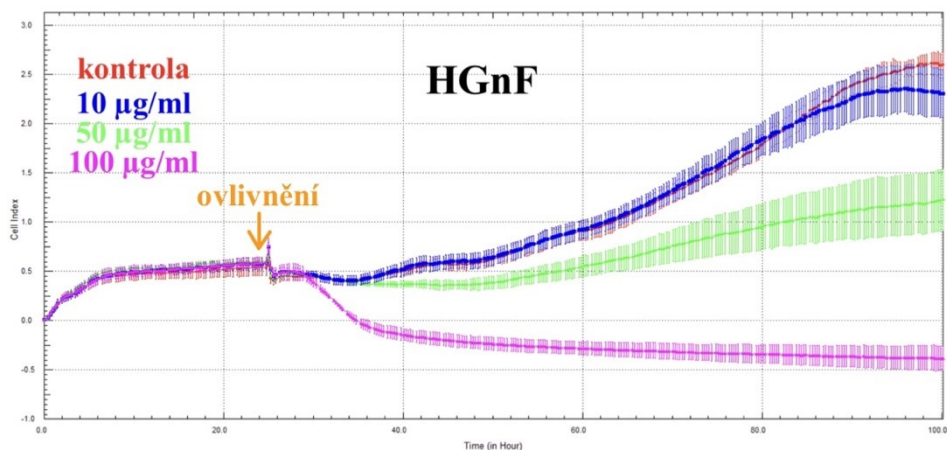
Po ovlivnění PLL je patrný nárůst buněčného indexu DOK u koncentrací 10 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$. Křivka CI při koncentraci PLL 10 $\mu\text{g/ml}$ měla obdobný průběh jako kontrola, zatímco u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ byl nárůst lehce snížený oproti kontrole. Nejvyšší koncentrace PLL (100 $\mu\text{g/ml}$) inhibovala buněčnou proliferaci, u těchto buněk nastala fáze plató viz Obrázek 17.



Obrázek 17: Růstové křivky DOK před a po ovlivnění řečíkem lentiškem (PLL)

5.2.2 Lidské gingivální fibroblasty

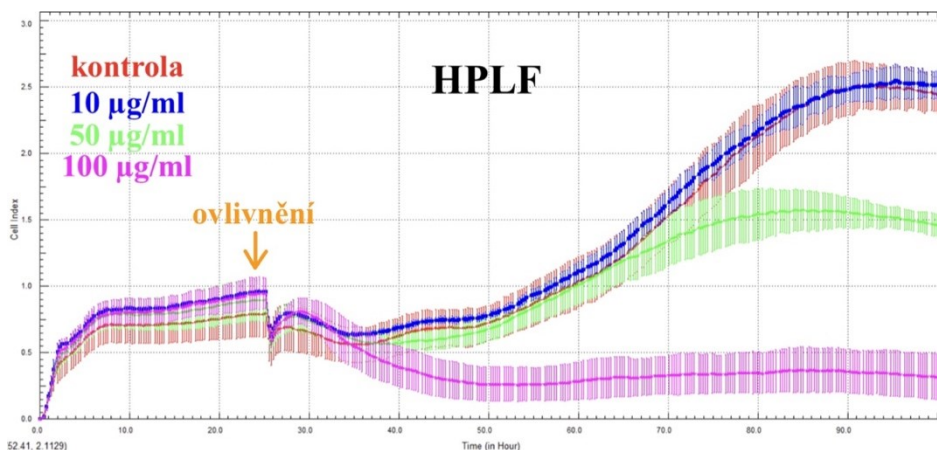
U gingiválních fibroblastů došlo, stejně jako u keratinocytů, k nárůstu buněčného indexu u koncentrací PLL 10 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$. Při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ měla křivka obdobný růst jako kontrola, ale ke konci inkubace vykazovala mírný pokles, buňky se zde dostaly do fáze odumírání. Koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ byla zpočátku ve fázi plató a přibližně 26 hodin po ovlivnění začaly buňky proliferovat a došlo k postupnému zvyšování CI. Koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ byla pro gingivální fibroblasty toxická, buněčný index pár hodin po ovlivnění prudce klesl a přibližně po 11 hodinách od ovlivnění již klesl na nulu (Obrázek 18).



Obrázek 18: Růstové křivky HGnF před a po ovlivnění řečíkem lentiškem (PLL)

5.2.3 Lidské periodontální vazivové fibroblasty

U HPLF se růstová křivka koncentrace 10 µg/ml shodovala s růstovou křivkou kontroly. Buňky ovlivněné koncentrací 50 µg/ml měly nárůst buněčného indexu obdobný jako kontrola, od 41. hodiny (od ovlivnění) začaly hodnoty klesat a ke konci měření přešly buňky do fáze umírání. Koncentrace 100 µg/ml byla toxická, stejně jako u gingiválních fibroblastů, k odumírání a oddělení buněk od dna došlo několik hodin po ovlivnění a přibližně po 26 hodinách přešly do fáze plató viz Obrázek 19.



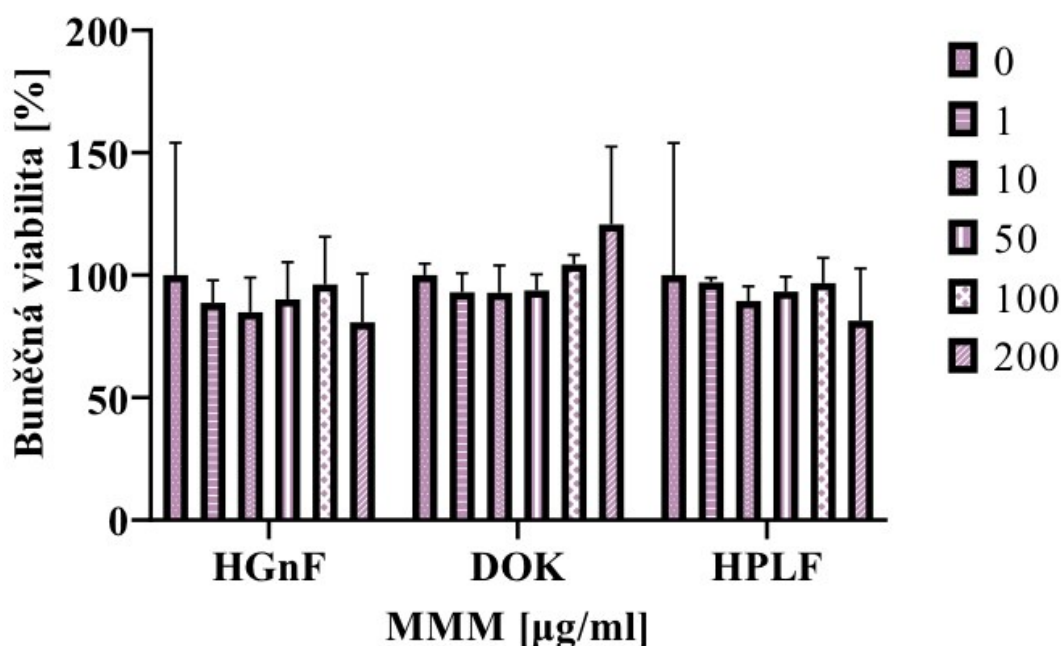
Obrázek 19: Růstové křivky HPLF před a po ovlivnění řečíkem lentiškem (PLL)

6 DISKUZE

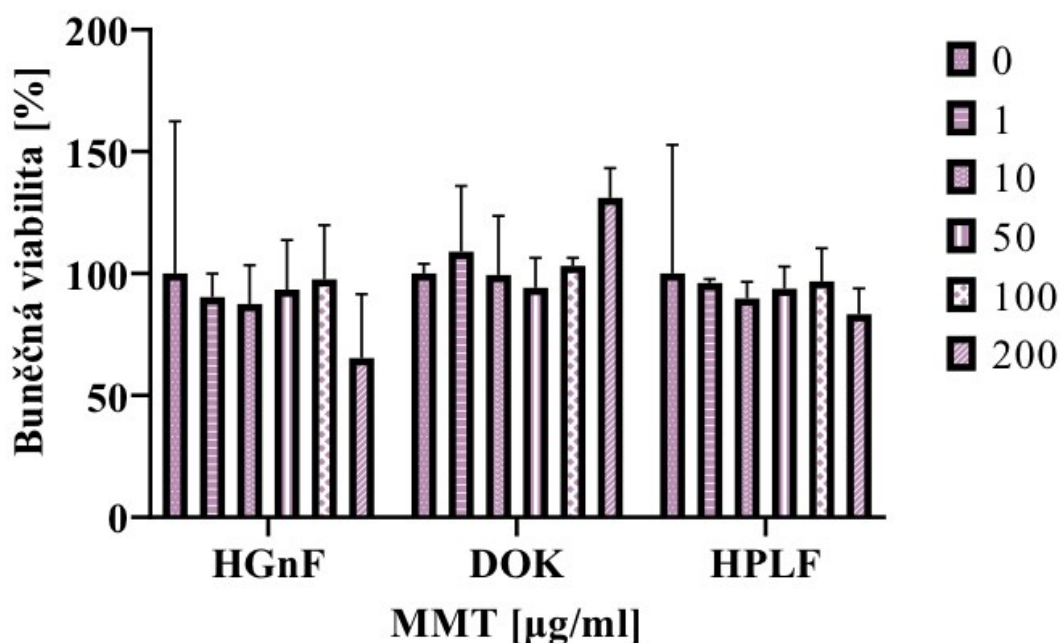
Životaschopnost buněk je klíčovým parametrem pro jakýkoli buněčný model. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto mnoho testů pro stanovení životaschopnosti buněk (32). Navzdory své nesporné užitečnosti pro analýzu buněk, je potřeba brát v úvahu velké množství procesů, které probíhají v buňce současně a které mohou ovlivnit výkonnost testu.

Nevýhodou testů na bázi tetrazoliových solí je, že jsou založené na metabolické aktivitě, která nemusí vždy souviset s životaschopností buněk. Buňky by mohly růst víc, ale metabolizovat méně např. při zvýšené hustotě a spotřebě média dochází k utlumení mitochondriálních funkcí, to způsobuje falešně pozitivní cytotoxicitu (33).

Cílem této práce bylo otestovat cytotoxicitu rostlinných extraktů (MMM, MMT a PLL) na tři buněčné linie dutiny ústní (HGnF, DOK a HPLF). Buněčné linie odvozené z buněk dutiny ústní byly vybrány proto, že tyto rostlinné extrakty jsou plánovány pro použití v ústních vodách a přípravcích ústní hygieny. Pozitivní efekt jednotlivých rostlin na buňky byl již několika studiemi prokázán (34), avšak jejich kombinace (MMM a MMT) ještě nebyla otestována. V případě lentišku byl jeho efekt již zkoušen, výsledky se ale pokaždé lišily (viz níže). Hodnocení pomocí testu WST-1 nám umožnilo studovat metabolickou aktivitu každé linie po kontaktu se zvyšujícími se koncentracemi PLL, MMM a MMT. Vodný výluh složený z *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Mentha spicata* (MMM) neměl toxický vliv na testované orální buňky (Obrázek 20), stejně tak i výluh z *Malva sylvestris*, *Melissa officinalis* a *Thymus vulgaris* (MMT) (Obrázek 21).



Obrázek 20: Souhrnný graf znázorňující vliv MMM na životaschopnost HGnF, DOK a HPLF, metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).

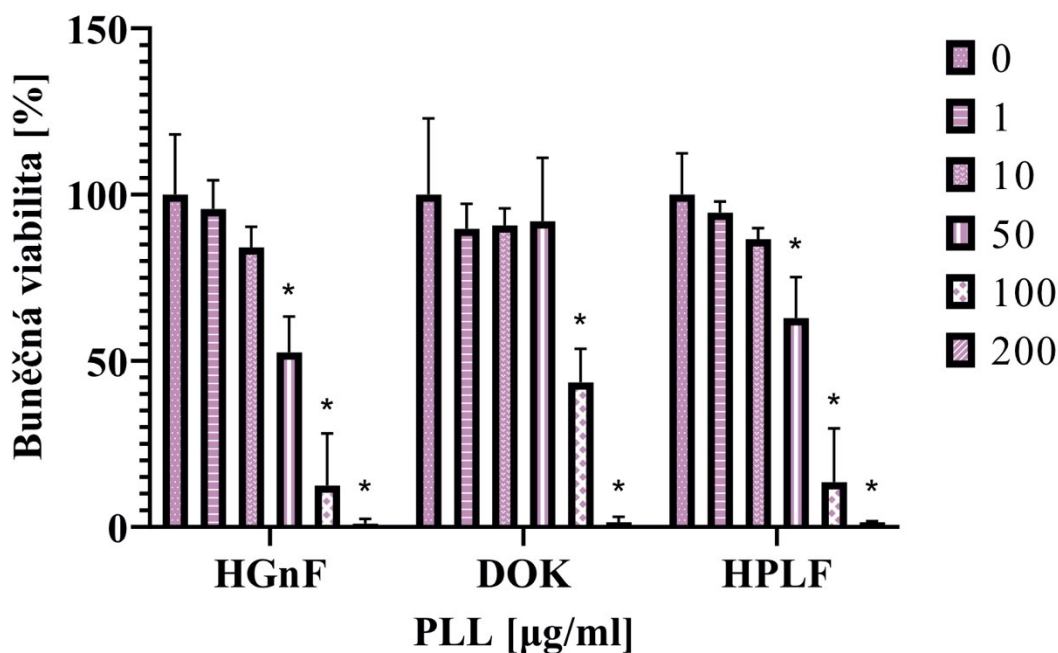


Obrázek 21: Souhrnný graf znázorňující vliv MMT na životaschopnost HGnF, DOK a HPLF, metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).

Při měření vlivu vodného výluhu *Pistacia lentiscus* (PLL) metodou WST-1, vyšlo najevo, že koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ a 200 $\mu\text{g/ml}$ měly negativní dopad na metabolickou aktivitu u všech testovaných buněčných linií. Tento nežádoucí vliv měla také koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ na HGnF a HPLF (viz Obrázek 22). Metabolická aktivita DOK nebyla PLL v

koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ ovlivněna. Odlišné výsledky mohou být zapříčiněné jiným druhem buněk (dysplastické buňky jsou všeobecně odolnější vůči poškození).

Studie, která zkoumala vliv silice *Pistacia lentiscus* (koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$) metodou WST-1, ukázala, že silice neovlivňuje životaschopnost orálních buněk (gingiválních fibroblastů, periodontálních ligamentových fibroblastů, dysplastických orálních keratinocytů a primárních gingiválních keratinocytů) (35). V další studii se ukázalo, že vodný výluh *Pistacia lentiscus* je hepatotoxický, je-li podáván denně po dobu 5 týdnů (36). Při porovnání našich výsledků a těch ze studií, je patrné, že rozdílný efekt řečiku lentišku je způsobený jeho metodou zpracování, v silici a ve vodném výluhu jsou zastoupeny jiné obsahové látky. Příčinou mohou být i jiné podmínky a lokality sběru.



Obrázek 22: Souhrnný graf znázorňující vliv PLL na životaschopnost HGnF, DOK a HPLF, metoda WST-1. Průměr ze tří nezávislých měření \pm SD. Statisticky významná změna oproti kontrole označena hvězdičkou ($p < 0,05$).

K ověření, že se nejednalo o falešně pozitivní výsledky, byla provedena druhá metoda na stanovení cytotoxicity PLL – sledování buněk v reálném čase pomocí xCELLigence RTCA.

Měření cytotoxicity pomocí xCELLigence poskytuje užitečné údaje pro měření buněčné smrti adheřujících buněk. V porovnání s jednorázovými „end-point“ testy, poskytuje díky

dynamickému čtení v reálném čase informace o tom, kdy pravděpodobně dochází k odumírání buněk.

Metodou xCELLigence se potvrdila cytotoxicita PLL u koncentrace 100 µg/ml – buněčný index klesl na hodnotu 0 pár hodin po ovlivnění u všech buněčných linií. Koncentrace PLL 50 µg/ml způsobila u HGnF a HPLF snížení proliferace (viz Obrázek 18, Obrázek 19). Toxicita této koncentrace se u DOK neprojevila, stejně jako u metody WST-1 (viz Obrázek 17, Obrázek 22). Odlišné výsledky mohou být dány typem buněk, jak bylo psáno výše, nebo rozdílnou adhezí fibroblastů a keratinocytů. Z růstových křivek je možné vidět, že po ovlivnění dochází u této metody ke skoku buněčného indexu (tzv. doba akutní reakce). Tento skok je způsoben výměnou média, nikoliv samotným extraktem (viz Obrázek 17, Obrázek 18 a Obrázek 19).

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo studium cytotoxicity rostlinných extraktů MMM, MMT a PLL na 3 orálních buněčných liniích. Cytotoxicita všech extraktů byla sledována metodou WST-1. Navíc pro potvrzení cytotoxicity PLL bylo využito sledování buněk v reálném čase metodou xCELLigence, jehož výstup byl srovnatelný s metodou WST-1. Ze získaných výsledků lze učinit závěr, že vodní výluh:

1. Máty klasnaté, meduňky lékařské a slézu lesního (MMM) není cytotoxický na DOK, HGnF a HPLF.
2. Meduňky lékařské, slézu lesního a tymiánu obecného (MMT) nemá toxický vliv na DOK, HGnF a HPLF.
3. Řečíku lentišku (PLL) při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ a vyšší inhibuje proliferaci HGnF a HPLF.
4. Řečíku lentišku (PLL) při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a 200 $\mu\text{g/ml}$ působí toxicky na DOK.

Závěrem lze konstatovat, že extrakty MMM a MMT mohou být součástí přípravků na dutinu ústní. V případě PLL platí totéž, je-li použit výluh o koncentraci nižší než 50 $\mu\text{g/ml}$.

8 SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
CI	buněčný index
D-MEM	Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DOK	dysplastické orální keratinocyty
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetální bovinní sérum
HGnF	lidské gingivální fibroblasty
HPLF	lidské periodontální vazivové fibroblasty
LDH	laktátdehydrogenáza
MMM	<i>Malva sylvestris</i> , <i>Melissa officinalis</i> a <i>Mentha spicata</i>
MMT	<i>Malva sylvestris</i> , <i>Melissa officinalis</i> a <i>Thymus vulgaris</i>
mPMS	1-methoxy-5-methyl-fenazinium-methyl sulfát
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid – oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadenindinukleotid – redukována forma
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok
PLF	periodontální vazivové fibroblasty

PLL	<i>Pistacia lentiscus</i>
PMS	fenazin methosulfát
WST-1	4-[3(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. WHO Global Centre for Traditional Medicine [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.who.int/initiatives/who-global-centre-for-traditional-medicine>
2. MARTÍNKOVÁ, Petra. *Byliny a koření: encyklopedie*. 3. vyd. Čestlice: Rebo, 2008. ISBN 978-80-7234-664-6.
3. SEHAKI, Chabha, Nathalie JULLIAN, Fadila AYATI, Farida FERNANE a Eric GONTIER. A Review of Pistacia lentiscus Polyphenols: Chemical Diversity and Pharmacological Activities. *Plants* [online]. 2023, **12**(2), 279. ISSN 2223-7747. Dostupné z: [doi:10.3390/plants12020279](https://doi.org/10.3390/plants12020279)
4. Pistacia lentiscus (Mastic Tree). *Gardenia.net* [online]. [cit. 2023-03-10]. Dostupné z: <https://www.gardenia.net/plant/pistacia-lentiscus>
5. EL MENYIY, Naoual et al. Medicinal Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of Mentha spicata. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2022, **2022**, 1–32. ISSN 1741-4288, 1741-427X. Dostupné z: [doi:10.1155/2022/7990508](https://doi.org/10.1155/2022/7990508)
6. *Spearmint* | plant | *Britannica* [online]. 15. únor 2023 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/spearmint>
7. CECCANTI, Costanza, Marco LANDI, Lucia GUIDI, Alberto PARDOSSI a Luca INCROCCI. Seasonal Fluctuations of Crop Yield, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Fresh or Cooked Borage (*Borago officinalis* L.), Mallow (*Malva sylvestris* L.) and Buck's-Horn Plantain (*Plantago coronopus* L.) Leaves. *Horticulturae* [online]. 2022, **8**(3), 253. ISSN 2311-7524. Dostupné z: [doi:10.3390/horticulturae8030253](https://doi.org/10.3390/horticulturae8030253)
8. BATIHA, Gaber El-Saber et al. The phytochemical profiling, pharmacological activities, and safety of malva sylvestris: a review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [online]. 2023, **396**(3), 421–440. ISSN 0028-1298. Dostupné z: [doi:10.1007/s00210-022-02329-w](https://doi.org/10.1007/s00210-022-02329-w)
9. RAUSCH, Andrea, Brigitte LOTZ a Václav VĚTVIČKA. *Bylinky: lexikon : pěstování, kuchyně, kosmetika, zdraví*. 2. vyd. Čestlice: Rebo, 2007. ISBN 978-80-7234-

735-3.

10. JONÁŠ, Josef a Jiří KUCHAR. *Svět přírodních antibiotik: tajné zbraně rostlin : 88 přírodních zdrojů pro zdravý imunitní systém a prevenci i terapii virových, bakteriálních a plísňových infekcí*. Praha: Eminent, 2014. ISBN 978-80-7281-479-4.

11. KONSTANTINOVIĆ, Bojan et al. The Effect of *Thymus vulgaris* L. Hydrolate Solutions on the Seed Germination, Seedling Length, and Oxidative Stress of Some Cultivated and Weed Species. *Plants* [online]. 2022, **11**(13), 1782. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11131782

12. ZELL, H. *Thymus vulgaris* [online]. 16. květen 2009 [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thymus_vulgaris_001.JPG

13. GHASEMI PIRBALOUTI, Abdollah, Masoud HASHEMI a Fatemeh Taherian GHAHFAROKHI. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* [online]. 2013, **48**, 43–48. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2013.04.004

14. GHAZIZADEH, Javid et al. The effects of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) on depression and anxiety in clinical trials: A systematic review and meta-analysis. *Phytotherapy Research* [online]. 2021, **35**(12), 6690–6705. ISSN 0951-418X, 1099-1573. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.7252

15. Lemon balm Information | Mount Sinai - New York. *Mount Sinai Health System* [online]. [cit. 2023-03-10]. Dostupné z: <https://www.mountsinai.org/health-library/herb/lemon-balm>

16. PETRISOR, Gabriela et al. *Melissa officinalis*: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems—A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(7), 3591. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23073591

17. BUNEL, Valérian, Moustapha OUEDRAOGO, Anh NGUYEN, Caroline STÉVIGNY a Pierre DUEZ. Methods Applied to the In Vitro Primary Toxicology Testing of Natural Products: State of the Art, Strengths, and Limits. *Planta Medica* [online]. 2014, **80**(14), 1210–1226. ISSN 0032-0943, 1439-0221. Dostupné

z: doi:10.1055/s-0033-1360273

18. GARCIA, Sandra N., Leslie GUTIERREZ a Amy MCNULTY. Real-time cellular analysis as a novel approach for *in vitro* cytotoxicity testing of medical device extracts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2013, **101A**(7), 2097–2106. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.34507
19. KUMAR, Priti, Arvindhan NAGARAJAN a Pradeep D. UCHIL. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2018, **2018**(6). ISSN 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095505
20. ARAB-BAFRANI, Zahra, Daryoush SHAHBAZI-GAHROUEI, Mahdi ABBASIAN a Mehrafarin FESHARAKI. Multiple MTS Assay as the Alternative Method to Determine Survival Fraction of the Irradiated HT-29 Colon Cancer Cells. *Journal of Medical Signals and Sensors*. 2016, **6**(2), 112–116. ISSN 2228-7477.
21. KUETE, Victor, ed. *Medicinal spices and vegetables from Africa: therapeutic potential against metabolic, inflammatory, infectious and systemic diseases*. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-809286-6.
22. SARI, Ceren. A comparative study of MTT and WST-1 assays in cytotoxicity analysis. *Haydarpasa Numune Training and Research Hospital Medical Journal* [online]. 2019 [cit. 2023-03-20]. ISSN 13006363. Dostupné z: doi:10.14744/hnhj.2019.16443
23. SCARCELLO, Eleonora, Alexia LAMBREMONT, Rita VANBEVER, Pascal J. JACQUES a Dominique LISON. Mind your assays: Misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese. *PLoS ONE* [online]. 2020, **15**(4), e0231634. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0231634
24. *WST-1 Cell Proliferation Assay Reagent* [online]. B.m.: Life Science Research Products & Solutions - Cell Biolabs, Inc. Dostupné z: <https://www.cellbiolabs.com/cell-proliferation-assay-reagent-colorimetric>
25. LONGHIN, Eleonora Marta, Naouale EL YAMANI, Elise RUNDÉN-PRAN a Maria DUSINSKA. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology* [online]. 2022, **4**, 981701. ISSN 2673-3080. Dostupné z: doi:10.3389/ftox.2022.981701

26. ZHANG, Kejia, Renjie PAN, Tuqiao ZHANG, Jia XU, Xinyan ZHOU a Yulong YANG. A novel method: using an adenosine triphosphate (ATP) luminescence-based assay to rapidly assess the biological stability of drinking water. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(11), 4269–4277. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-019-09774-3
27. NGUYEN, Linh Thuy, Markéta ZAJÍČKOVÁ, Eva MAŠÁTOVÁ, Petra MATOUŠKOVÁ a Lenka SKÁLOVÁ. The ATP bioluminescence assay: a new application and optimization for viability testing in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research* [online]. 2021, **52**, 124. ISSN 0928-4249. Dostupné z: doi:10.1186/s13567-021-00980-4
28. RISS, Terry, Andrew NILES, Rich MORAVEC, Sarah DUELLMAN, Helene BENINK, Tracy WORZELLA a Lisa MINOR. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In: *Assay Guidance Manual* [online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004 [cit. 2022-12-02]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/>
29. EUROPEAN COLLECTION OF AUTHENTICATED CELL CULTURES (ECACC). *ECACC General Cell Collection: DOK* [online]. B.m.: Public Health England, nedatováno. Dostupné z: https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=94122104&collection=ecacc_gc
30. *Human Gingival Fibroblasts (HGnF) | ScienCell Research Laboratories* [online]. [cit. 2023-03-01]. Dostupné z: https://www.sciencellonline.com/human-gingival-fibroblasts.html#product_tabs_description_tabbed
31. SHEN, Jinkun. Human Periodontal Ligament Fibroblasts [online]. nedatováno [cit. 2023-03-01]. Dostupné z: <https://www.sciencellonline.com/human-periodontal-ligament-fibroblasts.html>
32. KAMILOGLU, Senem, Gulce SARI, Tugba OZDAL a Esra CAPANOGLU. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* [online]. 2020, **1**(3), 332–349. ISSN 2643-8429. Dostupné z: doi:10.1002/fft2.44
33. GALLUZZI, L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for

monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation* [online]. 2009, **16**(8), 1093–1107. ISSN 1350-9047. Dostupné z: doi:10.1038/cdd.2009.44

34. PARHAM, Shokoh, Anousheh Zargar KHARAZI, Hamid Reza BAKHSHESHI-RAD, Hadi NUR, Ahmad Fauzi ISMAIL, Safian SHARIF, Seeram RAMAKRISHNA a Filippo BERTO. Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials. *Antioxidants* [online]. 2020, **9**(12), 1309. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox9121309

35. ELSTNEROVÁ, Marie. Silice řečičku lentišku: in vitro stanovení cytotoxicity a protizánětlivé aktivity [online]. 2020 [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/123372>

36. LJUBUNCIC, Predrag, Hui SONG, Uri COGAN, Hassan AZAIZEH a Arieh BOMZON. The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2005, **100**(1), 100th Volume Special Section: Perspectives of Ethnopharmacology, 198–204. ISSN 0378-8741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2005.03.006

10 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: ZELL, H. *wikimedia.org* [online]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pistacia_lentiscus_002.jpg

Obrázek 2: ASSIANIR. *wikimedia.org* [online]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mentha_spicata_L..jpg

Obrázek 3: ALVESGASPAR. *wikimedia.org* [online]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mallow_January_2008-1.jpg

Obrázek 4: ZELL, H. *wikimedia.org* [online]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thymus_vulgaris_001.JPG

Obrázek 5: LINE, Color. *flickr.com* [online]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: <https://www.flickr.com/photos/sunrise/14136194>

Obrázek 6: WANG, Yu. *researchgate.net* [online]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-mechanism-of-the-WST-1-reduction-With-intermediate-electron-acceptor-such-as_fig1_234048394

Obrázek 7: LIMAME, Ridha. *researchgate.net* [online]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/xCELLigence-RTCA-impedance-based-detection-of-cell-viability-and-motility_fig1_232649712

Obrázek 8-22: Vlastní zpracování

Tabulka 1-3: Vlastní zpracování