

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI**  
**KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

**VLIV KATECHINŮ NA TOXICITU VYBRANÝCH**  
**LÉČIV**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Bc. Petra Rudolfová

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.“

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D., za odborné vedení v průběhu této práce, za podnětné rady a připomínky. Děkuji také Mgr. Veronice Hanušové za významnou spolupráci a informace, které mi poskytla. Dále děkuji všem pracovníkům na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci králové Univerzity Karlovy v Praze za ochotu a pomoc.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Petra Rudolfová

Školitel: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv katechinů na toxicitu vybraných léčiv

Katechiny se řadí mezi flavonoidy a jsou hlavními polyfenolickými sloučeninami zeleného čaje. Katechiny jsou považovány za velmi prospěšné pro lidský organismus. Pozitivně působí na kardiovaskulární systém a snižování hladiny cukru v krvi, mají antikancerogenní účinky, zabraňují tvorbě zubního kazu, mají antibakteriální, antivirové a antioxidační účinky. Katechiny však také mohou inhibovat nebo indukovat významné biotransformační enzymy a tím mohou ovlivňovat jak žádoucí, tak i nežádoucí účinky řady léčiv.

V této práci byl zkoumán *in vitro* vliv několika katechinů (katechin, epikatechin, epigallokatechin, epikatechin-3-gallát a epigallokatechin gallát) a extraktu zeleného čaje Polyfenonu E na toxicitu léčiv. Pro naši studii byly zvoleny doxorubicin a paracetamol a jeho toxický metabolit. Experimenty byly provedeny na střevní nádorové linii HCT-8 a na primární kultuře izolovaných potkaních hepatocytů. K sledování vlivu katechinů byly využity tři různé testy buněčné viability a měření tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS).

Výsledky ukázaly, že katechiny nemají vliv na proliferaci střevní linie HCT-8, zvyšují však viabilitu izolovaných hepatocytů. Katechiny neovlivňují antiproliferativní účinek doxorubicinu na střevní nádorovou linii HCT-8 ani toxicitu doxorubicinu na hepatocyty. V nižší koncentraci katechiny zvyšují toxicitu paracetamolu pro hepatocyty, ve vyšší koncentraci ji naopak snižují. Epigallokatechin gallát a Polyfenon E vykazují dobré antioxidační vlastnosti, snižují tvorbu ROS vyvolanými testovanými léčivy.

## **ABSTRACT**

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Petra Rudolfová

Supervisor: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of catechins on toxicity of selected drugs

Catechins belong to the flavonoids and they are the main polyphenolic compounds of green tea. Catechins are considered to be very beneficial for the human organism. They have positive effect on the cardiovascular system and reduction of blood sugar levels. Also they have anticancer, antibacterial, antiviral, and antioxidant effects and prevent tooth decay. Catechins, however, also may inhibit or induce important biotransformation enzymes and thus can affect both desirable and undesirable effects of many drugs.

In our study, *in vitro* effect of several of catechins (catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-gallate and epigallocatechin gallate), and green tea extract Polyfenonu E on toxicity of drugs was tested. Doxorubicin and acetaminophen, and its toxic metabolite were chosen for our study. Experiments were conducted in intestinal tumor line HCT-8, and in the primary culture of isolated rat hepatocytes. For monitoring the effects of catechins, three different cell viability tests and measurements of reactive oxygen species (ROS) were used.

The results showed that catechins have no effect on the proliferation of intestinal line HCT-8, however, they increase the viability of isolated hepatocytes. Catechins don't affect the antiproliferative effect of doxorubicin on intestinal tumor line HCT-8 or toxicity of doxorubicin into hepatocytes. The lower concentrations, catechins increase toxicity of acetaminophen for hepatocytes, but in higher concentrations, they decrease it. Epigallocatechin gallate and Polyfenon E possess good antioxidant properties and they reduce the formation of ROS induced by the tested drugs.

# Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	VÝROBA A DRUHY ČAJŮ.....	10
2.2	CHEMICKÉ SLOŽENÍ.....	12
2.2.1	Polyfenoly.....	12
2.2.2	Purinové alkaloidy.....	16
2.2.3	Třísloviny.....	18
2.2.4	Silice.....	20
2.2.5	Enzymy a vitaminy.....	20
2.2.6	Aminokyseliny.....	21
2.2.7	Anorganické látky.....	21
2.3	RESORPCE A PŘEMĚNY POLYFENOLŮ V TRÁVICÍM TRAKTU.....	22
2.4	BIOLOGICKÉ ÚČINKY ČAJE NA LIDSKÝ ORGANISMUS.....	23
2.4.1	Účinek čaje proti kardiovaskulárním onemocněním.....	23
2.4.2	Účinek čaje na diabetes mellitus.....	24
2.4.3	Čaj a rakovina.....	25
2.4.4	Antibakteriální a antivirové účinky čaje.....	26
2.4.5	Čaj a kontrola tělesné hmotnosti.....	26
2.4.6	Čaj a imunita.....	27
2.4.7	Čaj jako lék proti zubnímu kazu.....	27
2.4.8	Nepříznivé účinky čaje na lidský organismus.....	27
2.5	ANTIOXIDAČNÍ EFEKT ČAJOVÝCH POLYFENOLŮ.....	28
2.6	ÚČINKY ČAJOVÝCH POLYFENOLŮ NA ENZYMY.....	31
2.7	MOŽNÉ INTERAKCE ČAJE S LÉČIVY.....	31
2.8	PARACETAMOL A JEHO TOXICKÝ PRODUKT.....	32

2.9 DOXORUBICIN .....	34
2.10 POLYFENON E .....	35
2.11 BUNĚČNÉ LINIE .....	35
2.12 HEPATOCYTY .....	36
3 CÍLE PRÁCE.....	39
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	40
4.1 MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE .....	40
4.1.1. Biologický materiál .....	40
4.1.2. Přístroje .....	40
4.1.3. Pomůcky .....	40
4.1.4. Chemikálie .....	41
4.2 METODIKA.....	42
4.2.1 Kultivace buněčných linií HCT-8 .....	42
4.2.2 Test cytotoxicity- barvení neutrální červení (Neutral Red uptake test).....	44
4.2.3 Hepatocyty .....	47
4.2.4 Test cytotoxicity- MTT test .....	51
4.2.5 Test cytotoxicity pomocí stanovení LDH.....	53
4.2.6 Detekce ROS.....	55
5 VÝSLEDKY .....	57
5.1 Testování vlivu katechinů na buňky HCT-8 .....	57
5.2 Testování vlivu katechinů na antiproliferativní vliv DOX na buněčnou linii HCT-8 .....	63
5.3 Testování vlivu katechinů na viabilitu hepatocytů .....	74
5.4 Testování vlivu EGCG a POE na cytotoxicitu DOX.....	77
5.5 Testování vlivu EGC, EGCG a POE na cytotoxicitu PARA .....	82
5.6 Testování vlivu EGCG a POE na cytotoxicitu NAPQI .....	86
5.7 Detekce oxidačního stresu.....	88

6	DISKUZE .....	91
7	ZÁVĚRY .....	96
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	97
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	99



# 1 ÚVOD

Čaj, konzumovaný téměř 50 století, je jedním z nejpopulárnějších nápojů na celém světě. Produkce kolem 3 bilionů kilogramů ročně ho řadí, hned za vodu, na druhé místo. Surovinou pro jeho výrobu jsou listy čajovníku čínského (*Camellia sinensis*). Jeho zpracovaná podoba je známa jako zelený, černý, bílý a oolong čaj (Khan and Mukhtar 2007).

Listy čajovníku obsahují tři základní složky: kofein, polyfenoly (nesprávně nazývané taniny) a éterické oleje neboli silice. Kofein podávaný v malých dávkách stimuluje krevní oběh a centrální nervový systém. Usnadňuje vylučování a působí jako diuretikum, napomáhající činnosti ledvin. Silice se tvoří v listech čajovníku během růstu. Vytváří aroma nápoje a napomáhají také zažívání a emulgaci tuků (Chow and Kramerová 1998).

Katechiny, hlavní polyfenolické sloučeniny zeleného čaje, tvoří 10-30 % sušiny čajových listů. In vitro studie dokazují jejich prospěšnost na lidský organismus. Pitím zeleného čaje lze předcházet rakovině, preventivně působí proti diabetu mellitu, napomáhá snížit riziko kardiovaskulárních chorob, usnadňuje redukovat váhu, působí antioxidantně, inhibuje klíčové enzymy zapojené do biosyntézy lipidů. Příznivé zdravotní účinky čaje jsou rozsáhle studovány a v posledních letech získávají velkou pozornost (Velayutham 2008, Khan 2007).

Katechiny jsou schopny modulovat aktivitu a expresi některých enzymů metabolizujících léčiva. Tato schopnost katechinů může být příčinou jejich chemoprotektivního působení, na druhé straně by však mohla způsobit nežádoucí změny v účinku či chování léčiv v organismu. V předložené diplomové práci, která je pokračováním mé práce bakalářské, jsme se zaměřili na sledování vlivu katechinů na toxicitu léčiv doxorubicinu a paracetamolu ve 2 různých modelových systémech. Jako zástupci katechinů byly zvoleny katechin, epikatechin, epigallokatechin, epikatechin-3-gallát a epigallokatechin gallát, které se v zeleném čaji vyskytují nejvíce. Současně byla použita i komerčně dostupná směs katechinů ze zeleného čaje (Polyfenon E).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 VÝROBA A DRUHY ČAJŮ

Existuje mnoho druhů čajů, avšak rostlina, z níž pocházejí, je jen jedna - čajovník čínský (*Camellia sinensis*, Theaceae). Různé druhy čajů vznikají rozdílným zpracováním čajových lístků po jejich sklizení (Mitscher and Dolby 2006). Proces výroby čaje je založen na zabránění nebo umožnění oxidace čajových polyfenolů oxidasami obsaženými v čajových listech. V závislosti na stupni oxidace můžeme čaj rozdělit do 3 typů: zelený - neoxidovaný, oolong čaj- částečně oxidovaný a černý – plně oxidovaný (Velayutham et al. 2008). Čím déle jsou listy oxidovány, tím nižší je výsledný obsah polyfenolů a vyšší obsah kofeinu (Sharangi 2009).

Oxidace je často nepřesně označována jako proces fermentace. Pojem oxidace však přesně vystihuje chemický děj, kterým látky obsažené v čajových listech procházejí. V žádném případě se nejedná o pravou fermentaci čili chemický proces vyvolaný živými organismy (Chow and Kramerová 1998).

U všech druhů čajů se ať po oxidačním nebo neoxidačním zpracování čajové lístky svinují, aby došlo k vytlačení šťávy na povrch listů, a suší se v horkém vzduchu, aby se snížila jejich vlhkost. Zpracované lístky se postupně prosévají několika různě hustými sítami, aby se roztřídily podle velikosti. Do nejlepších čajů se vybírají největší lístky, nižší třídy obsahují menší úlomky (Mitscher and Dolby 2006).

#### ZELENÝ ČAJ

Zelený čaj prochází nejjednodušším způsobem zpracování. Tradičně proto, aby se uchovala jeho svěží chuť a vůně, z moderního hlediska i proto, aby v čaji pokud možno zůstalo co nejvíce chemických sloučenin obsažených v čerstvém listu. Mírným napařením nebo zahřátím lístků se zabráni oxidaci, následkem čehož si listy uchovávají důležité přirozené antioxidanty (Mitscher and Dolby 2006). Zelený čaj je bohatý na sloučeniny, které mají pozitivní účinky na lidský organismus (Sharangi 2009).

#### ČERNÝ ČAJ

Černý čaj má výraznější vůni a chuť a je tmavší než zelený čaj. Lístky černého čaje se zpracovávají déle. Součástí zpracování je proces autooxidace (kdy se čajové

lístky nechávají zavadnout za působení enzymů přítomných v čajových listech), která způsobuje tmavě hnědou až načervenalou barvu lístků. Tímto procesem se však, bohužel, značně snižuje obsah polyfenolů, které se v čajových listech přirozeně vyskytují. Přestože prospívá zdraví méně než čaj zelený, je zatím ve světě nejoblíbenějším druhem čaje (Mitscher and Dolby 2006).

## PU-ERH ČAJ

Pro přípravu čaje Pu-erh je využívána drastická fermentace a dlouhé uskladnění (50-100 let) ve vlhkých podmínkách, kdy se tohoto procesu můžou účastnit různé typy bakterií a hub. Bioaktivní produkty mikroorganismů mají vliv na výsledné biologické vlastnosti tohoto čaje. (Janega and Babál 2007).

## BÍLÝ ČAJ

Pupeny a mladé lístky se sbírají krátce před tím, než se pupeny zcela otevřou. Poté jsou listy napařeny a usušeny s minimálním zpracováním. Z tohoto důvodu si bílý čaj zachovává nejvíce antioxidantů a zároveň obsahuje nejméně kofeinu ze všech druhů čaje vyráběných z čajovníku (Sharangi 2009).

## OOLONG ČAJ

Oolong čaj je čínský výraz pro „černého draka“. Je připraven z částečně zoxidovaných čajových lístků, takže má o něco výraznější chuť než čaj zelený, je však jemnější než plně zoxidovaný černý čaj. Díky částečné oxidaci je však obsah polyfenolů v oolongu nižší než v zeleném čaji (Mitscher and Dolby 2006). Přesto obsahuje dostatek antioxidantů, které chrání zdravé kožní buňky a zpomalují proces stárnutí (Sharangi 2009).

Pokud bychom srovnaly obsah kofeinu a katechinů v různých druzích čaje, bylo by pořadí následující:

Obsah kofeinu: černý čaj > oolong čaj > zelený čaj > čerstvé čajové lístky

Obsah katechinů: zelený čaj > oolong čaj > čerstvé čajové lístky > černý čaj (Sharangi, 2009).

## 2.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ

Čajové lístky obsahují polyfenoly (flavonoidy, theaflaviny, thearubiginy), purinové alkaloidy (kofein, theobromin, theofylin), éterické oleje, aminokyseliny, polysacharidy, lipidy, vitaminy (vitamin C), anorganické prvky a mnoho dalších sloučenin (Sharangi 2009).

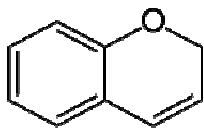
### 2.2.1 Polyfenoly

Rostlinné polyfenoly jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními účinky v naší stravě. Zároveň jsou primárně zodpovědné za prospěšné vlastnosti čaje. Na celkovém příjmu polyfenolů se asi ze dvou třetin podílí flavonoidy, přibližně jednou třetinou fenolové kyseliny a ostatní polyfenoly (lignany a stilbeny) tvoří minoritní podíl (Slanina and Táborská 2004, Sharangi 2009).

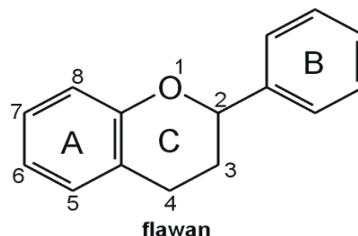
#### 2.2.1.1 Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy se řadí mezi velice rozsáhlou skupinu rostlinných látek odvozených od fenolů (Velíšek (3) 1999). Vyznačují se antioxidačními, protizánětlivými a protialergickými vlastnostmi (Sharangi 2009).

Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny, 2*H*-chromenu (Obr 1.) substituovaného v poloze C-2 fenylovou skupinou, nazývané flavan (Obr. 2) (Velíšek (3) 1999).



**Obr. 1:** Struktura 2*H*-chromenu

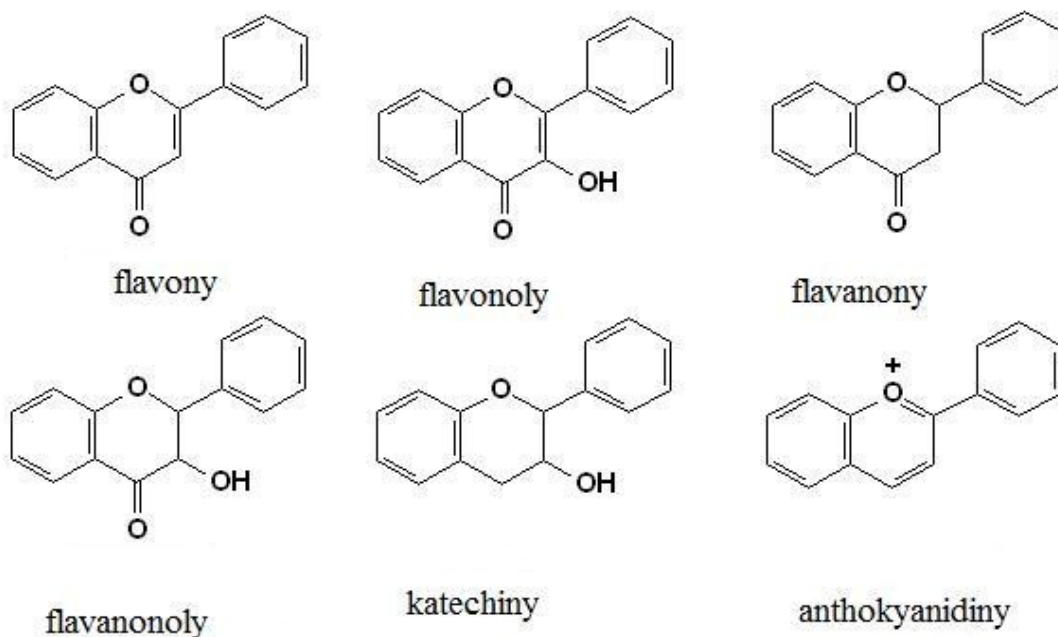


**Obr. 2:** Struktura flavanu

Flavanový skelet se skládá ze dvou benzenových kruhů (A a B) a kruhu odvozeného od 2*H*-pyranu (C). Kruh B je spojen s pyranovým kruhem C v poloze C-2.

Běžně bývají všechny 3 kruhy substituovány hydroxylovými nebo methoxylovými skupinami. Jednotlivé deriváty se liší stupněm oxidace a substitucí heterocyklu obsahujícího atom kyslíku, podle čehož je můžeme rozdělit do šesti strukturních tříd (Obr.3) (Velíšek 1999, Slanina and Táborská 2004):

- flavony
- flavonoly
- flavanony
- flavanonoly
- katechiny (3-flavanoly)
- anthokyanidiny



**Obr. 3:** Obecná struktura flavonoidních látek (Velíšek 1999)

V rostlinách se flavonoidy vyskytují převážně jako  $\beta$ -glykosidy. Sacharidovou složkou je nejčastěji glukosa nebo rhamnosa, ale může to být také glukuronová kyselina, galaktosa nebo jiný sacharid. Nejčastěji je připojen jeden glykosyl, někdy jsou však substituovány dva nebo tři hydroxyly polyfenolu. V potravě se z flavonoidů nejčastěji vyskytují oligomerní proanthokyanidiny a flavanoly (katechiny) (Slanina and Táborská 2004).

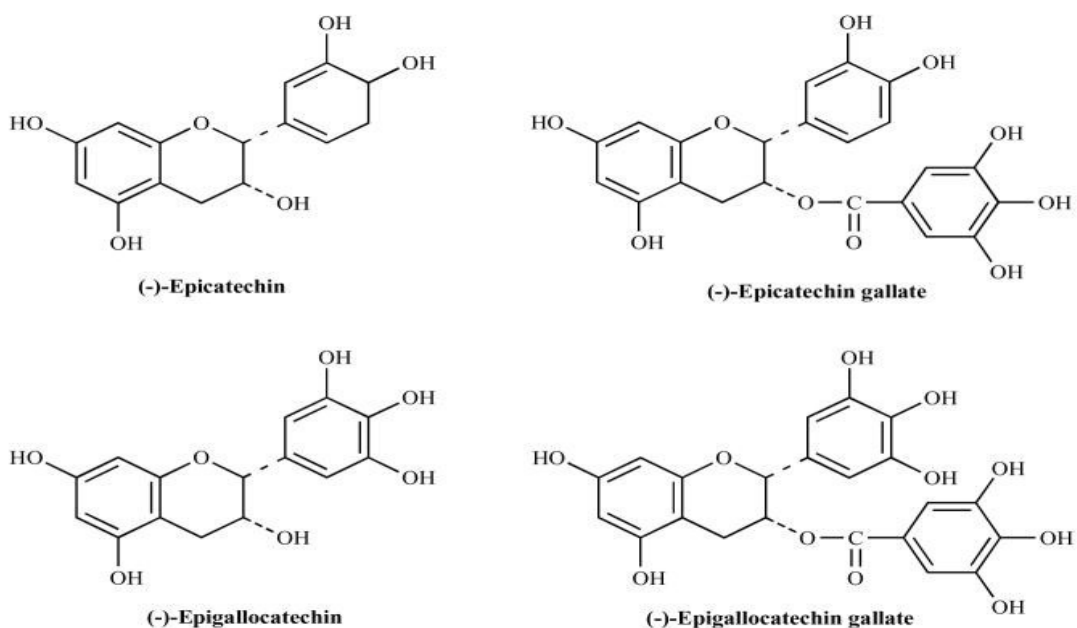
### 2.2.1.2 Katechiny

Katechiny nebo také 3-flavanoly jsou hlavní polyfenolické sloučeniny zeleného čaje, kde tvoří 10-30 % sušiny čajových listů. Způsobují trpkost a hořkost čaje a svými účinky působí ochranně na cévní systém těla (Velíšek (2) 1999, Velayutham et al. 2008). V některých případech mohou být zastoupeny až 30% podílem všech fenolových sloučenin v čaji (Augustín 2001).

Jejich kruh B je odvozen od protokatechové (3,4-dihydroxybenzoové) kyseliny. Znamé jsou taktéž gallokatechiny odvozené od gallové (3,4,5-trihydroxybenzoové) kyseliny (Velíšek (2) 1999).

Jak katechiny tak i gallokatechiny jsou sloučeniny mající v molekule dva chirální atomy uhlíku (C2 a C3), mohou se tedy vyskytovat ve čtyřech isomerech. Tzv. (+,-)-katechiny a (+,-)-gallokatechiny. V přírodě se vyskytují pouze (+)-katechiny a (+)-gallokatechiny (isomery 2R, 3S) a (-)-epikatechiny a (-)-epigallokatechiny (isomery 2R, 3R) (Velíšek (2) 1999).

V jednotlivých případech je kruh B substituován dvěma (EC, ECG) nebo třemi (EGC, EGCG) hydroxylovými skupinami. Kruh A je u všech typů katechinů substituován dvěma hydroxylovými skupinami v poloze 5 a 7. Strukturální vzorce čtyř hlavních katechinů [epigallokatechin-gallát (EGCG), epigallokatechin (EGC), epikatechin-gallát (ECG) a epikatechin (EC)] jsou uvedeny na obrázku 4 (Khan and Mukhtar 2007). U struktur je taktéž uvedeno znaménko optické rotace (+) nebo (-).

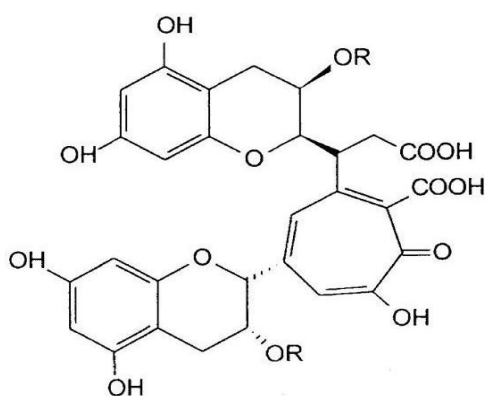


**Obr. 4:** Struktury čtyř hlavních katechinů (Velayutham a kol., 2008)

Během fermentace čajových lístků jsou katechiny oxidovány oxidoreduktasami na příslušné *o*-chinony. Ty kondenzují s přítomnými katechiny na barevné pigmenty. Tradičně se rozeznávají dvě základní skupiny takto vzniklých pigmentů čaje (dříve souhrnně nazývané oxytheotanniny) (Velíšek (3) 1999) :

- thearubiginy
- theaflaviny

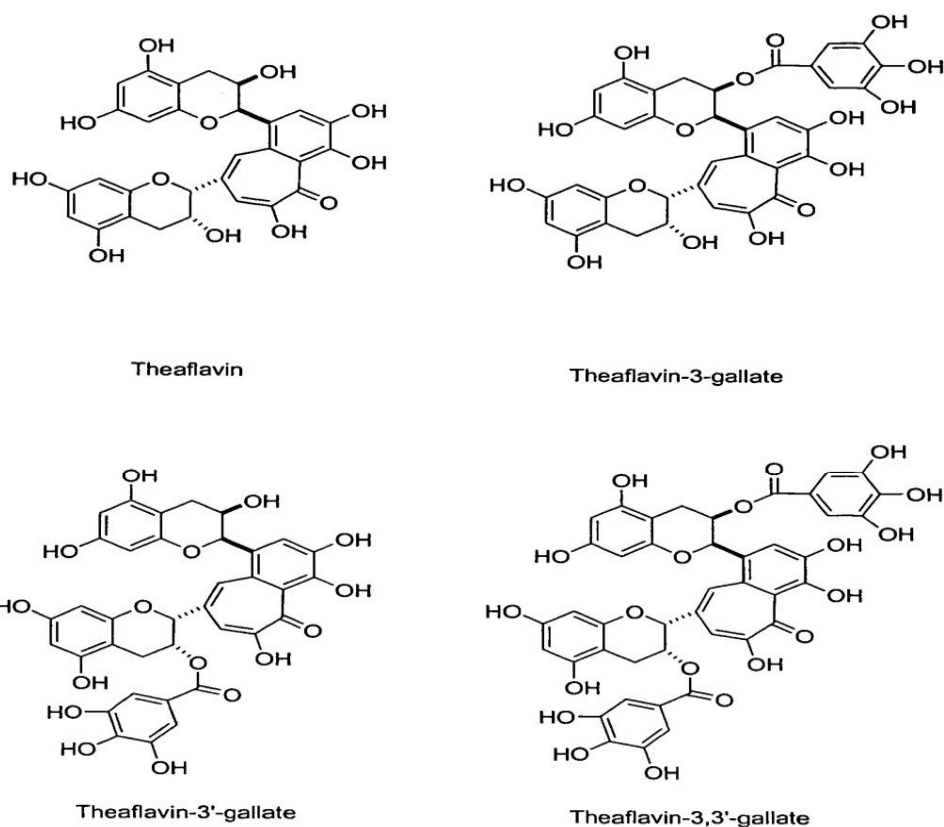
**Thearubigin** (Obr. 5) jsou velmi heterogenní směsi červeno-žlutých až oranžovo-hnědých rozpustných až nerozpustných produktů oxidace a další transformace flavanolů (Velíšek (3) 1999).



Thearubigin, R=Galloyl

**Obr. 5:** Předpokládaná struktura thearubiginu (Liang et al. 2011)

**Theaflaviny** jsou dobře rozpustné dimerní flavonoidy zářivě oranžové až červené barvy obsahující sedmičlenný tropolonový kruh. Obrázek 6 ukazuje struktury nejvýznamnějších theaflavinů theaflavin-3-gallátu, theaflavin-3'-gallátu a theaflavin-3,3'-digallátu (Velíšek (3) 1999).



**Obr. 6:** Struktury nejvýznamnějších theaflavinů (Free patents online 2011)

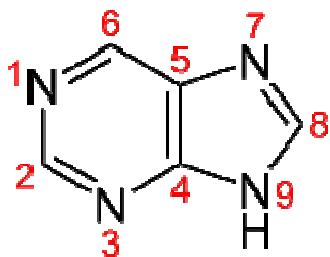
Mimo theaflaviny a thearubiginy vznikají také bezbarvé bisflavanoly, červené epithiaflavinové kyseliny, žluté theacitriny a hnědé theafulviny. Na tmavé barvě čaje se výrazně podílejí také feofytiny vznikající z chlorofylů v průběhu fermentace (Velíšek (3) 1999).

### 2.2.2 Purinové alkaloidy

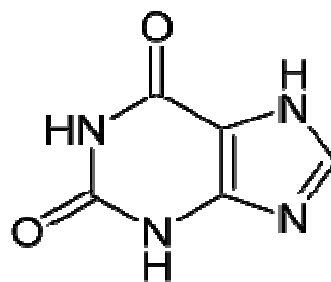
Alkaloidy jsou bazické dusíkaté sloučeniny, které vznikají jako sekundární metabolity rostlin a vykazují v závislosti na konzumovaném množství různé biologické účinky. Řada alkaloidů a jim příbuzných sloučenin vzniká během termického zpracování potravin ze základních živin (Velíšek (3) 1999).

Nejčastějšími alkaloidy v potravinách, a zároveň i v čaji, jsou alkaloidy odvozené od purinu (Obr. 7), resp. xanthinu (Obr. 8), tzv. purinové alkaloidy (Velíšek (3) 1999).





**Obr. 7:** Struktura purinu  
(Wikimedia 2010)

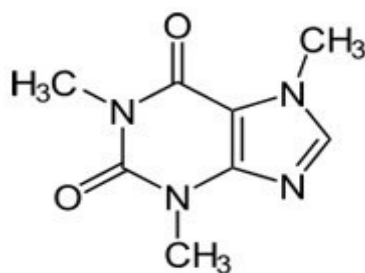


**Obr. 8:** Struktura xantinu  
(Wiktionary 2011)

Purinové alkaloidy jsou methylderiváty xantinu. Methylxanthiny jsou velmi stabilní sloučeniny, u kterých s výjimkou reakcí při fermentaci čajových lístků a kakaových bobů k dalším reakcím během technologického zpracování surovin a skladování prakticky nedochází. Při výrobě černého a zeleného čaje vznikají dimethylxanthiny a další puriny jako produkty katabolismu kofeinu (Velíšek (3) 1999).

Nejrozšířenějším purinovým alkaloidem je kofein, který bývá doprovázen dimethylxanthiny theobrominem, theofylinem a paraxanthinem (Velíšek (3) 1999).

Kofein (Obr. 9), jehož systematický název je 1,3,7-trimethylxanthin, byl poprvé izolován v roce 1821 německým chemikem Ferdinandem Rungem z kávových zrn (Oppliger 2000, Sneader 2005). Dříve používaný název pro kofein obsažený v čaji byl thein. V současnosti se už toto označení v odborné terminologii nepoužívá, neboť je chemicky stejný jako kofein obsažený v kávě, pouze jeho vazby na jiné látky jsou odlišné (Oppliger 2000, Teufl 2000). Kofein je všeobecně považován za jednu z nejrozšířenějších tolerovaných návykových drog na světě (Augustín 2001).



**Obr. 9:** Chemická struktura kofeinu (Kozák 2010)

Za průměrnou hodnotu obsahu kofeinu v čaji můžeme považovat 4-4,5 % (Valter 2000). Zelený čaj však obsahuje méně kofeinu než černý čaj (Chow and Kramerová 1998). Dále bylo zjištěno, že v závislosti na druhu čaje zůstává 10-15 % celkového

kofeinu v listech tak pevně vázáno, že se uvolní až půlhodinovým varem (Valter 2000). Obsah kofeinu v čaji lze ovlivnit délkou louhování i typem čaje. Čajové sáčky, které obsahují drcené listy, uvolňují při louhování více kofeinu než čaje sypané (Chow and Kramerová 1998).

Prokázalo se, že kofein urychluje reakce, zvyšuje bdělost a napomáhá soustředění. Po požití kofeinu začíná tělo ve zvýšené míře vytvářet hormony katecholaminy, které působí jako neurotransmitery v centrální nervové soustavě. Kromě povzbuzujícího účinku na CNS kofein stimuluje i vylučování trávicích šťáv, napomáhá metabolismu a zvyšuje schopnost ledvin odstraňovat toxické látky (Chow and Kramerová 1998).

Zastoupení kofeinu a polyfenolů v čaji je uvedeno v tabulce 1. Obsah jednotlivých substancí se udává pro tři gramy čaje. To odpovídá množství připadajícímu na jeden větší šálek čaje (Teufl 2000).

**Tab. 1:** Obsah kofeinu a polyfenolů v zeleném a černém čaji (Teufl 2000)

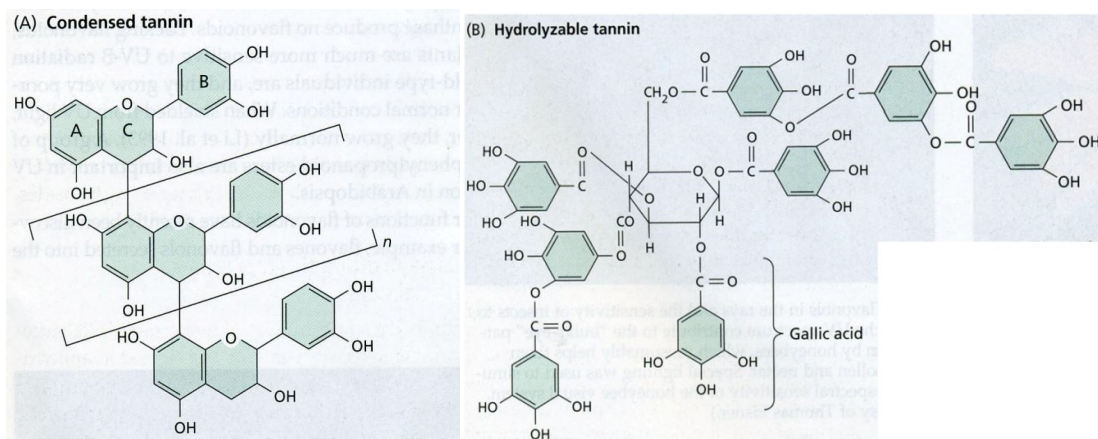
<b>Obsahová látka</b>	<b>Zelený čaj</b>	<b>Černý čaj</b>
<b>kofein</b>	1,5 až 4 %	1,5 až 4 %
<b>flavonoidy</b>	33%	31%
<b>flavanoly</b>	3%	3%
<b>katechiny</b>	30%	9%

Významnými látkami v čaji, které se řadí mezi purinové alkaloidy, jsou i theobromin (3,7-dimethylxantin) a theofilin (1,3-dimethylxanthin). Obě tyto sloučeniny se vyskytují v minoritním podílu. Čajové listy obsahují méně než 0,2 % theobrominu a asi 0,02 % theofilinu (Augustín 2001, Velíšek (3) 1999). Jejich obsah je zpravidla o něco vyšší v černém než v zeleném čaji (Oppliger 2000).

### **2.2.3 Třísloviny**

Významnou skupinu látek přítomných v čajovníkových listech tvoří fenolové sloučeniny, které interagují s proteiny. Nazývají se třísloviny nebo také taniny (Velíšek (2) 1999, Augustín 2001).

Třísloviny se dělí na dvě skupiny, a to na hydrolyzovatelné a kondenzované taniny (Obr. 10). Hydrolyzovatelné taniny jsou polymery esterů kyseliny gallové čili polygalloylestery. Kondenzované taniny nebo také flavolany jsou polymery některých flavonoidních látek se strukturou 3-hydroxyflavanu. Vyskytují se však také libovolné kombinace kondenzovaných a hydrolyzovatelných tříslovin, které se nazývají komplexní třísloviny (Velišek (2) 1999).



**Obr. 10:** Strukturní vzorce kondenzovaného (A) a hydrolyzovatelného (B) taninu

Obsah tříslovin v čajovníkových listech se liší podle typu zpracování. Nejvíce taninů obsahují zelené čaje (10-27 %), méně jich je v černých a tmavých čajích (5-12 %). Listy čajovníků pěstovaných ve vysokohorských polohách mají vyšší obsah tříslovin než listy čajovníků z nižších oblastí (Augustín 2001).

Množství tříslovin v čajovém nápoji je možné ovlivnit způsobem přípravy nálevu. Pokud zkrátíme extrakci na 2 až 3 minuty, vylouhují se zpravidla jen aromatické látky. Při prodloužení doby extrakce na 5 až 7 minut je možné vylouhovat značné množství tříslovinných látek (Augustín 2001).

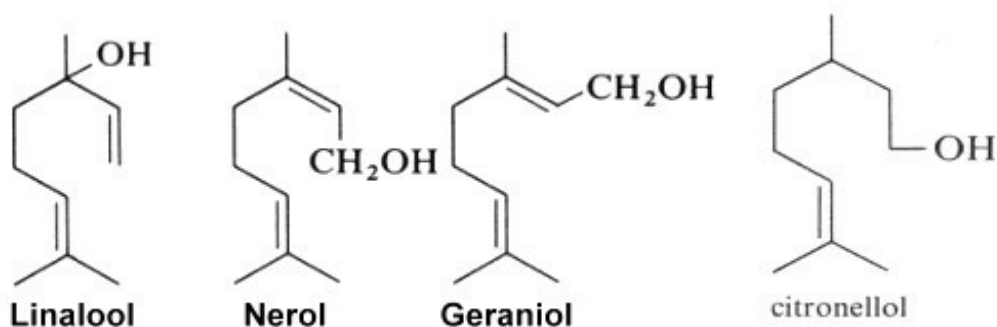
Vylouhované třísloviny způsobují trpkost čaje. Čím déle ponecháme čajové lístky louhovat v horké vodě, tím více tříslovin se z nich uvolní a čaj tak získá trpčí chuť. Jelikož zelený čaj obsahuje větší množství tříslovin než černý, neměl by se louhovat déle než 2 minuty (Wachendorfová 2007).

Předpokládá se, že třísloviny, společně s katechiny, mají přímý vliv na syntézu aromátů přítomných v čajovníkových listech (Augustín 2001).

## 2.2.4 Silice

Silice jsou složité směsi těkavých látek obsažené v přírodních rostlinných materiálech. Jelikož se beze zbytku vypařují, jsou někdy označovány jako éterické oleje nebo těkavé látky. V listech čajovníku se tvoří během růstu (Chow and Kramerová 1998).

Většina silic obsahuje značný podíl terpenových uhlovodíků (obecný vzorec  $(C_5H_8)_n$ ) a to jak monoterpenů, tak seskviterpenů. Nejvýznamnější acyklické monoterpenové alkoholy, ať volné nebo přítomné jako estery, jsou linalool (3,7-dimethyl-1,6-oktadien-3-ol), geraniol (3,7-dimethyl-*trans*-2,6-oktadien-1-ol), jeho isomer nerol (3,7-dimethyl-*cis*-2,6-oktadien-1-ol) a citronellol (3,7-dimethyl-6-okten-1-ol) (Obr. 11) (Velíšek (2) 1999).



**Obr. 11:** Strukturní vzorce nejvýznamnějších acyklických monoterpenových alkoholů silic (Cyberlipid center 2011)

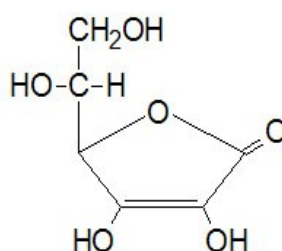
Zelený čaj obsahuje mnohem více silic než černý čaj, jenž prochází složitějšími úpravami, a má proto také méně výrazné aroma. Silice vytvářejí aroma nápoje, napomáhají zažívání a emulgaci tuků (Chow a Kramerová 1998).

## 2.2.5 Enzymy a vitaminy

Významnou úlohu při technologickém zpracování listů čajovníku hraje skupina příslušných enzymů. Bez látek tohoto typu by oxidace fenolických látek za přístupu

vzduchu probíhala poměrně zdlouhavě, takže enzymy působí jako urychlovače tohoto procesu. Nejdůležitější reakce zabezpečuje enzym oxidasa (Augustín 2001).

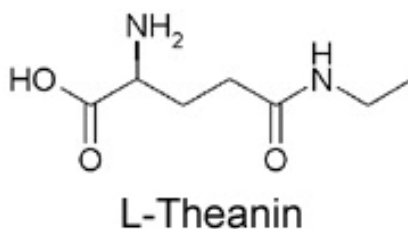
V čajovníkových listech se nacházejí i vitaminy. Vitaminy skupiny B (B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub>) zůstávají zachovány i po technologickém zpracování (fermentační procesy) a i po dlouhodobějším skladování. Ve stopových množstvích jsou přítomné i vitaminy E, A, C a P, ale právě důsledkem fermentačních procesů (při výrobě černých a tmavých čajů) se rozkládají, hlavně kyselina askorbová (vitamin C) (Obr. 12). Protože zelený čaj fermentačním procesem neprochází, obsahuje až desetkrát více vitaminů než čaj fermentovaný (Augustín 2001).



**Obr. 12:** Struktura kyseliny askorbové (King 2011)

### 2.2.6 Aminokyseliny

Zelený i černý čaj obsahují 1-2 % volných aminokyselin. Především se jedná o *N*-ethylglutamin, neboli theanin (Obr. 13) (Velíšek (1) 1999).



**Obr. 13:** Chemická struktura L-theaninu (Gruentee)

### 2.2.7 Anorganické látky

Významnou skupinu obsahových látek v čajovníkových listech představují anorganické látky, které jsou přítomny ve formě solí a jsou zastoupeny asi 5 % podílem.

K nejdůležitějším patří draslík 0,5-0,7 %, vápník 0,46 %, fosfor 0,32 %, hořčík 0,225 %, železo 0,15 % a fluór 0,14 % (Augustín 2001, Arcimovičová and Valíček 1998).

## **2.3 RESORPCE A PŘEMĚNY POLYFENOLŮ V TRÁVICÍM TRAKTU**

Množství přijímaných polyfenolů ovlivňuje hlavní místo jejich biotransformace. Velké dávky polyfenolů jsou metabolizovány převážně v játrech, malá množství jsou přeměňována již střevní mukózou. Možné pozitivní účinky katechinů závisí nejen na spotřebovaném množství, ale také na jejich biologické dostupnosti v organismu, která se zdá být velmi variabilní. Studie, která porovnávala farmakokinetiku čistých katechinů EGC, ECG a EGCG u zdravých dobrovolníků uvádí, že po požití jedné dávky 1,5 mmol jednotlivého katechinu byly koncentrace v plazmě následující: EGC 5 $\mu$ mol/l, ECG 3,1 $\mu$ mol/l a EGCG 1,3 $\mu$ mol/l. Z uvedeného vyplývá, že biologická dostupnost se liší mezi jednotlivými katechiny (Cabrera 2006, Slanina and Táborská 2004). Zároveň studie na potkanech ukázaly, že EGCG je vylučován převážně žlučí, zatímco EGC a EC jsou vylučovány močí a žlučí, což naznačuje, že katechiny jsou rychle a rozsáhle metabolizovány.

Hlavním místem resorpce polyfenolů v trávicím traktu je tenké a tlusté střevo. Existují však důkazy, že některé polyfenoly přijímané v nápojích se mohou částečně resorbovat již v dutině ústní. Po vypití zeleného čaje byla koncentrace katechinů ve slinách o dva řády vyšší než v plazmě, ale zároveň byla jejich eliminace ze slin mnohem rychlejší než z plazmy. Ve slinách je také přítomna esterasa hydrolyzující epigallokatechin gallát na epigallokatechin. Přestože se některé flavonoidy pravděpodobně resorbují z trávicího traktu ve formě glykosidů, odštěpení polární složky je nezbytné pro prostou difúzi většiny polyfenolů přes kartáčový lem tenkého střeva. Pro přeměnu glykosidů v tenkém střevě má největší význam enzym laktasa. Tento enzym je lokalizován na vnější straně membrány kartáčového lemu enterocytů, může tedy působit na polyfenoly v lumen tenkého střeva. Laktasa je poměrně nespecifická  $\beta$ -glukosidasa, která je především zodpovědná za hydrolýzu mléčného cukru, disacharidu laktosy, ale je také schopna štěpit flavonoidní monoglukosidy i diglukosidy. Polyfenoly, které nejsou resorbovány v tenkém střevě, se dostávají do tlustého střeva, kde jsou metabolizovány střevními bakteriemi. Typickými přeměnami jsou redukční nebo

hydrolytické reakce. Aglykony flavonoidů jsou rozštěpeny v místě pyranového cyklu a obvyklými produkty jsou fenolové kyseliny, které tvoří značnou část (30-60 %) metabolitů potravou přijatých flavonoidů. Fenolové kyseliny podléhají v tlustém střevě dehydroxylačním reakcím, nejčastěji je redukován hydroxyl v *para* poloze aromatického jádra. Po resorpci z trávicího traktu jsou polyfenoly dále metabolizovány enzymy přítomnými v tkáních člověka. Přeměny jsou velmi podobné metabolismu léčiv a jiných xenobiotik. Podléhají methylocím, konjugacím s kyselinou glukuronovou a kyselinou sírovou. Metabolity jsou vylučovány žlučí do stolice, ledvinami do moče nebo podléhají zpětné reabsorpci. Fenolové kyseliny podléhají konjugaci s glycinem nebo mohou být odbourány na hydroxyderiváty kyseliny benzoové, případně na kyselinu benzoovou. Kyselina benzoová poskytuje konjugací s glycinem kyselinu hippurovou. Značná část hippurátu vylučovaného močí je produktem odbourání fenolových kyselin, případně flavonoidů (Slanina and Táborská 2004).

## **2.4 BIOLOGICKÉ ÚČINKY ČAJE NA LIDSKÝ ORGANISMUS**

Holandský lékař Nicolas Diveks ve své knize „Lék“ hodnotí čaj těmito slovy: „Čaj nemůže být ničím překonán. Pití čaje vzdaluje člověka od všech možných chorob a prodlužuje mu život. Čaj dodává energii a pomáhá všem, kteří studují nebo pracují dlouho do noci.“ (Oppliger 2000).

Zelený čaj byl považován za lék a zdravý nápoj již od starověku (Cabrera et al. 2006). Z hlediska tradiční čínské medicíny působí čaj na dráhy srdce, jater, žlučníku, tlustého střeva a žaludku. Některé prameny uvádějí i jeho působení na dráhu plic. Osvěžuje mysl a oči, ulevuje od žízně, pomáhá trávení, je močopudný a má detoxikační účinky (Arcimovičová and Valíček 1998).

Zelený čaj obsahuje tři hlavní složky, které ovlivňují lidské zdraví: purinové alkaloidy (kofein a theofylin), éterické oleje a především, polyfenolické látky. Kofein působí na centrální nervovou soustavu. Éterické oleje podporují trávení a polyfenolické látky jsou důležitými antioxidanty (Cabrera et al. 2006).

### **2.4.1 Účinek čaje proti kardiovaskulárním onemocněním**

Výzkumy naznačují, že čaj pomáhá proti srdečním infarktům, mrtvicím a trombóze. K prevenci srdečních onemocnění přitom přispívá několikerým způsobem. V prvé řadě působí na srdce a oběhový systém jako mírný povzbuzující prostředek. Za

druhé posiluje stěny cév a zvyšuje jejich pružnost. Dále existují důkazy, že čajové polyfenoly zabraňují vstřebávání cholesterolu ze zažívacího traktu, což snižuje obsah cholesterolu v krvi. A v neposlední řadě může čaj působit proti vytváření krevních sraženin. Na prevenci proti vzniku cévní mozkové příhody a infarktu myokardu se obvykle podílí několik těchto faktorů najednou (Chow and Kramerová 1998).

S onemocněním kardiovaskulárního systému souvisí i již jmenovaný cholesterol, což je sloučenina, která je přítomna v těle všech živočichů. Je nezbytný pro vytváření buněčných membrán a udržení soudržnosti buněk (Arcimovičová and Valíček 1998). Cholesterol je krevním oběhem roznášen pomocí dvou druhů lipoproteinů: HDL (High Density Lipoproteins) – pod tímto označením se rozumí lipoproteiny o vysoké hustotě – a LDL (Low Density Lipoproteins), tedy lipoproteiny o nižší hustotě. Zatímco LDL lipoproteiny zásobují periferní tkáň cholesterolem a mohou se podílet na jeho usazování ve stěnách cév, HDL lipoproteiny odvádějí cholesterol z periferních tkání a krevního oběhu do jater a ty zajistí jeho vyloučení z těla stolicí. Zelený čaj snižuje hladinu cholesterolu i LDL lipoproteinů, a tím zmenšuje riziko spojené s ukládáním cholesterolu v cévách. Zároveň zvyšuje množství lipoproteinů HDL, jejichž funkcí je chránit cévy (Teufl 2000). V šedesátých letech bylo prokázáno, že pití čaje před tučnými jídly a po nich zabraňuje zvyšování „tukotvorných“ lipidů. Výzkumy tak potvrdily, že všechny druhy čaje snižují hladinu cholesterolu a druh oolong dosáhl v této oblasti nejlepších výsledků (Pratt and Rosen 1999).

Mechanismus tohoto působení zůstává nejistý. Je však pravděpodobné, že čajové polyfenoly mající antioxidační účinky, zejména EGCG, inhibují oxidaci LDL cholesterolu, která přispívá ke vzniku aterosklerózy (Cabrera et al. 2006, Dufresne and Farnworth 2001). Ateroskleróza vzniká obvykle teprve v pokročilém věku usazováním nánosů cholesterolu na cévních stěnách (Lübeck 2007).

#### **2.4.2 Účinek čaje na diabetes mellitus**

Cukrovka neboli diabetes mellitus je chronické onemocnění charakterizované poruchou látkové výměny cukrů (Šindelka 2000). Diabetes mellitus je definován jako hodnota glykémie na lačno vyšší než 7,0 mmol/l (Svačina and Bretšnajdrová 2003). Insulin, hormon produkovaný beta-buňkami slinivky břišní, se vytváří v závislosti na množství glukosy v krvi. Insulin zastává dvojí funkci: snižuje hladinu krevního cukru a zvyšuje schopnost buněk tento cukr využívat ke své normální funkci. V souvislosti se



zvýšením hladiny krevního cukru po jídle začne slinivka produkovat insulin, který povzbuzuje přechod cukru z krve do buněk. U diabetiků však slinivka na zvýšení hladiny krevního cukru reaguje produkcí jen malého množství insulinu (diabetes mellitus I. typu). Případně insulin neprodukuje vůbec nebo jej produkuje v normálním množství, ale buňky na něj nereagují (diabetes mellitus II. typu) (Mitscher and Dolby 2006).

Ačkoliv terapie pomocí zeleného čaje nepatří mezi nejdůležitější způsoby léčení cukrovky, může určitým způsobem podpořit léčbu pomocí diety a farmak. Studie na zvířatech ukázaly, že zelený čaj může zabránit vývoji diabetu I. typu a zpomalovat postup onemocnění, pokud se již rozvinulo. Bylo zjištěno, že epikatechin byl schopen normalizovat vysokou hladinu krevního cukru u zvířat stížených cukrovkou. Čajové polyfenoly také snížily množství glukosy v séru tím, že inhibovaly aktivitu enzymu amylasy, který štěpí škrob. Navíc stimulovaly neaktivní beta-buňky těchto zvířat k produkci insulinu. Jiní vědci došli k závěrům, že epikatechin v těle působí v souladu s látkami insulinových vlastností, tedy těmi látkami, které podporují vstup glukosy do tkání (Mitscher and Dolby 2006, Sharangi 2009).

### **2.4.3 Čaj a rakovina**

Rakovina je nejčastější příčinou úmrtí jak u mužů, tak u žen. Pod tímto označením se skrývá skupina chorob, pro něž je charakteristický nekontrolovatelný růst a šíření abnormálních buněk. Normální, zdravé buňky jsou při napadání okolní tkáně abnormálními buňkami poškozovány a ničeny (Mitscher and Dolby 2006).

V roce 1985 se do výzkumné práce zapojil tým vedený dr. Fujikim s úkolem najít látku zabraňující vzniku rakoviny. Této vědecké skupině se podařilo ze zeleného čaje izolovat epigallokatechingallát jako pravděpodobně nejúčinnější antikancerogenní substanci. V pokusech na laboratorních zvířatech potvrdili předpoklad, že EGCG brání vzniku nádorového bujení v kůži, zabraňuje karcinogenezi v trávicí soustavě a jiných orgánech a zároveň léčí již existující nádory ve střevě. Později byl potvrzen antikancerogenní vliv EGCG také u člověka, kdy došlo k prevenci růstu rakovinových buněk v plicích, střevě, játrech, žaludku i pokožce, snížení rizika rozvoje rakoviny prsu a zmírnění toxického účinku kouření (Oppliger 2000). EGCG je navíc schopen se

navázat na urokinázu, která má prokazatelně souvislost se vznikem metastáz, a tím působit preventivně proti jejich vzniku (Arcimovičová and Valíček 1998).

Čínský vědec dr. Han Chi zjistil, že čaj zcela zastavuje vznik nitrosaminů, které v organismu vyvolávají rakovinné bujení. Japonští vědci dále prokázali, že zelený čaj brání vzniku karcinogenu MNNG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidinu) a také působení aflatoxinu, což je výrazný karcinogen vznikající působením plísní *Aspergillus* spp. ve skladovaných potravinách. Antioxidačně působící polyfenoly brání oxidačnímu poškození DNA ve zdravých buňkách a tím i mutaci těchto buněk (Pratt and Rosen 1999).

Celá řada epidemiologických studií (zejména japonských a čínských) potvrzuje, že dlouhodobé a pravidelné pití čaje se spolupodílí na podstatně nižším riziku onemocnění rakovinou. Vědečtí pracovníci tuto skutečnost připisují aktivnímu účinku polyfenolických látek přítomných v čajových listech (Augustín 2001, Mitscher and Dolby 2006, Cabrera et al. 2006). Novější studie však většinou nepotvrdily vztah mezi konzumací zeleného čaje a snížením rizika rozvoje rakoviny (Cabrera et al. 2006).

#### **2.4.4 Antibakteriální a antivirové účinky čaje**

Čajové katechiny působí antibakteriálními a antivirovými účinky tím, že na sebe váží pro organismus škodlivé látky a odvádějí je z těla (Arcimovičová and Valíček 1998). Úspěšně bojují i s akutní gastroenteritidou (zánět žaludku a střev) a enteritidou (zánět tenkého střeva), kdy napomáhají obnovit činnost střevní mikroflóry (Pratt and Rosen 1999, Arcimovičová and Valíček 1998).

Katechin, obsažený v zeleném čaji, je účinnou látkou proti chřipkovým virům, původcům chřipkového onemocnění. Podobně dobře účinkuje i theaflavin, obsažený v černém čaji, který ovšem není ničím jiným než zoxidovaným katechinem (Lübeck 2007). Zelené čaje mají silnější účinky než čaje černé (Pratt and Rosen 1999).

#### **2.4.5 Čaj a kontrola tělesné hmotnosti**

Šálek čaje (bez cukru a mléka) obsahuje pouze čtyři kalorie, takže je vhodným nápojem při redukční dietě. Odborníci se domnívají, že zelený čaj snižuje rychlost vstřebávání cukrů. Polyfenoly obsažené v zeleném čaji ovlivňují činnost amylasy (viz.

výše). Pomalé uvolňování cukrů do krve v důsledku konzumace zeleného čaje brání náhlým výkyvům hladiny insulinu v krvi, což napomáhá i lepšímu spalování tuků, které se díky tomu v těle neukládají (Mitscher and Dolby 2006). Za to, že zelený čaj napomáhá úbytku hmotnosti, částečně odpovídá i obsah kofeinu, který zrychluje bazální metabolismus (Mitscher and Dolby 2006).

#### **2.4.6 Čaj a imunita**

Bylo prokázáno, že čajové polyfenoly zvyšují počet bílých krvinek, které jsou důležité v boji proti infekcím. V Číně se čajový extrakt využívá v lékařství jako prostředek k normalizaci počtu leukocytů, který byl snížen při radioterapii. Zelený čaj upravuje hyperfunkci štítné žlázy a brání vzniku leukemie po ozáření (Pratt and Rosen 1999). U izolovaného gallokatechingallátu byla zjištěna i antialergická účinnost (Augustín 2001).

#### **2.4.7 Čaj jako lék proti zubnímu kazu**

Zubní kaz způsobují bakterie (např. *Streptococcus mutans*), které vytvářejí z cukru a jiných zbytků potravy ve vodě nerozpustné glukany, které se usazují na zubech v podobě tvrdého povlaku (Teufl 2000, Arcimovičová and Valíček 1998, Lübeck 2007).

Ukázalo se, že čaj zabraňuje tvorbě zubního kazu dvojitým způsobem: jednak díky obsahu polyfenolů, které váží bakterie v ústech dříve, než se může vytvořit zubní plak. A také díky obsahu fluoridu, který posiluje zubní sklovinu a činí ji odolnější proti zubnímu kazu (Chow and Kramerová 1998). Zelený čaj navíc osvěžuje dech, neboť ničí bakterie, které jsou příčinou zápachu ústní dutiny (Teufl 2000).

#### **2.4.8 Nepříznivé účinky čaje na lidský organismus**

Škodlivé účinky čaje při jeho vysoké konzumaci jsou způsobeny třemi hlavními faktory: obsahem kofeinu, přítomností hliníku a účinkem polyfenolů na dostupnost železa v organismu.

Předávkování kofeinem vyvolává nervozitu, poruchy spánku, zvracení, bolesti hlavy, bolest v epigastriu a tachykardii. Nicméně pravděpodobnost narušení kvality spánku je menší v případě zeleného čaje než kávy a to díky nižšímu obsahu kofeinu.

Čajovník má vysokou schopnost akumulovat hliník. Tato skutečnost je významná zejména pro pacienty s renálním selháním, protože může dojít k hromadění hliníku v jejich tělech s následným rozvojem neurologických poruch.

Některé studie poukázaly na výrazné snížení biodostupnosti nehemového železa z potravy (o 79 až 94 %) při současné konzumaci černého čaje. Tento účinek, který je zřejmě způsoben vychytáním železa přítomnými polyfenoly, byl závislý na příjmu železa potravou a na množství železa v organismu. Podobný efekt měl i čaj zelený. Lze tedy doporučit, aby jedinci trpící anemií nekonzumovali čaj (Cabrera et al. 2006, Oppliger 2000).

## **2.5 ANTIOXIDAČNÍ EFEKT ČAJOVÝCH POLYFENOLŮ**

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou chemicky velmi reaktivní molekuly obsahující kyslík a alespoň jeden volný nepárový elektron. Jsou schopni, třeba jen krátké, ale samostatné existence. ROS vznikají jako vedlejší produkt aerobního metabolismu a hrají významnou roli v buněčné signalizaci a homeostáze. V době zatížení životního prostředí (např. UV nebo působením tepla) můžou hladiny ROS dramaticky vzrůst, což může mít za následek značné poškození buněčných struktur. Tento jev je znám jako oxidační stres. Volné radikály vznikají třemi různými způsoby: homolytickým štěpením kovalentní vazby, redukcí (přijmutím elektronu) nebo oxidací (ztrátou elektronu). Antioxidanty jsou definovány jako látky, které při působení v nízkých koncentracích významně inhibují nebo zpomalují oxidační destrukci tkání tím, že snižují pravděpodobnost vzniku volných radikálů nebo již vzniklé radikály přeměňují do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů. V posledních letech jsou antioxidačně účinné látky podrobeny velkému zájmu z důvodu jejich léčebného využití (Kolečkář 2012).

Čajové polyfenoly jsou považovány za důležité antioxidanty. Několik klinických studií prokázalo, že jedna dávka čaje zlepšuje plazmatické antioxidační schopnosti dospělých zdravých lidí během 30 až 60 minut po požití. Nejvyšší antioxidační aktivita plazmy byla pozorována asi 1 až 2 hodiny po požití čaje a poté rychle klesala, což by

mohlo být způsobeno rychlou absorpcí, metabolismem a vylučováním katechinů z organismu. Antioxidační schopnost čaje a čajových polyfenolů byla hodnocena několika způsoby. Pomocí Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) testu, bylo zjištěno, že zelený a černý čaj mají mnohem vyšší antioxidační aktivitu proti peroxylovým (ROO•) radikálům než zelenina jako je česnek, špenát a růžičková kapusta. Opakované pití čaje a užívání čajových extraktů po dobu jednoho až čtyř týdnů se projevilo snížením biomarkerů oxidačního stresu (Khan 2007, Cabrera 2006).

Studie ukazují, že čajové polyfenoly jsou schopny vychytávat reaktivní kyslíkové radikály superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), singletový kyslík ( $^1O_2$ ), hydroxylový radikál (HO•), peroxy (ROO•), oxid dusnatý, oxid dusičitý a peroxyinitrit (ONOO-), což vede ke snížení poškození lipidových membrán, proteinů a nukleových kyselin. Základem zhášecího působení je schopnost antioxidantu poskytnout elektron radikálu za současného vytvoření stabilnější, méně reaktivní radikálové struktury. Obecně platí, že zhášecí aktivita roste s počtem hydroxylových skupin v molekule, obzvláště jsou-li v *ortho*-uspořádání kruhu B, kam se ROS převážně navazují. Aktivita roste i s počtem fenolových skupin a s přítomností kyseliny gallové ve struktuře. Vzhledem k uspořádání a počtu fenolových a hydroxylových skupin, jsou katechiny vynikajícími donory elektronů a efektivní zhášeči volných radikálů (Khan 2007).

Přechodné kovy, např. železo nebo měď, mají v organismu řadu funkcí. Důležitou fyziologickou roli mají např. jako kofaktory antioxidačních enzymů. Obvykle jsou navázány na proteiny, např. ferritin nebo ceruloplazmin. Vyskytují-li se volně, mohou katalyzovat radikálové reakce. Jedná se např. o známou Fentonovu reakci:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO\bullet$ . Pro chelatační aktivitu je důležitá přítomnost hydroxylových a fenolových skupin, obzvláště v *ortho*-poloze B-kruhu. Existuje řada studií, které prokázaly chelatační působení polyfenolů, zejména flavonoidů. Stejným mechanismem působí čajové katechiny (Kolečkář 2012).

Mezi způsoby antioxidačního působení se řadí také inhibice prooxidačních enzymů NOS a XO. Katechiny mohou snižovat tvorbu oxidu dusnatého (NO) inhibicí synthas oxidu dusnatého (NOS). Zatímco endoteliální syntasa (eNOS) je důležitá pro udržení cévního tonu a homeostázy, vyšší koncentrace NO vyrobené z iNOS, z imunitních buněk jako jsou makrofágy, mohou způsobit oxidační poškození. NO reaguje s volnými radikály, a tím produkuje vysoce škodlivé peroxyinitridy, které mohou přímo oxidovat LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou), což vede k nezvratnému poškození buněčných membrán. EGCG inhibuje aktivitu iNOS tím, že brání vazbě

jaderného transkripčního faktoru kB (NF-kB) k promotoru RNA polymerázy II a tím ovlivňuje expresi genu iNOS. Xantinoxidasa (XO) je klíčový enzym katabolismu purinových metabolitů. U savců se přirozeně vyskytuje v játrech a tenkém střevě. Fyziologicky přeměňuje hypoxantin na xantin a kyselinu močovou. Při nadměrné produkci XO dochází k tvorbě velkého množství kyseliny močové a u pacientů se projevuje onemocnění dna. XO velmi ochotně reaguje s molekulou kyslíku, což vede k uvolnění superoxidu, silného oxidačního činidla. Ve studii *in vitro* bylo prokázáno, že katechiny jsou inhibitory XO, a EGCG je stejně účinný v inhibici XO jako allopurinol, lék užívaný k potlačení tvorby XO u pacientů s dnou (Velayutham 2008, Kolečkář 2012).

Peroxidace lipidů patří mezi závažné patologické pochody. Tento proces se podílí například na oxidační přeměně LDL a následné tvorbě aterosklerotických lézí. Obecně se dá říci, že látky, které zabraňují lipidové peroxidaci působí mechanismem zhášení iniciačních radikálů (hydroxyl), nebo již vzniklých oxidačních produktů (peroxyl, alkoxy). Uplatňovat se může i chelatace iontů přechodných kovů. Rozsáhlé studie uvádějí, že katechiny inhibují oxidaci LDL *in vitro* i ve studiích na zvířatech v pořadí EGC < EC < ECG < EGCG. Konzumace čaje a čajových polyfenolů přispívá k prevenci aterosklerózy a jiných kardiovaskulárních chorob (Kolečkář 2012).

Myši, které byly napájeny 0,2% roztokem katechinů v pitné vodě vykazovaly významně zvýšené aktivity enzymů superoxiddismutasy, katalasy a glutathion peroxidasy, které hrají klíčovou roli v inhibici ROS. Katechiny se rovněž podílejí na recyklaci vitamínu E a glutathionu.

Za určitých podmínek mohou čajové katechiny při zhášecích reakcích vytvářet o-chinonové struktury, které mohou v dalších redoxních reakcích působit jako prooxidanty. Během reakce s volnými radikály může být generováno několik oxidačních produktů např. superoxydy a hydroxylové radikály.

Ačkoli mnoho studií uvádí, že EGCG je nejsilnější antioxidant mezi katechiny, studie prokázaly, že ECG má stejné antioxidační účinky. Studie rovněž ukazují, že metabolity katechinů a epikatechinů (-)-Epikatechin-5-O- $\beta$ -glukuronid a (+)-katechin-5-O- $\beta$ -glukuronid, mají podobné antioxidační účinky jako jejich mateřské sloučeniny. Nicméně, antioxidační schopnost katechinů prokázaná *in vitro* je závislá na druhu použité metody a neodráží faktory biologické dostupnosti a metabolismu. Autoři poukazují, že měření oxidačního poškození s pomocí biomarkerů musí být dále prokázáno (Kolečkář 2012, Cabrera 2006, Velayutham 2008).

## 2.6 ÚČINKY ČAJOVÝCH POLYFENOLŮ NA ENZYMY

Z dalších zajímavých farmakologických účinků fenolických látek obsažených v čaji je třeba zmínit schopnost stimulovat činnost enzymů, a to cytochromů P450 a UDP-glukuronosyltransferas. Tyto enzymy jsou klíčové při metabolismu některých endogenních substrátů, ale zejména při metabolismu cizorodých látek, tzv. xenobiotik. Metabolismus xenobiotik probíhá ve třech fázích. Cytochromy P450 jsou hlavními enzymy zodpovědnými za I. fázi biotransformace, která zahrnuje především oxidoredukční a hydrolytické reakce. UDP-glukuronosyltransferasa je enzym účastnící se II. fáze biotransformace xenobiotik. Za III. fázi je považován transport xenobiotik, jejich metabolitů a konjugátů přes membrány. Sloučeniny, které jsou substráty takovýchto enzymů, jsou biotransformovány za vzniku polárnějších produktů, které pak mohou být vyloučeny a nedochází tak k akumulaci příslušných xenobiotik v organismu. Tyto enzymy se podílí na metabolismu více než 50 -ti % prodávaných léčiv, často jsou také zodpovědné za tzv. lékové interakce (Stiborová 1999, Young 2006, Arcimovičová and Valíček 1998).

Čajové polyfenoly mají schopnost inhibovat enzym 5-alfa-reduktasu, který v tkáních katalyzuje přeměnu testosteronu na dihydrotestosteron, který je odpovědný za vypadávání vlasů a náhlé ztráty ochlupení (Augustín 2001).

Katechiny mohou inhibovat proteolytický enzym urokinasu, jehož hlavní úlohou je přeměna neaktivního plazminogenu na aktivní plazmin. Jedná se o enzym, který je ve velké míře produkován nádorovými buňkami.

## 2.7 MOŽNÉ INTERAKCE ČAJE S LÉČIVY

**Chemoterapeutika (doxorubicin, tamoxifen):** Souběžné užívání těchto léků a zeleného čaje může zvýšit efektivitu léčby.

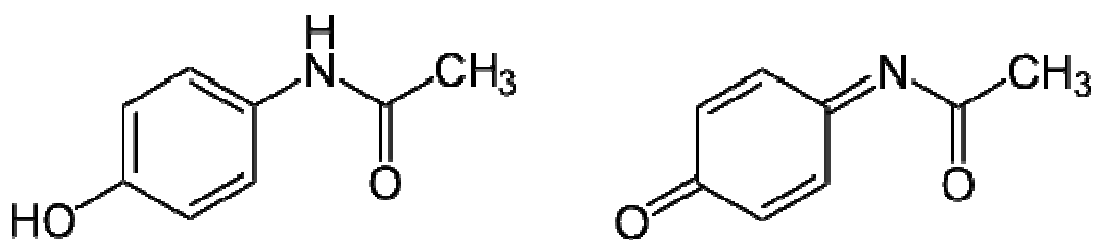
**Beta-laktamová antibiotika:** Kombinace zeleného čaje a beta-laktamových antibiotik může zvýšit efekt léčby a snížit počet rezistentních bakterií na antibiotika.

**Benzodiazepiny:** Léky, které se běžně užívají k léčbě anxiety jako např. diazepam nebo lorazepam, mohou v kombinaci s kofeinem zmírnit své účinky.

**Beta-blokátory (propranolol, metoprolol):** Léky, jež léčí vysoký krevní tlak a užívají se při srdečním selhání, mohou v kombinaci s kofeinem zvýšit krevní tlak (Macková 2010).

## 2.8 PARACETAMOL A JEHO TOXICKÝ PRODUKT

Derivát p-aminofenolu paracetamol (acetaminofen) (Obr. 14) je centrálně působící látka, která má dobrý analgetický a antipyretický účinek, nemá však účinek protizánětlivý. Inhibuje cyklooxygenázu 2 (COX-2) v hypotalamu (antipyretický účinek) a nepřímo působí na serotoninové receptory v míše (analgetický účinek). Při normálním dávkování je paracetamol pacienty dobře snášen, pouze velmi vzácně se mohou objevit alergické reakce, které se vyznačují především kožními projevy. Ve vysokých dávkách může paracetamol působit toxicky, zvláště na jaterní buňky. Toxický je však až při extrémním předávkování, ke kterému dochází zřídka. Častější je předávkování paracetamolem v kombinaci se stimulačními látkami jako např. s kofeinem nebo alkoholem, u kterého dochází k poškození jater (Lüllmann 2002, Martínková 2007). Předávkování paracetamolem je nejčastější příčinou akutního jaterního selhání u lidí v rozvinutých zemích. Chronický přívod nadměrných dávek samotného paracetamolu se objevuje zřídka, a zda zhoršuje funkci ledvin je stále ve zkoumání.

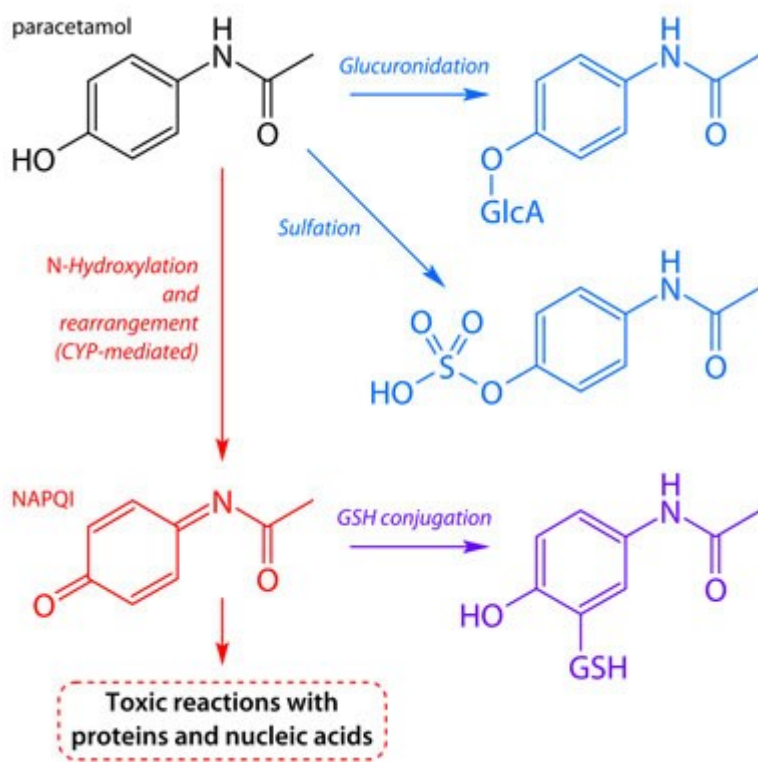


**Obr. 14:** Paracetamol, *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) (Wikimedia 2012)

Biotransformace paracetamolu v organismu se ubírá třemi cestami, které znázorňuje obrázek 15. Hlavní biotransformační cesta vede ke vzniku glukuronidu, druhá ke vzniku sulfátu paracetamolu. Většina paracetamolu v organismu se konjuguje na hydroxylové skupině fenolového jádra s kyselinou glukuronovou nebo kyselinou sírovou a v podobě konjugátu se eliminuje ledvinami (Lüllmann 2002, Lüllmann et al.



2001). Oxidační cesta, kterou se přeměňuje zhruba třetina množství látky, vede ke vzniku vysoce reaktivní sloučeniny N-acetyl-p-benzochinoniminu (NAPQI) (Obr. 14). V játrech je NAPQI tvořen reakcí zprostředkovanou cytochromy P-450 (isoformy CYP2E1, CYP1A2 a CYP3A4), v ledvinách pak analogicky za účasti cyklooxygenázy (Patočka 2004). Za normálních okolností se NAPQI okamžitě detoxikuje konjugací s glutationem. Jestliže se však zásoba glutationu v játrech vyčerpá, jak je tomu po nadměrných dávkách paracetamolu, toxický metabolit se kumuluje, váže se na buněčné makromolekuly a vyvolává nekrózu jaterních buněk. Pokud dojde k předávkování paracetamolem, je nutné podat co nejdříve (do 10 hodin po požití látky) donátory SH-skupin, které spotřebovaný glutation nahradí, např. acetylcystein (Lüllmann 2002).



**Obr. 15:** Metabolismus paracetamolu (Montana Whole Health 2013)

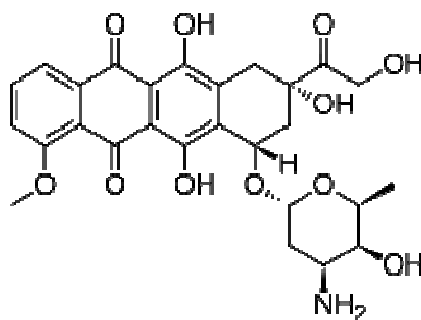
## 2.9 DOXORUBICIN

Zhoubné nádory se vyznačují infiltračním a destruktivním růstem a nebezpečím tvorby metastáz. Příčinu selhání regulovaného růstu lze ve zkratce vyjádřit jako „kumulace četných genetických poruch“. Může přitom jít o genetické defekty, které indukují zvýšenou proliferaci a/nebo o genetické poruchy, které způsobují nedostatečnou eliminaci buněk s chybnou reduplikací DNA. Léčiva proti zhoubnému bujení potlačují rozvoj a množení rychle rostoucích buněk. Používají se proto k inhibici růstu nádorů. Běžně se tyto látky označují jako cytostatika. Protože se nádorově zvrhlá tkáň většinou dělí obzvláště rychle, cytostatika ji také nejvíc postihují. Společně s ní však trpí i zdravé tkáně s vysokou frekvencí buněčného dělení a vznikají nežádoucí účinky, jako útlum kostní dřeně, poškození sliznic trávicího ústrojí a další (Lüllmann 2002).

Doxorubicin (adriamycin), jehož struktura je znázorněna na obrázku 16, je jednou z nejvíce využívaných protinádorových látek a stále představuje kámen v terapii mnoha typů karcinomů. Doxorubicin je antibiotikum s protinádorovou aktivitou produkované *Streptomyces peucetius*. Podává se jako hydrochlorid i.v. rozpuštěn ve fyziologickém roztoku. Po perorálním podání se vstřebává velmi málo (Lüllmann 2002, Martínková et al. 2007).

Doxorubicin patří mezi tzv. antracykliny, jejichž hlavní cílovou strukturou pro cytostatický účinek je jak DNA v jádře buňky, tak mitochondriální DNA. Antracykliny mají schopnost interkalace, tj. schopnost vmezeřovat se mezi páry bází DNA a tím způsobovat jejich zlomy, které dávají signál k apoptóze buňky. Antracykliny jsou také schopny blokovat funkci topoizomerázy II. Důsledkem je zastavení buněčného cyklu mezi fázemi  $G_1$  a  $G_2$ . Tím dojde k inhibici replikace a transkripce DNA a RNA a buňka dostává signál k apoptóze. Dalším důležitým mechanismem doxorubicinu v cytotoxickém působení na nádorové buňky je schopnost uvolňovat cytochrom c z mitochondrií a tím tak dát rovněž signál k programované buněčné smrti. Na druhé straně doxorubicin působí jako silný chelátor železa, dostupného z hemoglobinu a myoglobinu, kdy vzniká výsledný komplex DOX-Fe<sup>2+</sup>. Tento komplex katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na hydroxylový radikál, což může mít za následek peroxidaci lipidů, poškození struktury DNA nebo poškození funkčních proteinů. Poškození myokardu a s tím spojená kardiotoxicita je velkým problémem při podávání vysokých

dávek doxorubicinu. Ve snaze získat méně kardiotoxické sloučeniny byl vyvinut epirubicin, idarubicin a mitoxantron (Martínková et al. 2007, Hanušová 2011).



**Obr. 16:** Doxorubicin (Wikimedia 2013)

## 2.10 POLYFENON E

Polyfenon E je označení pro extrakt zeleného čaje, který obsahuje katechiny, ale neobsahuje kofein. Podle Národního ústavu pro výzkum rakoviny je Polyfenon E zkoumán za účelem prevence rakoviny. Podle výzkumu prezentovaného na konferenci v Kalifornii inhibuje Polyfenon E vaskulární endoteliální růstový faktor a hepatocytový růstový faktor. Oba tyto růstové faktory podporují růst, migraci a invazi nádoru. Tato studie však byla příliš malá na to, aby z ní vědci mohli s jistotou potvrdit, že Polyfenon E zabraňuje nádorovému bujení (Gate2Biotech 2013).

## 2.11 BUNĚČNÉ LINIE

Nádorové buněčné linie jsou vhodným modelem pro studium. Jejich pozitivum je vlastnost neomezeného počtu dělení a s tím spojený neomezený počet pasáží. U těchto typů buněk nedochází ke zkracování telomer a tím ke stárnutí kultury. Při dodržení nezbytných podmínek pro růst (optimální pH, živiny, teplota 37°C, přívod vzduchu a vlhkosti), tvoří nádorová linie obnovitelný zdroj biologického materiálu pro experimenty. Některé rysy buněčné linie se mohou při vyšším počtu pasáží měnit, ale obecně docházíme při opakujících se pokusech ke stejným závěrům. Buněčnou linii lze rozmrazit, rozpasážovat a znovu zamrazit, čímž se zachovává obnovitelnost zdroje

buněčného materiálu. Oproti tomu normální buňky mají omezenou životnost, tedy i omezený počet pasáží (Shay and Wright 2001, Volková 2010).

Mezi základní vlastnosti nádorových buněk patří ztráta diference a apoptózy, zvýšená invazivita a schopnost zakládat vzdálená ložiska, čili metastáze. Množení nádorových buněk probíhá bez jakékoliv regulace. Rychlost růstu nádoru je především závislá na počtu dělících se buněk, době buněčného dělení a na úbytku buněk díky jejich odumírání. V nádorových tkáních je obvykle snížena strukturní a funkční specializace. V počátku vzniku nádoru dochází k exponenciálnímu růstu. Dále dochází ke zpomalení růstu v důsledku odumírajících buněk. Nakonec může být růst zastaven úplně (Petruželka and Konopásek 2003).

Buněčná linie prochází při růstu třemi fázemi. Pro desintegraci narostlé monovrstvy se používá proteolytický enzym trypsin. Buňky se po pasáži musí reparovat a přisednout k podkladu. Buňky narůstají poměrně pomalu a jejich kulovitý tvar se mění na charakteristicky protáhlý. Tato fáze se nazývá *lag* fáze. Následuje fáze *log*, kdy buňky jsou již přisedlé a aktivně se dělí, až do dosažení tzv. saturační koncentrace. Buňky po vytvoření monovrstvy nemají dost místa pro další dělení, narůstají proto v další vrstvě a jejich tvar se částečně mění. Tato fáze se nazývá *plató* a je charakterizována pomalým nárůstem buněk. Bylo vypořádáno, že čím déle trvá fáze *plató*, tím déle pak trvá *lag* fáze (Volková 2010).

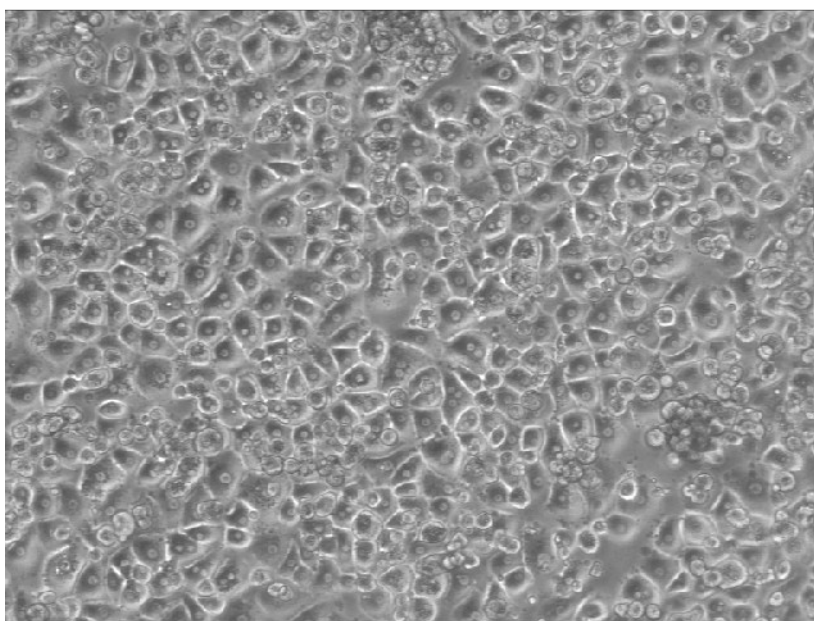
V našich experimentech byla využita buněčná linie HCT-8. Tato linie byla odvozena z lidského adenokarcinomu ilea. Je pravděpodobně stejného genetického základu jako linie DLD-1, HCT-15 a HRT-18. Tato shoda byla dokázána metodou tzv. DNA otisku prstu, který se pro tyto linie ukázal být identický (Volková 2010).

## 2.12 HEPATOCYTY

Játra jsou hlavním biotransformačním orgánem těla. Podílejí se významnou měrou na metabolismu většiny endogenních i exogenních látek včetně léků, což je jednou z hlavních příčin jejich častého toxického poškození. Játra jsou pro život nepostradatelným orgánem. Mezi jejich hlavní funkce patří udržení stálého vnitřního prostředí. Mají nezastupitelnou úlohu v metabolismu sacharidů, lipidů a bílkovin resp. aminokyselin. Jako jediný orgán jsou schopny tvorby urey z amoniaku v močovinovém cyklu. Tvoří se v nich většina plazmatických bílkovin včetně koagulačních faktorů a

některých složek komplementového systému. Podílejí se na tvorbě a biologických přeměnách cholesterolu, fosfolipidů a triacylglycerolů. Játra jsou jediným orgánem schopným tvorby ketolátek. Tvoří se v nich žluč, která je nezbytná pro trávení a vstřebávání lipidů a do které jsou vylučovány degradační produkty některých endogenních a exogenních látek. Z výše uvedeného je zřejmé, že závažné poškození funkcí jater vede velmi rychle k rozvratu vnitřního prostředí s ohrožením života jedince (Kučera 2006).

Hepatocyty, jaterní buňky, jsou základem jaterní tkáně a jsou zodpovědné za většinu metabolických pochodů probíhajících v játrech. Hepatocyty (Obr. 17) jsou polyedrické, 25-30  $\mu\text{m}$  velké buňky se světlým jádrem a výraznými jadérky. Při velkém zatížení jater se mohou vyskytovat i vícejaderné buňky. Povrch jaterních buněk je převážně hladký, buňky jsou k sobě těsně přiložené.



**Obr. 17:** Hepatocyty (Ústav lékařské chemie a biochemie 2010)

Neustále se zvyšující počet nově syntetizovaných látek klade velké nároky na testování jejich toxicity. Z *in vitro* modelů se nejčastěji používají izolovaná perfundovaná játra, jaterní řezy, izolované jaterní buňky, různé subcelulární frakce a další. Zdrojem jaterních buněk bývají obvykle hlodavci, zejména potkani. Méně se využívají jiné biologické druhy např. prasata, jejichž hepatocyty však vykazují

metabolické vlastnosti bližší buňkám lidským ve srovnání s hepatocyty hlodavců (Kučera 2006).

Objev vysokovýběžných izolací buněk jater potkana byl prvním důležitým krokem pro zavedení, rozvoj a rozšíření modelů buněčných suspenzí a zejména primárních kultur hepatocytů do farmakologických, metabolických a toxikologických studií. Z jater lze dvoustupňovou kolagenázovou perfuzí získat vysoký počet viabilních jaterních buněk s relativně vysokým zastoupením hepatocytů. V průběhu izolace prochází buňky izolačním stresem, při kterém dochází k proteolýze membránových bílkovin, k poškození struktury plazmatické membrány a ke ztrátě diferenciace hepatocytů na krevní a žlučový pól. Na izolačním stresu se zejména podílí použití proteolytických enzymů, narušení buněčného mikroprostředí a ztráta intercelulárních kontaktů. Pro omezení izolačního stresu je nutné dodržovat přesně protokol izolace (optimální aktivita kolagenózy, dostatečné sycení izolačního roztoku kyslíkem, pH a iontové složení izolačních roztoků, délka izolace, podmínky centrifugace, atd.) (Kučera 2006).

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce bylo zjistit vliv vybraných jednotlivých katechinů a směsi katechinů v potravinovém doplňku (Polyfenon E) na:

- proliferaci nádorové buněčné linie HCT-8
- antiproliferativní účinek doxorubicinu v buněčné linii HCT-8
- viabilitu primární kultury izolovaných potkaních hepatocytů
- cytotoxický účinek doxorubicinu v izolovaných hepatocytech
- cytotoxicitu paracetamolu a jeho metabolitu na hepatocyty
- tvorbu reaktivních forem kyslíku v hepatocytech vyvolanou toxickým metabolitem paracetamolu

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE

#### 4.1.1. Biologický materiál

Buněčná linie HCT-8 (odvozeno z lidského adenokarcinomu ilea)

Potkaní hepatocyty

#### 4.1.2. Přístroje

- Laminární box BioAir AURA 2000 M.A.C
- CO<sub>2</sub> inkubátor HeraCell
- Vodní lázeň Memmert
- Stolní centrifuga Eppendorf
- Třepačka mikrotitračních destiček Thermomixer Comfort
- Mikroskop Nikon Eclipse TS 100
- Multifunkční snímač Tecan
- Mrazicí box Heraeus
- Analytické váhy Scaltec SBC 22
- Digitální pH metr Sartorius CP225D
- Ultrazvuková čistička Bandelin Sonorex

#### 4.1.3. Pomůcky

Sterilní kultivační lahve 75 cm<sup>3</sup>, sterilní pipety, sterilní pipetovací špičky, sterilní nádoby, multikanálové pipety, elektrické pipety, stojánky na zkumavky, sterilní zkumavky, zkumavky, pipetovací špičky, mikrozksamavky 0,5ml, 1ml, 2ml, stojánky na mikrozksamavky, sterilní vaničky, lihové fixy, nůžky, parafilm, kádinky, sterilní kádinky, Bürkerova komůrka, sterilní mikrotitrační destičky s plochým dnem pro buněčné kultury, odsávací baňky, Erlenmeyerovy baňky, falkonky, navažovací lodička, latexové rukavice, pinzeta, odměrné baňky, odměrné válce, lžička, váženky,



špachtličky, magnetické míchadlo, lahve pro uchování roztoků, skleněná tyčinka, buničina

#### **4.1.3.1 Pomůcky pro izolaci hepatocytů**

Nádoby na led, miska na játra, skalpel, nůžky, pinzeta, miska na vyklepávání hepatocytů, 400 ml kádinka, 2 x 150 ml kádinka, síťovina na filtrování hepatocytů, sítko na filtrování hepatocytů, Büchnerova nálevka, hadičky, pipetovací špička, 500 ml odsávací baňka na odpad, stopky, igelitový sáček na zbytky jater, 400 ml kádinka (s redestilovanou vodou na propláchnutí hadiček), váženky, špachtličky, lžičky, buničina, kyvety, stojany na kyvety

#### **4.1.4. Chemikálie**

MTT (Sigma-Aldrich Praha, ČR), Catechin (Extrasynthetase, FRA), Epikatechin (Extrasynthetase, FRA), Epigallokatechin (Extrasynthetase, FRA), Epigallokatechin gallát (Extrasynthetase, FRA), Epikatechin-3-gallát (Extrasynthetase, FRA), sterilní roztok neutrální červeně 3,3 mg/ml v DPBS + MgCl<sub>2</sub> + CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich Praha, ČR), paracetamol (Sigma-Aldrich Praha, ČR), koňské sérum inaktivované (Sigma-Aldrich Praha, ČR), RPMI 1640 médium (Sigma-Aldrich Praha, ČR), Trypsin-EDTA (Lonza, Švýcarsko), penicilin/streptomycin (Lonza, Švýcarsko), tablety na fosfátový pufr se solemi (PBS) (Sigma-Aldrich Praha, ČR), sodium pyruvát (Sigma-Aldrich Praha, ČR), Polyfenon E (Sigma-Aldrich Praha, ČR), dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich Praha, ČR), doxorubicin (Upjohn, Italy), albumin (Ústav sér a očkovacích pŕd), kolagenasa C5138 from *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich Praha, ČR), EGTA (Sigma-Aldrich Praha ČR), Kit pro LDH cytotoxicitu (Roche Diagnostics), bezsérové médium, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (Sigma-Aldrich Praha, ČR), N-acetyl-p-benzochinoniminu (Santa Cruz Biotechnology)

## **4.2 METODIKA**

### **4.2.1 Kultivace buněčných linií HCT-8**

#### **4.2.1.1 Rozmrazování buněk HCT-8**

Do 15 ml zkumavky bylo napipetováno 12 ml nezahřátého kultivačního média. Po dobu 1- 2 minut byla ve vodní lázni (37°C) zahřívána zamrazovací zkumavka s buňkami. Rozmražená suspenze byla přenesena do připravené 15 ml zkumavky s kultivačním médiem a pomocí pipety byla postupným nasáváním a vypouštěním zhomogenizována. Suspenze se nechala centrifugovat při laboratorní teplotě 5 minut při 70 x G. Supernatant byl odsán a sediment resuspendován v 15 ml čerstvého kultivačního média. 15 ml suspenze bylo přeneseno do kultivační lahve T- 75, a ta byla umístěna do CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>. Druhý den bylo vyměněno médium a následovala rutinní kultivace.

#### **4.2.1.2 Příprava fosfátového pufru se solemi (PBS), roztoku Trypsin-EDTA a média pro kulturu HCT-8**

Tableta pro přípravu PBS byla rozpuštěna v 200 ml redestilované vody. Takto byl získán 0,01 M fosfátový pufr s 0,0027 M KCl a 0,137 M NaCl o pH 7,4.

Zakoupený roztok Trypsin-EDTA byl rozpipetován po 10 ml do sterilních nádobek a do každé z těchto nádobek bylo přidáno 90 ml PBS. Výsledné roztoky byly rozděleny po 10 ml do sterilních 15 ml nádobek a uchovány při -18°C. Takto byl získán roztok Trypsin-EDTA (0,25%).

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640, obsahující L - glutamin. Ze zakoupeného RPMI-1640 média bylo odebráno 50 ml do sterilní lahve, které byly nahrazeny: 25 ml 5% inaktivovaného fetálního bovinního séra, 25 ml 5% inaktivovaného koňského séra, 2,5 ml 0,5% penicilinu/streptomycinu a 5 ml 1% pyruvátu sodného.

#### **4.2.1.3 Kultivace buněčné linie**

Kultivace buněk HCT-8 probíhala v CO<sub>2</sub> inkubátoru, kde lahev měla povolený uzávěr. Dle potřeby byla lahev uzavřena a vyjmuta z CO<sub>2</sub> inkubátoru. Podle růstu

buněk, při dosažení 90 % konfluencie, byla prováděna, obvykle jednou až dvakrát týdně, pasáž buněk.

#### **4.2.1.4 Pasážování buněk (linie HCT-8)**

Důvodem pasážování je naředění konfluentních buněk tak, aby měly dostatek místa pro další dělení. K požadovanému dílu buněk v lahvi se přidává kultivační médium. Pasáží se rozumí ta část buněk, která je ponechána v lahvi, nikoliv poměr buněčné suspenze a média.

Kultivační lahev byla uzavřena, vyjmuta z CO<sub>2</sub> inkubátoru a přenesena do laminárního boxu. Kultivační médium bylo slito a buňky byly sterilně dvakrát opláchnuty 7 ml PBS, čímž se odstranil vápník z buněčných spojů. Odstranění vápníku je důležité pro správnou funkci trypsinu. Čím důkladněji jsou buňky opláchnuty PBS, tím kratší je enzymatické působení a tím úspěšnější pasáž. Po přidání 2 ml roztoku Trypsin-EDTA (0,25 %) byla lahev ponechána v klidu. Po půl minutové inkubaci bylo odstraněno 2/3 objemu (1,2 ml) Trypsin-EDTA a lahev byla uzavřena. Lehkým kývavým pohybem byl objem kultivační lahve rovnoměrně rozprostřen po celém povrchu dna. Buňky byly přemístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru, kde byly ponechány po dobu 8- 15 minut při teplotě 37°C, při které mohl enzym dobře působit. Doba inkubace závisí na důkladnosti opláchnutí a na konfluenci buněk. Zhruba po 8 minutách byly buňky pod mikroskopem zkontrolovány, zda již většina neměla kulovitý tvar. Pokud ne, byly zpět umístěny do inkubátoru, ne však déle, než na 7 minut. Ve chvíli, kdy měla většina buněk kulovitý tvar a volně putovaly po dně, byl obsah kultivační lahve prudkým pohybem sklepnut do spodní části lahve. Tímto se zamezuje vzniku shluků a udržuje jednobuněčná suspenze. Následně byly buňky sterilně spláchnuty 4 ml kultivačního média, čímž se zastavilo enzymatické působení, a postupným napouštěním a vypouštěním pipety byla buněčná suspenze homogenizována. Buněčná suspenze byla přenesena do 15 ml zkumavky ke 4 ml kultivačního média a znovu homogenizována. Buňky byly centrifugovány při 100g při 25°C po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl odebrán ze zkumavky supernatant a byly přidány 4 ml čistého média a opět byla suspenze homogenizována. Nakonec bylo 0,5 ml suspenze přeneseno do čisté sterilní lahve a sterilně doplněno médiem do 13 ml. Lahev byla umístěna do inkubátoru a byl povolen uzávěr. Zbylá suspenze byla použita na experimenty.

## **4.2.2 Test cytotoxicity- barvení neutrální červení (Neutral Red uptake test)**

Neutral red uptake (NRU) test je test životnosti buněk. Základem je schopnost inkorporace a navázání neutrální červeně do živých buněk. U buněk poškozených nebo mrtvých tato schopnost klesá. Toto supravitální barvivo penetruje buněčnou membránu neionizovanou difúzí a akumuluje se převážně v lyzosomech, kde je nižší pH než okolní cytoplazmy. Barvivo neutrální červeně je při fyziologickém pH bez náboje a prostupuje do lysozomu. Zde však získává náboj a již nemůže prostupovat zpět. Buňky se jeví jako sytě červené. Udržování protonového gradientu na membráně lysozomu je energeticky náročné. Ztráta gradientu pH při poškození buňky nebo buněčné smrti způsobí zvýšení propustnosti membrány a uvolnění zadržené neutrální červeně. Buňky se pak jeví jako světle zbarvené. Dojde k poklesu absorbance, která se změří spektrofotometricky a tak lze rozlišit buňky živé, poškozené nebo mrtvé. Cytotoxicita je vyjádřena jako koncentrace závislá na poklesu absorbance po chemické expozici neutrální červení (Riddell et al, 1986).

### **4.2.2.1 Příprava roztoků neutrální červeně, fixačního a lyzačního roztoku**

#### **Neutrální červeně**

Zakoupený roztok neutrální červeně o koncentraci 3,3 mg/ml byl naředěn médiem na výslednou koncentraci 40 µg/ml (0,5 ml roztoku neutrální červeně + 39,5 ml čistého média)

#### **Fixační roztok**

1g/100 ml CaCl<sub>2</sub> v 0,5 % roztoku formaldehydu

#### **Lyzační roztok**

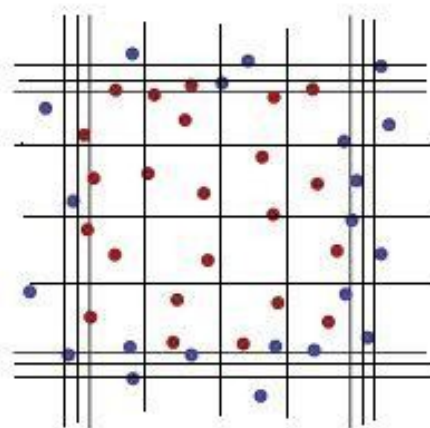
1 % CH<sub>3</sub>COOH v 50 % etanolu

#### 4.2.2.2 Příprava roztoků testovaných látek

Testované roztoky byly připraveny z roztoků zásobních, jejich naředěním v médiu. Připravované roztoky byly dvakrát koncentrovanější, než je požadovaná výsledná expoziční koncentrace, protože byly přidávány v množství 100  $\mu$ l do jamek s buňkami, kde již 100  $\mu$ l média bylo.

#### 4.2.2.3 Nasazení buněčné suspenze na mikrotitrační destičky

Když buňky dosáhly konfluence cca 80-90 % byly běžně zpasážovány a 4 ml buněčné suspenze byly odpipetovány do sterilní kádinky. Sterilní pipetou bylo odebráno 100  $\mu$ l suspenze do 0,5 ml mikrozkušavky, přidáno 100  $\mu$ l trypanové modři a necháno při pokojové teplotě inkubovat zhruba 3 minuty. Do obou polovin připravené Bürkerovy komůrky bylo napipetováno množství 9  $\mu$ l suspenze (do každé poloviny vždy nový náběr). Pod mikroskopem bylo počítáno množství buněk ležících uvnitř deseti čtverců. Při počítání se braly v úvahu jen 2 strany středního čtverce. Počítaly se všechny buňky ležící nebo se dotýkající levého a horního okraje (červené tečky v obrázku 18), buď zevnitř, nebo vně čtverce. Nepočítaly se buňky dotýkající se protilehlých stran, tedy buňky ležící v dolním a pravém rozhraní (modré tečky v obrázku 18).



**Obr. 18:** Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Pomocí Bürkerovy komůrky bylo zjištěno množství buněk v 100  $\mu$ l a podle potřeby byla suspenze naředěna na koncentraci 5 000 buněk/100  $\mu$ l.

Koncentrace buněk v neředěné suspenzi byla počítána podle vzorce:

$$c=x*4*10^4*10$$

(c – počet buněk ve 4 ml neředěné suspenze, x – průměrný počet buněk v 1 čtverci,  $4*10^4$  – přepočteno na 4 ml, 10 – ředění)

Do každé z vnitřních jamek 96- ti jamkové destičky bylo pipetováno 100  $\mu$ l naředěné homogenní buněčné suspenze. Do postraních jamek byla pipetována sterilní voda, z důvodu udržení dostatečné vlhkosti, která zabraňuje vysychání jamek v průběhu kultivace. Destičky byly vloženy do termostatu a buňky se nechaly 24 či 48 hodin kultivovat.

#### **4.2.2.4 Expozice buněk**

Buňky by měly za dobu kultivace dosáhnout 70 % konfluence a pod mikroskopem se jevit jako protáhlé a jednojaderné. Testované látky byly připraveny v médiu do požadovaných koncentrací a po 100  $\mu$ l byly přidány do jamek k buňkám. Každá koncentrace látek byla pipetována do 6 jamek pod sebou, tedy 6 paralelních vzorků. Důležitá je kontrola, kde místo testovaných látek bylo použito 0,1 % DMSO, ve kterém byly látky rozpuštěny. Kontrola byla pipetována taktéž v 6 paralelních vzorcích. Směs v destičkách byla promíchána prudkým pohybem a nechala se 48 hodin inkubovat v termostatu.

#### **4.2.2.5 Stanovení životnosti buněk**

Pro zjištění životnosti bylo použito barvení neutrální červení (NRU test). Z destiček bylo vyklepnutím odstraněno expoziční médium a do každé jamky s buňkami bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku neutrální červeně rozpuštěné v médiu. Výsledná koncentrace neutrální červeně byla 40  $\mu$ g/ml. Destičky byly opět umístěny do inkubátoru, kde byly 2-3 hodiny inkubovány.

Po inkubaci bylo vyklepnuto veškeré médium a k buňkám přidáno 100  $\mu$ l fixačního roztoku. Buňky se nechaly v klidu při pokojové teplotě 15 minut.

Fixační roztok byl slit rychlým překlopením destičky a bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzačního roztoku. Destička byla umístěna na 20 minut na třepačku mikrotitračních destiček, kde došlo při působení lyzačního činidla k rozrušení buněk a vylití neutrální

červeně. Zabarvení roztoku v jednotlivých jamkách odpovídá počtu zlyzovaných živých buněk.

Vyhodnocení bylo provedeno na multifunkčním snímači mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200 programem Magellan. Absorbance byla odečtena při 540 nm. Pro vyhodnocení byla použita hodnota absorbance mínus hodnota blanku (jamka s médiem bez buněk), výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako procenta kontroly, která představovala životnost 100 %.

### 4.2.3 Hepatocyty

#### 4.2.3.1 Příprava zásobních roztoků pro izolaci hepatocytů

##### Roztok solí

NaCl	80,0g
KCl	4,0g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	2,0g

Navážené množství bylo doplněno redestilovanou vodou do 1 l a uchováváno zmrazené v plastických lahvích po 200 ml.

##### Fosfátový pufr

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O	2,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4g

Navážené množství bylo doplněno redestilovanou vodou do 200 ml a uchováváno zmrazené v plastických lahvích po 20 ml.

##### 1 M roztok NaHCO<sub>3</sub>

NaHCO <sub>3</sub>	16,8g
--------------------	-------

Navážené množství bylo doplněno redestilovanou vodou do 200 ml a uchováváno v zmrazené v plastických lahvích po 37,5ml.

##### Eurocollins

roztok na transport a promytí jater

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,05 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,40 g/l
KCl	1,12 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	0,84 g/l
glukosa	35,00 g/l

### Roztok CaCl<sub>2</sub>

CaCl<sub>2</sub> 4,0g/ 50 ml redestil. vody

Roztok byl uchováván v lednici.

### Sterilní roztok CaCl<sub>2</sub>

Připravený roztok CaCl<sub>2</sub> (4,0g CaCl<sub>2</sub>/50ml redestil. vody) byl vyklávkován a po vychladnutí utěsněn parafilmem a uskladněn v lednici.

### 4.2.3.2 Příprava roztoků a kultivačního média na izolaci hepatocytů

#### Schéma přípravy pracovních roztoků

Veškeré nádoby před použitím bylo 2x opláchnuto redestilovanou vodou!

Odměrná baňka (2 litry) zásobního roztoku (ZR) :

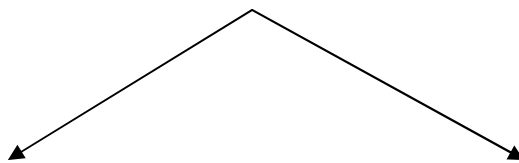
- redestilovaná voda (zahřátá ve vodní lázni) 1780 ml
- roztok solí 200 ml
- fosfátový pufr 20 ml

ZR → 800 ml ZR + 1,6 ml CaCl<sub>2</sub> + úprava pH na 7,4  
 (0,1 M HCl, 0,1 M NaOH)  
 + mikrobiální filtrace = **roztok C**

↓



1200 ml ZR + 31,2 ml 1M NaHCO<sub>3</sub> – rozmícháno na míchačce a necháno probublat na vodní lázni při teplotě 37°C pneumoxidem po dobu 7 minut a následně bylo upraveno pH na 7,4 (1M HCl, 1M NaOH)



500 ml + 1,0 ml CaCl<sub>2</sub> = **roztok B**

700 ml + 0,1 g EGTA = **roztok A**

↓  
2x200 ml bylo přemístěno do Erlenmeyerovy baňky

+ 2 g albuminu, rozmícháno

a umístěno do lednice = **roztok Bv**

↓  
roztok byl důkladně promíchán a přelit do odsávací baňky o objemu 0,5 l, a byl umístěn do vodní lázně (37°C)

↓  
2x25 ml bylo přeneseno do 50 ml nádobek, ty byly umístěny do vodní lázně (37°C), a těsně před promýváním jater bylo přidáno 15 mg kolagenasy/25 ml = **roztok Bk**

### **Kultivační médium ISOM**

Nejdůležitější složky jsou: WILIAMS, NaHCO<sub>3</sub>, HAM F12, insulin a ATB-PEN/STREP

A) WILIAMS: 10,93 g WILIAMS + 2,2 g NaHCO<sub>3</sub> + 10 ml PEN/STREP, připravená množství látek byla doplněna ve sterilní lahvi redestilovanou vodou na objem 1 litr

B) HAM F12: 10,64 g HAM F12 + 1,2 g NaHCO<sub>3</sub> + 10 ml PEN/STREP, připravená množství látek byla doplněna ve sterilní lahvi redestilovanou vodou na objem 1 litr

Roztoky WILIAMS a HAM F12 byly smíchány v poměru 1:1 do dvou lahví na výsledný objem 1 litr. Smíchané roztoky se nechaly po dobu 7 minut probublávat pneumoxidem a následně jim bylo upraveno pH na 7,2 pomocí 1 M HCl. Upravené roztoky byly filtrovány přes bakteriální filtr. První litr média byl přefiltrován a přendán do nové sterilní lahve a nechal se znovu probublávat pneumoxidem po dobu 7 minut. Přefiltrované a probublávané médium bylo rozplněno po 200 ml do 5 sterilních lahví. Do druhého litru média bylo před filtrací přidáno 29 mg insulinu. Médium se zfiltrovalo, nechal se probublávat 7 minut pneumoxidem a bylo rozplněno do 2 sterilních lahví po 500 ml. Všechny lahve byly uzavřeny víčkem, utěsněny parafilmem a uchovávány v lednici.

#### 4.2.3.3 Izolace hepatocytů

Celá nepoškozená játra byla přenesena do Büchnerovy nálevky umístěné nad odpadní nádobou. Perfúze jater byla prováděna postupnou, opakovanou „kanylací“ všech cév vstupujících do jater. Játra byla promývána perfúzním roztokem bez vápníku (roztok A) vzdušněným pneumoxidem, při teplotě 37°C bez recirkulace. Promývání se provádělo až do úplného odkrvení jater, po dobu 5-10 minut, při kterém se spotřebovalo cca 200 ml roztoku A. Následně bylo nutné játra promývat médiem s kolagenasou a vápníkem (roztok B<sub>K</sub>), při teplotě 37°C, po dobu cca 5-7 minut. Za tuto dobu došlo k dostatečnému natrávení jaterní tkáně působením kolagenasy. Játra byla přendána do skleněné misky umístěné v ledové lázni, byl přidán roztok B<sub>V</sub>, který obsahoval vápník a albumin a neobsahoval kolagenasu. Pomocí pinzety byly z jater uvolněny hepatocyty do roztoku B<sub>V</sub>. Suspenze hepatocytů a zbytků jaterní tkáně byla zfiltrována přes nylonové sítko s definovanou velikostí ok. Získaná suspenze byla nalita do 4-8 vychlazených centrifugačních kyvet o objemu 50 ml. Kyvety se suspenzí se nechaly centrifugovat při teplotě 4°C při 40g po dobu 5- ti minut. Supernatant z kyvet byl odsán a peleta se resuspendovala repipetací (zpětným pipetováním) ve vychlazeném roztoku C, který obsahoval vápník. Suspenze se znovu stočila při 40g po dobu 5- ti minut. Tento promývací postup byl proveden celkem dvakrát. Poprvé za nesterilních podmínek na laboratorním stole, podruhé v laminárním boxu, kdy byly hepatocyty přeneseny do

sterilního roztoku C. Po dokončené centrifugaci byl v laminárním boxu supernatant odsán. Peleta byla resuspendována zpětným pipetováním ve vychlazeném živném mediu ISOM (bez insulínu, bez FCS). Následovala poslední centrifugace, která probíhala ve sterilních vychlazených kyvetách při 40g taktéž po dobu 5- ti minut. Supernatant byl opět odsán v laminárním boxu, peleta resuspendována zpětným pipetováním ve vychlazeném živném mediu s FCS (bez insulínu). Počet promývacích kroků může být snížen nebo naopak zvýšen podle čirosti či zákalu supernatantu nad suspenzí hepatocytů. Suspenze byla přenesena z kyvet do sterilní kádinky. Objem suspenze by měl být 50-100 ml (dle množství hepatocytů= hustoty suspenze). Ze suspenze ve sterilní kádince byl odebrán vzorek o objemu 30  $\mu$ l do mikrozkuhavky. K němu bylo přidáno 30  $\mu$ l roztoku trypanové modři. Dobře promíchaná směs byla nanesena do Bürkerovy komůrky a byla zjištěna koncentrace hepatocytů v suspenzi. Počítáním živých a mrtvých hepatocytů byla zjištěna životnost buněk. Dle zjištěné koncentrace hepatocytů byla suspenze zředěna na koncentraci  $0,8-1 \cdot 10^6$  živých hepatocytů/ml (s ohledem na životnost buněk) pomocí živného media s FCS (bez insulínu). Tato konečná suspenze byla nanesena na mikrotitrační destičky, které byly využity k experimentům. Hepatocyty byly ponechány v CO<sub>2</sub> inkubátoru 3- 4 hodiny při 37°C, poté byly nasazeny k pokusu.

#### **4.2.4 Test cytotoxicity- MTT test**

Tato metoda je založena na redukci ve vodě rozpustného, žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT), na ve vodě nerozpustný formazan, který tvoří modré krystaly hvězdicovitého tvaru. Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk za účasti dehydrogenázy. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm a 690 nm.

##### **4.2.4.1 Příprava roztoku MTT a lyzačního roztoku**

###### **MTT roztok**

3 mg zakoupeného MTT byly rozpuštěny v 1 ml fosfátového pufru 0,1 M pH 7,4 (k rozpouštění byl použit ultrazvuk)

### **Lyzační roztok**

0,08 M HCl v isopropanolu- 2 ml 4 M HCl byly přidány k 98 ml isopropanolu

#### **4.2.4.2 Nasazení buněčné suspenze na mikrotitrační destičky**

Suspenze izolovaných hepatocytů o hustotě cca  $1 \times 10^6$  buněk/ml (zjištěno pomocí Bürkerovy komůrky, viz. výše) byla pomocí multikanálové pipety nanesena na mikrotitrační destičky s plochým dnem. Do každé z vnitřních jamek bylo sterilně nasazeno 50  $\mu$ l suspenze buněk, kterou bylo nutné neustále míchat z důvodu rychlého usazování buněk ke dnu. Do okolních jamek byla napipetována sterilní destilovaná voda, z důvodů udržení dostatečné vlhkosti. Destičky s hepatocyty byly následně umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru, kde byly při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> inkubovány po dobu 4 hodin.

#### **4.2.4.3 Expozice buněk**

Za dobu 4 hodin se hepatocyty uchytily ke dnu destičky. Proto bylo nutné s destičkami zacházet opatrně, aby nedošlo k odtržení hepatocytů ode dna. Připravené koncentrace testovaných látek byly přidány po 50  $\mu$ l k hepatocytům do 6 jamek pod sebou, tedy 6 paralelních vzorků. Testované látky byly připraveny ze zásobních roztoků ve dvojnásobné koncentraci, protože byly přidávány k 50  $\mu$ l média, které již bylo v destičkách. V kontrolních (neovlivněných) vzorcích bylo k hepatocytům v jednom sloupci na destičce přidáno médium s 0,1 % DMSO, které bylo použito k přípravě zásobních roztoků testovaných substancí. A negativní kontrola, kdy bylo k hepatocytům napipetováno médium s 10 % DMSO nebo 2 % Tritonem X100, aby byly všechny buňky zabity, taktéž do 1 sloupec na destičce. Hepatocyty byly inkubovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru, při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 24 nebo 48 hodin.

#### 4.2.4.4 Odečítání cytotoxicity

Připravený roztok MTT byl předeřán na 37°C ve vodní lázni a pomocí multikanálové pipety přidáván k hepatocytům v objemu 25 µl/jamku, včetně kontroly, s výjimkou slepých vzorků. Pipetování se provádělo bez slití média z jamek a to opatrně, aby nedošlo k odchlípnutí buněk ode dna destičky. Hepatocyty se nechaly inkubovat v CO<sub>2</sub> inkubátoru, při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 1 hodiny. Po skončení inkubace bylo médium opatrně odpipetováno. Následně byl šetrně přidán lyzační roztok (HCl-isopropanol) o objemu 50 µl/jamku, včetně slepých vzorků. Opatrným mícháním na třepačce po dobu 30 minut došlo k lýze buněk a rozpuštění vzniklého fialového formazanu.

Vyhodnocení bylo provedeno na multifunkčním snímači mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200 programem Magellan. Absorbance byla odečtena při 570 nm a 690 nm. Životnost hepatocytů inkubovaných s testovanými substancemi byla vyjádřena jako % absorbance, kdy absorbance kontroly představovala 100 %.

#### 4.2.5 Test cytotoxicity pomocí stanovení LDH

K měření cytotoxicity je možno využít stanovení aktivity LDH uvolněné z odumřelých buněk do média. Při stanovení aktivity se využívá zpřažené reakce. V prvním kroku katalyzuje LDH dehydrogenaci laktátu za redukce NAD<sup>+</sup> na NADH. V druhém kroku reaguje vzniklý NADH s barvivem přidaným do reakce. Vzniká vysoce zbarvený formazan, který se měří spektrofotometricky při vlnové délce 490- 520 nm. Aktivita LDH je přímo úměrná počtu rozpadlých buněk v důsledku působení toxických látek.

**Catalyst** – zakoupený lyofilizát byl rozpuštěn v 1ml redestilované vody a po dobu asi 10 minut byl důkladně protřepáván. Po rozpuštění byl uchováván v lednici při teplotě 2-8°C.

**Barvicí roztok** – po rozmražení byl uchováván v lednici při teplotě 2-8°C.

##### 4.2.5.1 Nasazení buněčné suspenze na mikrotitrační destičky

Suspenze izolovaných hepatocytů o hustotě cca 1x10<sup>6</sup> buněk/ml (zjištěno pomocí Bürkerovy komůrky, viz. výše) byla pomocí multikanálové pipety nanesena na

mikrotitrační destičky s plochým dnem. Do každé z vnitřních jamek bylo sterilně nasazeno 100  $\mu$ l suspenze buněk, kterou bylo nutné neustále míchat z důvodu rychlého usazování buněk ke dnu. Do okolních jamek byla napipetována sterilní destilovaná voda z důvodů udržení dostatečné vlhkosti. Destičky s hepatocyty byly následně umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru, kde byly při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> inkubovány po dobu 3 hodin.

#### 4.2.5.2 Expozice buněk

Za 3 hodiny se hepatocyty uchytily ke dnu destičky, proto bylo nutné s destičkami zacházet opatrně, aby nedošlo k odtržení hepatocytů ode dna. Ze všech jamek bylo opatrně odsáto veškeré médium, které bylo nahrazeno médiem s max. 1 % FBS. K 100  $\mu$ l média byly do jamek přidány testované látky POE, EGCG, NAPQI a DOX (vše naředěné ve stejném médiu) tak, aby výsledný objem ve všech jamkách byl 200  $\mu$ l. Každý vzorek byl pipetován do 6 jamek pod sebou, tj. v 6 paralelních vzorcích. Současně byla do druhého sloupce na destičce připravena kontrola (neovlivněné buňky), tj. k hepatocytům bylo přidáno médium s 0,1 % DMSO. Hepatocyty byly ponechány v CO<sub>2</sub> inkubátoru, při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> do druhého dne. Schéma rozmístění vzorků na mikrotitrační destičce je znázorněno na obrázku 19.

1	2	3	4	5	6	7	8
Voda	DMSO	NAPQI 0,5 $\mu$ M	EGCG 0,5 $\mu$ M+ NAPQI 0,5 $\mu$ M	POE 0,5 $\mu$ M + NAPQI 0,5 $\mu$ M	NAPQI 10 $\mu$ M	EGCG 0,5 $\mu$ M+ NAPQI 10 $\mu$ M	POE 0,5 $\mu$ M+ NAPQI 10 $\mu$ M

**Obr. 19:** Schéma rozmístění testovaných látek na mikrotitrační destičce pro stanovení LDH

#### 4.2.5.3 Stanovení LDH

Po 24 hodinové inkubaci bylo opatrně, aby nedošlo k nasátí buněk, odebráno z každé jamky 10  $\mu$ l média, které bylo přeneseno do nové nesterilní 96- ti jamkové destičky s plochým dnem. K odebranému médiu bylo přidáno 100  $\mu$ l reakční směsi,

kteřá byla těsně před použitím naředěna v poměru 1: 45 – catalyst: barvicí roztok. Destička, zakrytá alobalem, byla nechána 30 minut k inkubaci při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení bylo provedeno na multifunkčním snímači mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200 programem Magellan. Absorbance byla měřena při 490 nm. Výsledné hodnoty absorbancí byly vztaženy k hodnotě absorbance kontroly, která představovala 100 %.

#### **4.2.6 Detekce ROS**

K detekci oxidačního stresu v buněčných liniích byla využita fluorescenčně značená sonda 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (DCFH<sub>2</sub>-DA). Struktura, která obsahuje dvě acetátové skupiny, má lipofilní charakter a umožňuje přestup skrze buněčnou membránu. Uvnitř buňky jsou obě acetátové skupiny degradovány pomocí esteráz a vzniká 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH<sub>2</sub>). Struktura se tak stává hydrofilní a není jí umožněn přestup přes buněčnou membránu zpět. Následně se DCFH<sub>2</sub> oxiduje za účasti ROS na fluoreskující 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH). Nárůst fluorescence je detekován na Tecanu po dobu 60- 120 minut, při 37°C, při excitačním spektru 490nm a emisním spektru 530nm (Pourahmad 2008, Petit 2008).

##### **4.2.6.1 Nasazení buněčné suspenze na mikrotitrační destičky**

Suspenze izolovaných hepatocytů o hustotě cca 1x10<sup>6</sup> buněk/ml (zjištěno pomocí Bürkerovy komůrky, viz. výše) byla pomocí multikanálové pipety nanesena na mikrotitrační destičky s plochým dnem. Do každé z vnitřních jamek bylo sterilně nasazeno 50 µl suspenze buněk, kterou bylo nutné neustále míchat z důvodu rychlého usazování buněk ke dnu. Do okolních jamek byla napipetována sterilní destilovaná voda, z důvodů udržení dostatečné vlhkosti. Destičky s hepatocyty byly následně umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru, kde byly při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> inkubovány do druhého dne.

##### **4.2.6.2 Expozice buněk**

Za dobu 24 hodin se hepatocyty uchytily ke dnu destičky, proto bylo nutné s destičkami zacházet opatrně, aby nedošlo k odtržení hepatocytů ode dna. Opatrně bylo ze všech jamek odsáto veškeré médium. Do jamek byly pipetovány připravené koncentrace testovaných látek POE a NAPQI po objemu 50 µl tak, aby v každé jamce

byl výsledný objem 100  $\mu$ l. To znamená, že v některém sloupci byly přítomny obě testované látky a tam, kde byla přítomna pouze jedna, byl objem doplněn pufr. Každý vzorek byl pipetován do 6 jamek pod sebou. Testované látky byly připraveny ze zásobních roztoků ve dvojnásobné koncentraci, protože byly přidávány k 50  $\mu$ l pufru nebo k druhé testované substanci. Látky byly rozředěny v ADS pufru a jejich výsledné koncentrace byly 10  $\mu$ M NAPQI a 0,5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M POE. Do prvního sloupce bylo přidáno médium s 0,1 % DMSO. Současně byla do jednoho sloupce na destičce připravena pozitivní kontrola, kdy byl k hepatocytům přidán H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, při kterém tvorba ROS vždy stoupá. Schéma umístění vzorků na mikrotitrační destičce je znázorněno na obrázku 20. U zvýrazněných políček byl POE 0,5  $\mu$ M nebo POE 5  $\mu$ M na destičky pipetován s 30- ti minutovým předstihem než zbytek testovaných substancí. Popisky v grafech jsou pak odlišeny „před“ (30- ti minutová preinkubace) a „spolu“ (POE i NAPQI byly přidány současně).

1	2	3	4	5	6	7	8	9
DMSO 0,1 %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	POE 0,5 $\mu$ M+ NAPQI 10 $\mu$ M	POE 5 $\mu$ M+ NAPQI 10 $\mu$ M	NAPQI 10 $\mu$ M+ pufr	POE 0,5 $\mu$ M+ NAPQI 10 $\mu$ M	POE 5 $\mu$ M+ NAPQI 10 $\mu$ M	POE 0,5 $\mu$ M+ pufr	POE 5 $\mu$ M+ pufr

**Obr. 20:** Umístění vzorků na mikrotitrační destičce pro detekci oxidačního stresu

#### 4.2.6.3 Detekce nárůstu fluorescence

Po přidání všech substancí bylo do každé jamky ještě přidáno 100 $\mu$ l 10  $\mu$ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu rozředěného v ADS pufru. Z důvodu rychlého rozkladu DCFH<sub>2</sub>-DA na světle je nutné provádět ředění a pipetování ve tmě.

Vyhodnocení bylo provedeno na multifunkčním snímači mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200 programem Magellan. Nárůst fluorescence byl odečítán po dobu 60- ti minut při 490 nm a 530 nm.



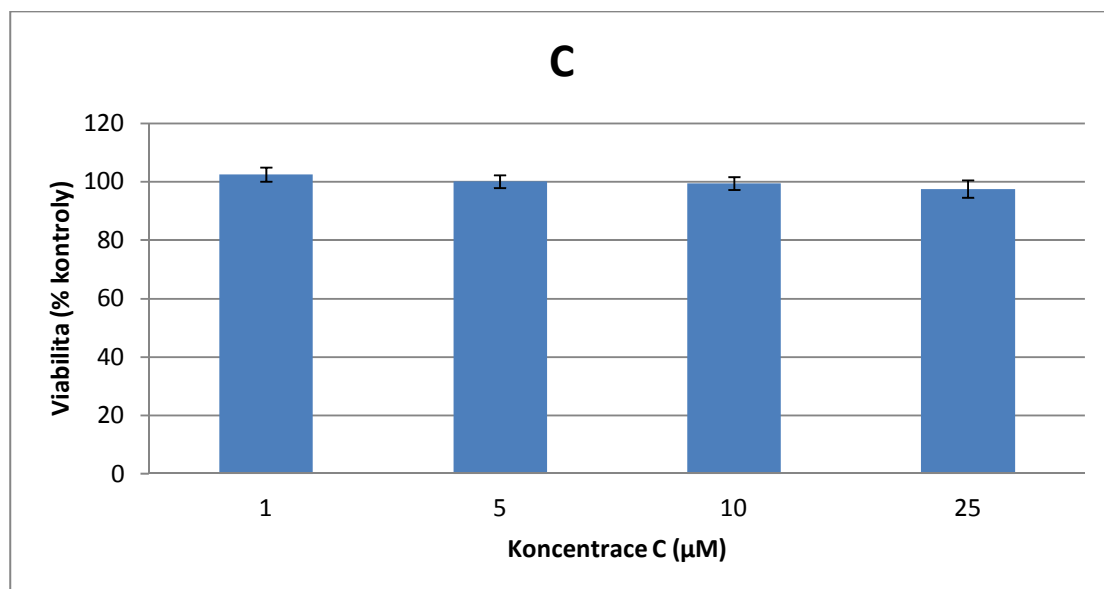
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Testování vlivu katechinů na buňky HCT-8

K testování antiproliferačního účinku bylo použito 5 katechinů: katechin (C), epikatechin (EC), epigallokatechin (EGC), epikatechin-3-gallát (EC-3-G), epigallokatechin gallát (EGCG). Každá testovaná koncentrace jednotlivého katechinu byla nanesena do jednoho celého sloupce na mikrotitrační destičce tj. v šesti paralelních vzorcích. Kontrola byla nanesena na destičce do krajního sloupku a obsahovala 0,1 % DMSO, protože testované látky byly v DMSO rozpuštěny. K vyhodnocení bylo využito barvení neutrální červení (NRU test). Test byl proveden podle návodu popsaného v kapitole 4.2.2. s každou látkou dvakrát. Výsledné hodnoty absorbance vzorků byly vztaheny k průměrné hodnotě absorbancí kontrol, která představovala 100 %. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2- 6 a na obrázcích 21- 25.

**Tab. 2:** Antiproliferativní vliv C na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

<b>Viabilita HCT-8 (%) <math>\pm</math> SD (%)</b>			
<b>C</b>	<b>1. experiment</b>	<b>2. experiment</b>	<b>průměr</b>
<b>1<math>\mu</math>M</b>	102 $\pm$ 1	102 $\pm$ 2	<b>102<math>\pm</math>2</b>
<b>5<math>\mu</math>M</b>	96 $\pm$ 2	103 $\pm$ 2	<b>100<math>\pm</math>2</b>
<b>10<math>\mu</math>M</b>	97 $\pm$ 1	101 $\pm$ 2	<b>99<math>\pm</math>2</b>
<b>25<math>\mu</math>M</b>	94 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2	<b>97<math>\pm</math>3</b>

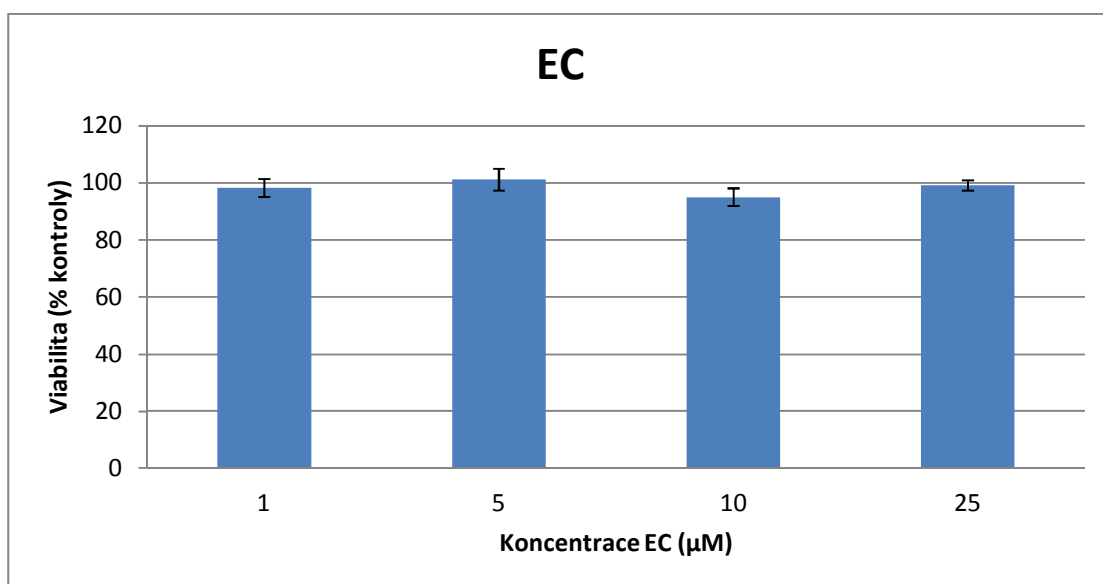


**Obr. 21:** Antiproliferativní vliv C na buněčnou linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že C neovlivňuje proliferaci buněčné linie HCT-8.

**Tab. 3:** Antiproliferativní vliv EC na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

<b>Viabilita HCT-8 (%) <math>\pm</math> SD (%)</b>			
<b>EC</b>	<b>1. experiment</b>	<b>2. experiment</b>	<b>průměr</b>
<b>1<math>\mu</math>M</b>	94 $\pm$ 3	101 $\pm$ 2	<b>98<math>\pm</math>3</b>
<b>5<math>\mu</math>M</b>	100 $\pm$ 4	102 $\pm$ 3	<b>101<math>\pm</math>3</b>
<b>10<math>\mu</math>M</b>	91 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	<b>95<math>\pm</math>3</b>
<b>25<math>\mu</math>M</b>	100 $\pm$ 1	97 $\pm$ 2	<b>99<math>\pm</math>1</b>

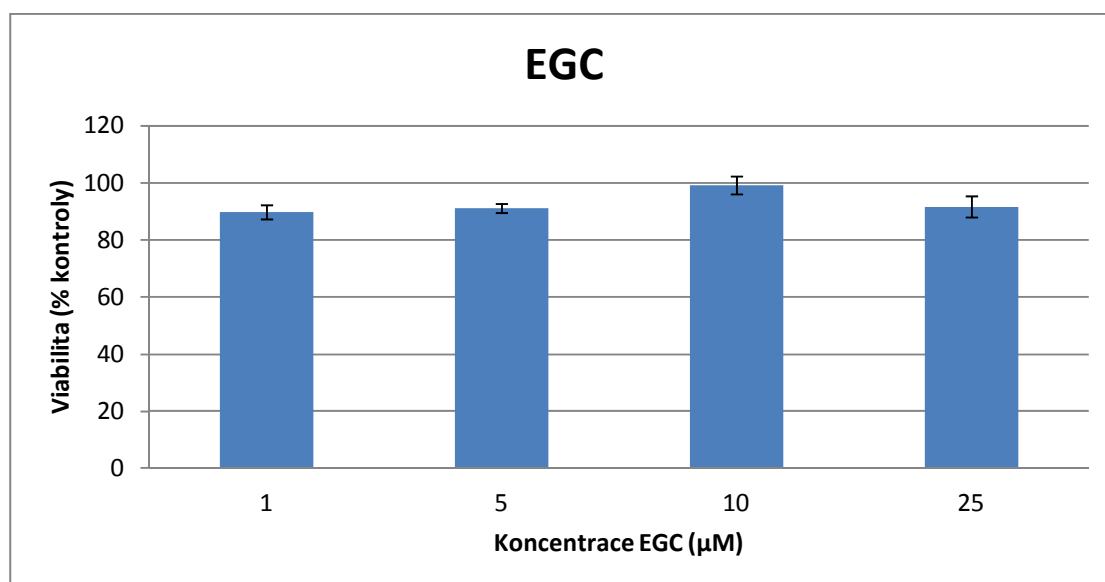


**Obr. 22:** Antiproliferativní vliv EC na buněčnou linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že EC neovlivňuje proliferaci buněčné linie HCT-8.

**Tab. 4:** Antiproliferativní vliv EGC na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
EGC	1. experiment	2. experiment	průměr
1 $\mu$ M	93 $\pm$ 2	86 $\pm$ 2	89 $\pm$ 2
5 $\mu$ M	90 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1
10 $\mu$ M	104 $\pm$ 3	93 $\pm$ 2	99 $\pm$ 3
25 $\mu$ M	99 $\pm$ 3	84 $\pm$ 3	91 $\pm$ 3

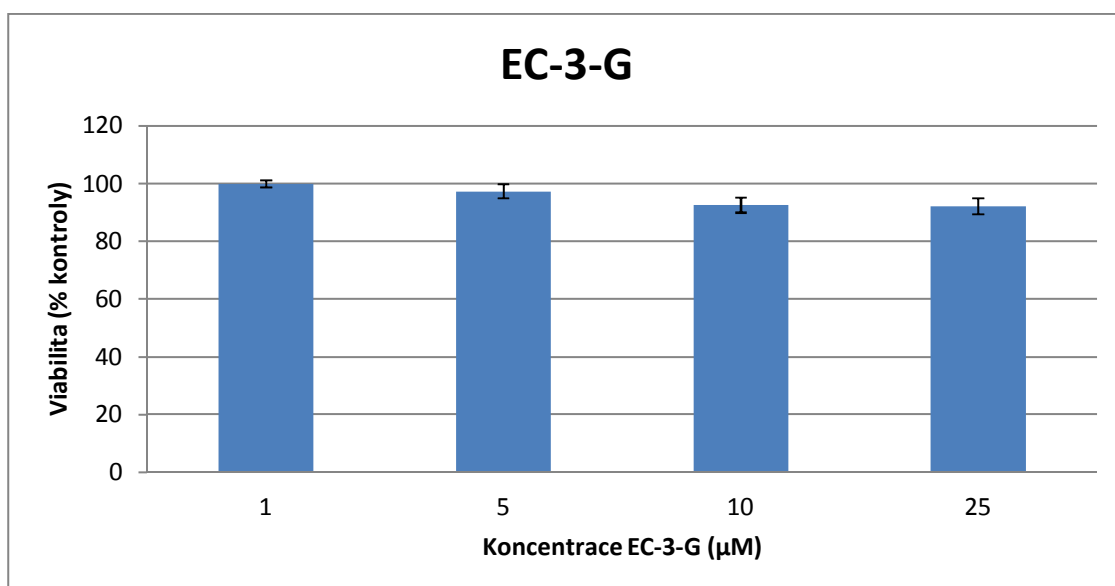


**Obr. 23:** Antiproliferativní vliv EGC na buněčnou linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že EGC neovlivňuje proliferaci buněčné linie HCT-8.

**Tab. 5:** Antiproliferativní vliv EC-3-G na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

<b>Viabilita HCT-8 (%) <math>\pm</math> SD (%)</b>			
<b>EC-3-G</b>	<b>1. experiment</b>	<b>2. experiment</b>	<b>průměr</b>
<b>1<math>\mu</math>M</b>	104 $\pm$ 1	95 $\pm$ 1	<b>100<math>\pm</math>1</b>
<b>5<math>\mu</math>M</b>	103 $\pm$ 2	91 $\pm$ 2	<b>97<math>\pm</math>2</b>
<b>10<math>\mu</math>M</b>	99 $\pm$ 2	86 $\pm$ 2	<b>92<math>\pm</math>2</b>
<b>25<math>\mu</math>M</b>	98 $\pm$ 2	86 $\pm$ 3	<b>92<math>\pm</math>2</b>

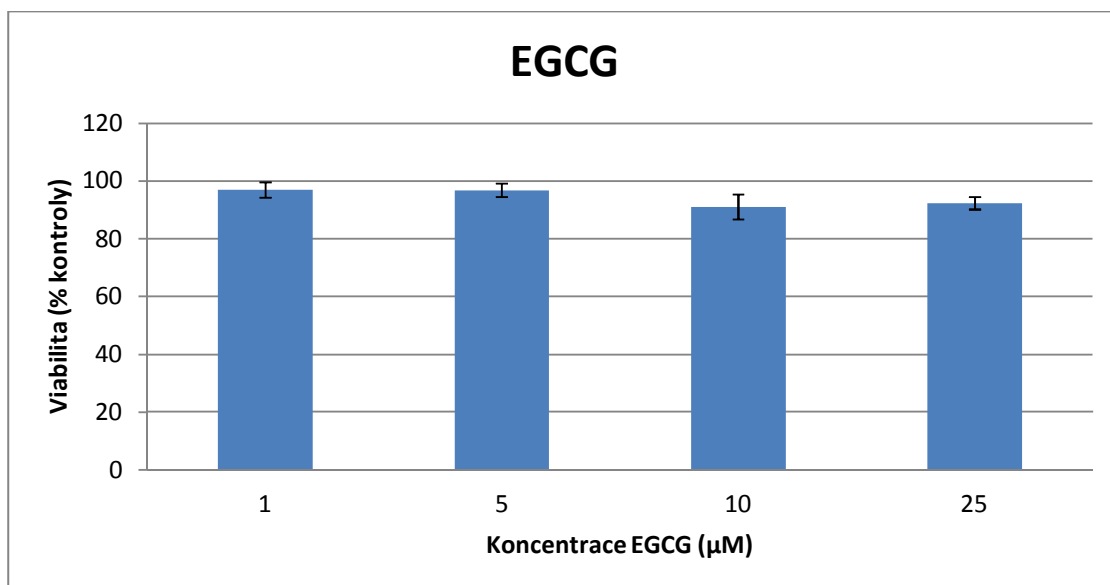


**Obr. 24:** Antiproliferativní vliv EC-3-G na buněčnou linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že EC-3-G neovlivňuje proliferaci buněčné linie HCT-8.

**Tab. 6:** Antiproliferativní vliv EGCG na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

<b>Viabilita HCT-8 (%) <math>\pm</math> SD (%)</b>			
<b>EGCG</b>	<b>1. experiment</b>	<b>2. experiment</b>	<b>průměr</b>
<b>1<math>\mu</math>M</b>	94 $\pm$ 1	99 $\pm$ 3	<b>97<math>\pm</math>2</b>
<b>5<math>\mu</math>M</b>	93 $\pm$ 1	100 $\pm$ 3	<b>97<math>\pm</math>2</b>
<b>10<math>\mu</math>M</b>	86 $\pm$ 2	96 $\pm$ 6	<b>91<math>\pm</math>4</b>
<b>25<math>\mu</math>M</b>	93 $\pm$ 2	91 $\pm$ 2	<b>92<math>\pm</math>2</b>



**Obr. 25:** Antiproliferativní vliv EGCG na buněčnou linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že EGCG neovlivňuje proliferaci buněčné linie HCT-8.

## **5.2 Testování vlivu katechinů na antiproliferativní vliv DOX na buněčnou linii HCT-8**

Buňky byly vystaveny jak samotnému vlivu doxorubicinu (DOX) o několika koncentracích, tak současně vlivu katechinů o koncentraci 5  $\mu$ M a DOX o několika koncentracích.

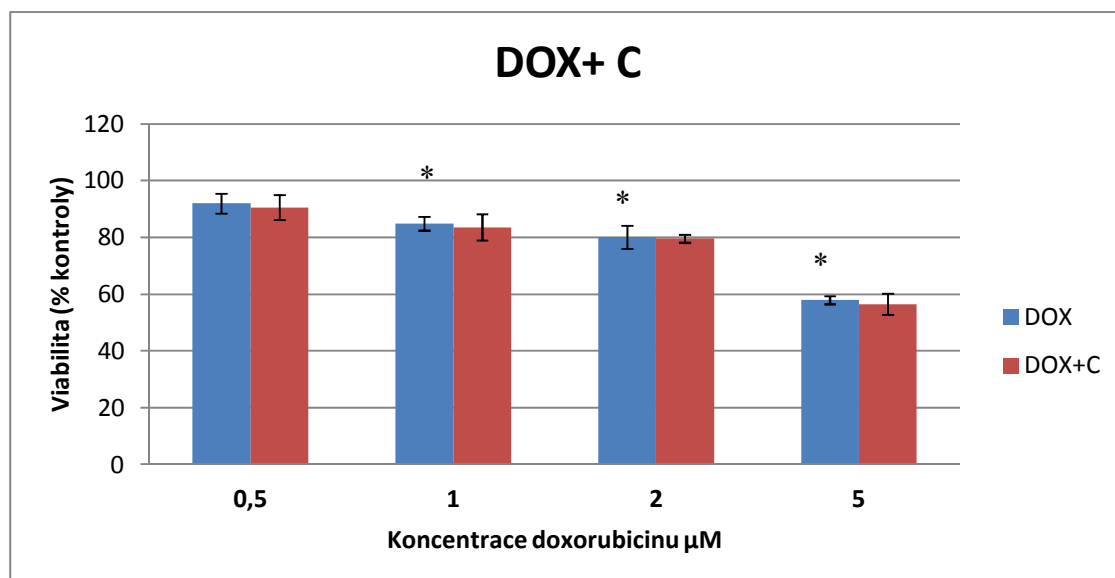
Experiment byl proveden dvakrát a to jednou při 24 hodinové expozici a jednou při 48 hodinové expozici. Kontrola, obsahující 0,1 % DMSO, byla nanesena na destičce v prvním sloupci. Každá látka, nebo dvojice látek byly testovány v celém sloupci mikrotitrační destičky tj. v šesti paralelních vzorcích. K vyhodnocení bylo využito barvení neutrální červení (NRU test). Test byl proveden podle návodu popsaného v kapitole 4.2.2. Výsledné hodnoty absorbance vzorků byly vztaženy k hodnotě absorbance kontroly, která představovala 100 %.

Výsledky pro 24 hodinovou expozici jsou uvedeny v tabulkách 7- 11 a na obrázcích 26-30.

Výsledky pro 48 hodinovou expozici jsou uvedeny v tabulkách 12-16 a na obrázcích 31-35.

**Tab. 7:** Vliv C na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+C 5 $\mu$ M	experiment
0,5 $\mu$ M	92 $\pm$ 3	0,5 $\mu$ M	90 $\pm$ 4
1 $\mu$ M	85 $\pm$ 2	1 $\mu$ M	83 $\pm$ 4
2 $\mu$ M	80 $\pm$ 4	2 $\mu$ M	79 $\pm$ 1
5 $\mu$ M	58 $\pm$ 1	5 $\mu$ M	56 $\pm$ 3



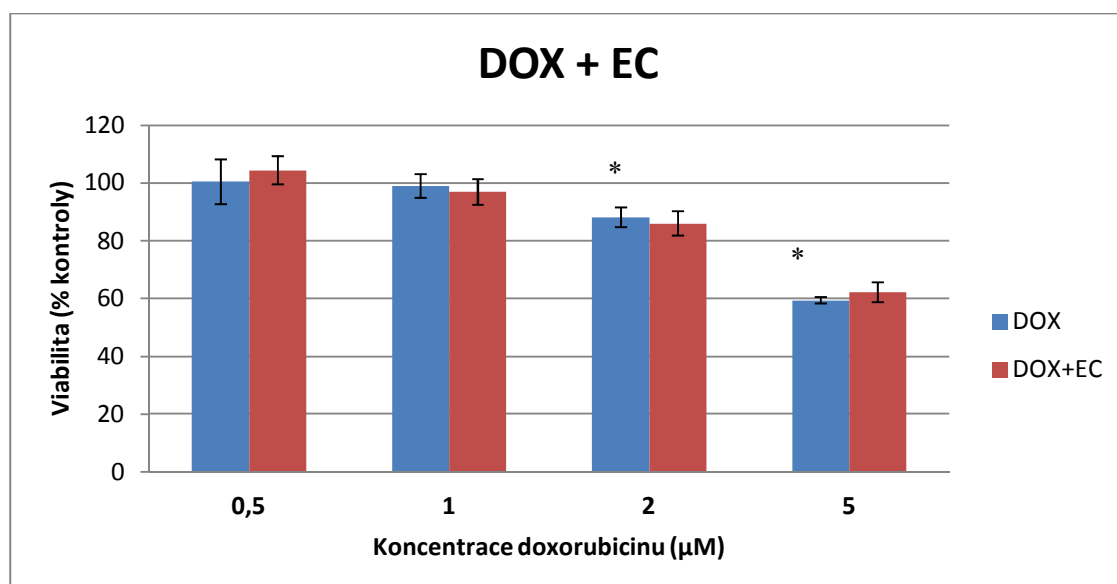
**Obr. 26:** Vliv C na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole



**Tab. 8:** Vliv EC na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+EC 5 $\mu$ M	experiment
0,5 $\mu$ M	100 $\pm$ 7	0,5 $\mu$ M	104 $\pm$ 5
1 $\mu$ M	99 $\pm$ 4	1 $\mu$ M	97 $\pm$ 4
2 $\mu$ M	88 $\pm$ 3	2 $\mu$ M	86 $\pm$ 4
5 $\mu$ M	59 $\pm$ 1	5 $\mu$ M	62 $\pm$ 3

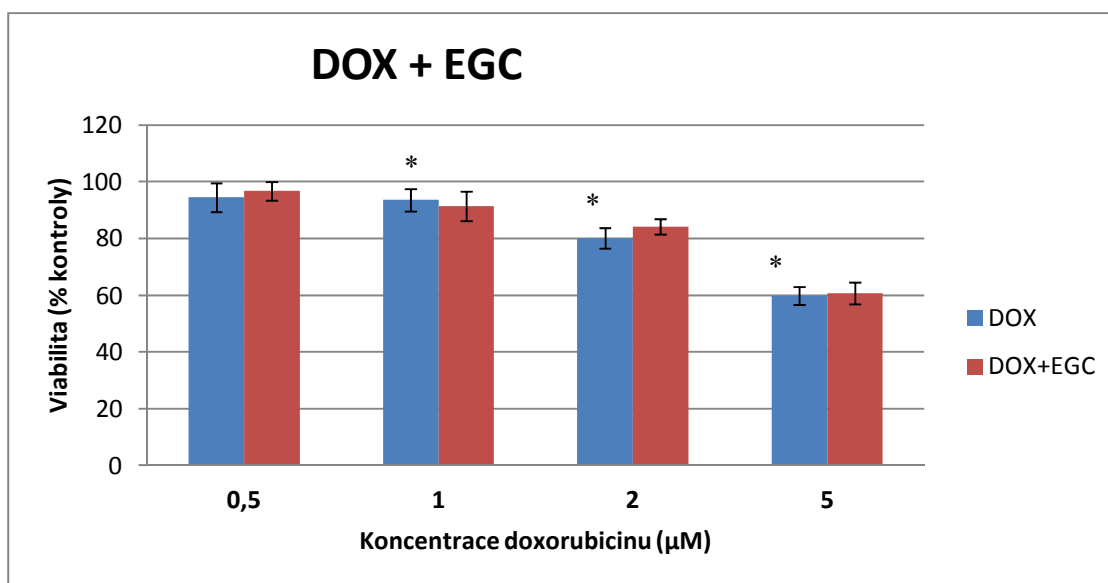


**Obr. 27:** Vliv EC na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

**Tab. 9:** Vliv EGC na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+EGC 5 $\mu$ M	experiment
0,5 $\mu$ M	94 $\pm$ 5	0,5 $\mu$ M	97 $\pm$ 3
1 $\mu$ M	93 $\pm$ 4	1 $\mu$ M	91 $\pm$ 5
2 $\mu$ M	80 $\pm$ 3	2 $\mu$ M	84 $\pm$ 2
5 $\mu$ M	60 $\pm$ 3	5 $\mu$ M	61 $\pm$ 4

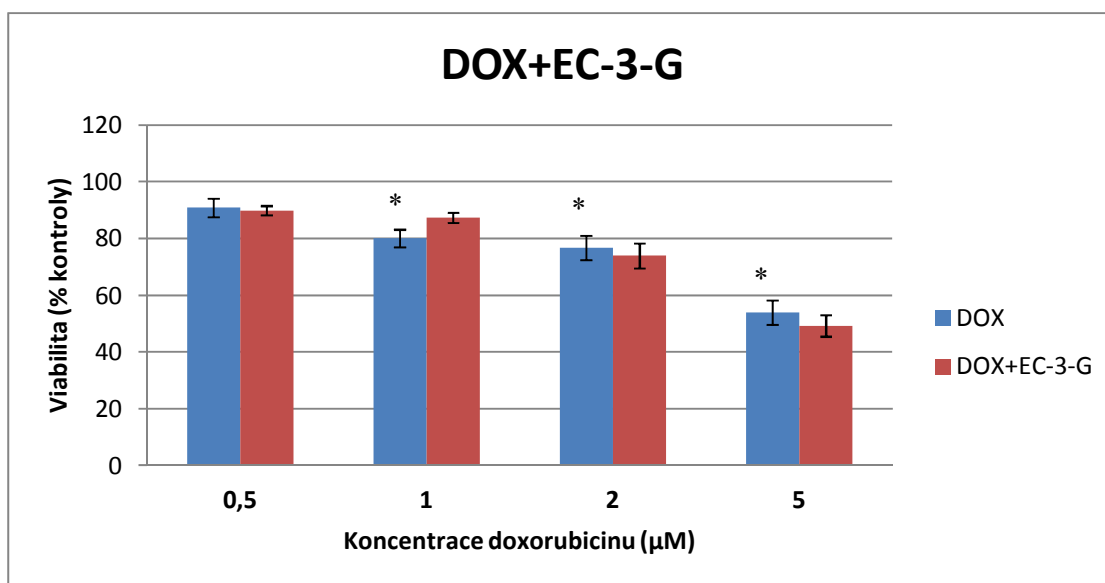


**Obr. 28:** Vliv EGC na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

**Tab. 10:** Vliv EC-3-G na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+EC-3-G 5 $\mu$ M	experiment
0,5 $\mu$ M	91 $\pm$ 3	0,5 $\mu$ M	90 $\pm$ 1
1 $\mu$ M	80 $\pm$ 3	1 $\mu$ M	87 $\pm$ 2
2 $\mu$ M	77 $\pm$ 4	2 $\mu$ M	74 $\pm$ 4
5 $\mu$ M	54 $\pm$ 4	5 $\mu$ M	49 $\pm$ 3

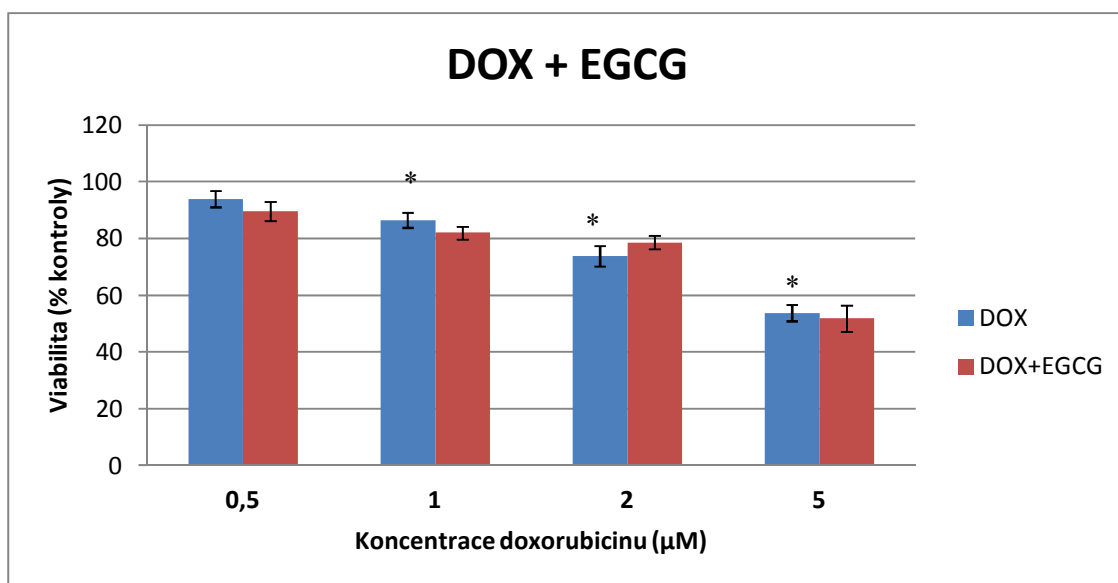


**Obr. 29:** Vliv EC-3-G na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

**Tab. 11:** Vliv EGCG na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+EGCG 5 $\mu$ M	experiment
0,5 $\mu$ M	94 $\pm$ 2	0,5 $\mu$ M	90 $\pm$ 3
1 $\mu$ M	86 $\pm$ 2	1 $\mu$ M	82 $\pm$ 2
2 $\mu$ M	74 $\pm$ 3	2 $\mu$ M	79 $\pm$ 2
5 $\mu$ M	54 $\pm$ 3	5 $\mu$ M	52 $\pm$ 4



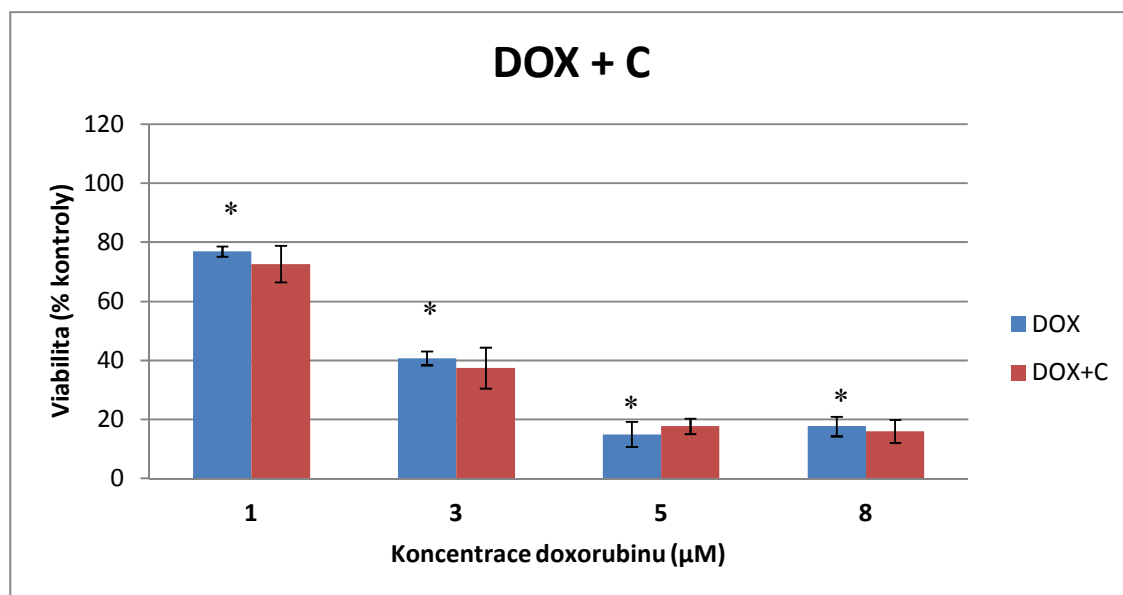
**Obr. 30:** Vliv EGCG na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

Z výsledků na obrázcích 26-30 vyplývá, že 24 hodinová expozice DOX již při koncentraci 1  $\mu$ M snižuje proliferaci buněčné linie HCT-8. Se zvyšující se koncentrací DOX proliferace buněk klesala. V jamkách s nejvyšší koncentrací DOX (5  $\mu$ M) byl počet buněk okolo 50 % ve srovnání s jamkami, kde buňky nebyly ovlivněné. Žádný z testovaných katechinů nesnižuje antiproliferativní vliv DOX na buněčnou linii HCT-8.

**Tab. 12:** Vliv C na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 48 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+C 5 $\mu$ M	experiment
1 $\mu$ M	77 $\pm$ 1	1 $\mu$ M	73 $\pm$ 6
3 $\mu$ M	41 $\pm$ 2	3 $\mu$ M	37 $\pm$ 7
5 $\mu$ M	15 $\pm$ 4	5 $\mu$ M	18 $\pm$ 2
8 $\mu$ M	18 $\pm$ 3	8 $\mu$ M	16 $\pm$ 4

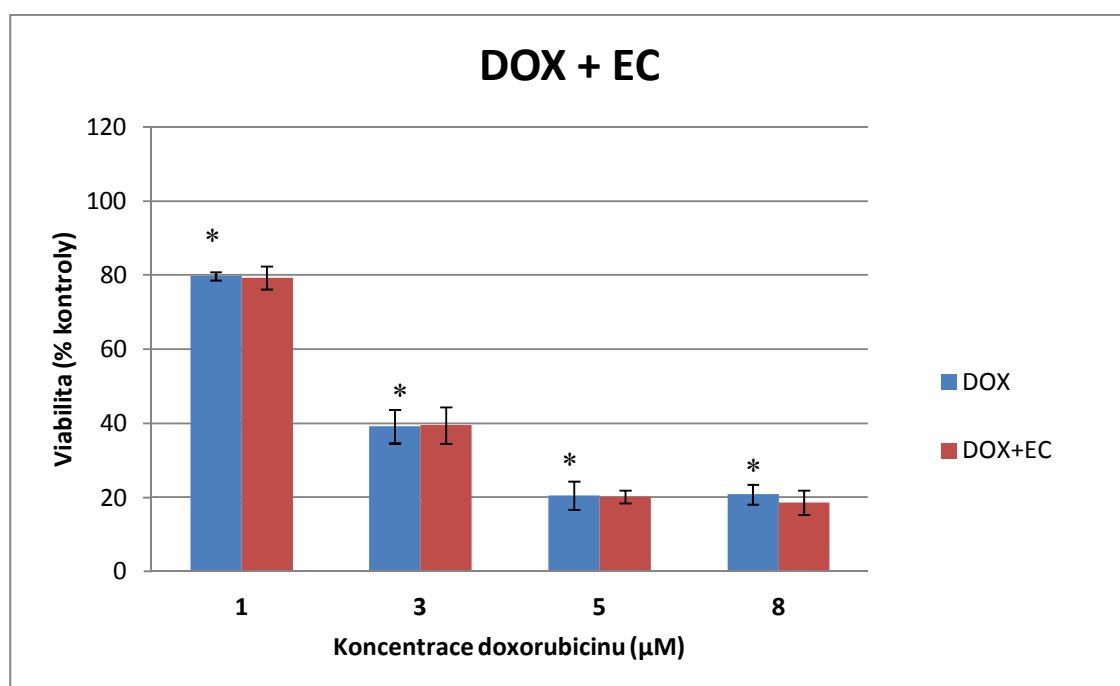


**Obr. 31:** Vliv C na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

**Tab. 13:** Vliv EC na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 48 hodin.

DOX	experiment	DOX+EC 5 $\mu$ M	experiment
1 $\mu$ M	80 $\pm$ 1	1 $\mu$ M	79 $\pm$ 3
3 $\mu$ M	39 $\pm$ 4	3 $\mu$ M	39 $\pm$ 5
5 $\mu$ M	20 $\pm$ 4	5 $\mu$ M	20 $\pm$ 2
8 $\mu$ M	21 $\pm$ 2	8 $\mu$ M	19 $\pm$ 3

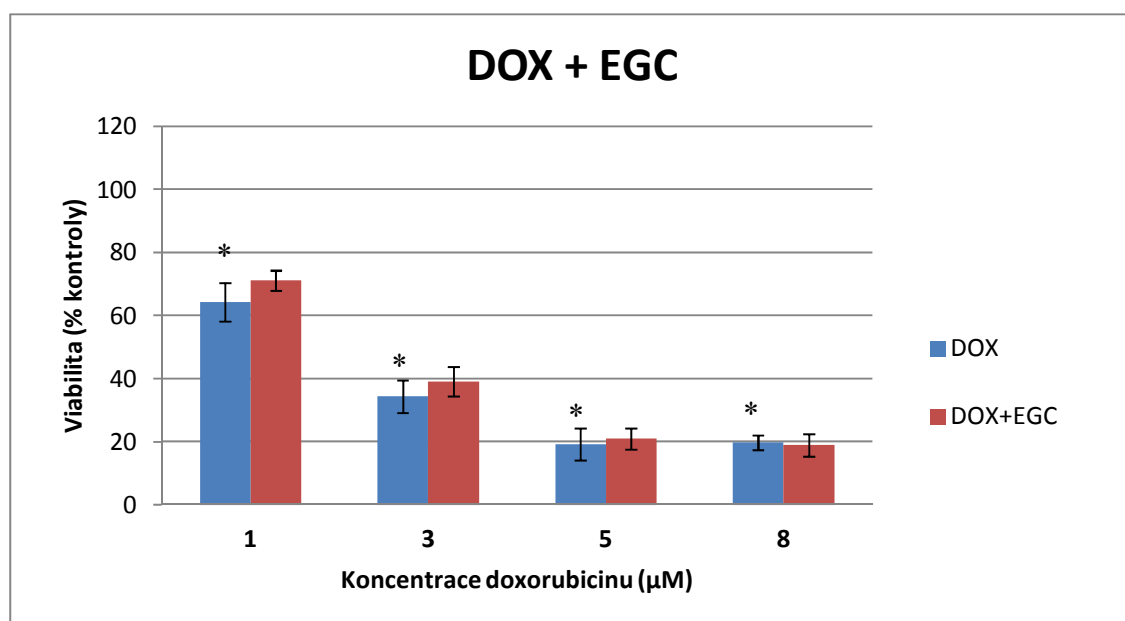


**Obr. 32:** Vliv EC na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

**Tab. 14:** Vliv EGC na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 48 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+EGC 5 $\mu$ M	experiment
1 $\mu$ M	64 $\pm$ 6	1 $\mu$ M	71 $\pm$ 3
3 $\mu$ M	34 $\pm$ 5	3 $\mu$ M	39 $\pm$ 4
5 $\mu$ M	19 $\pm$ 5	5 $\mu$ M	21 $\pm$ 3
8 $\mu$ M	20 $\pm$ 2	8 $\mu$ M	19 $\pm$ 3

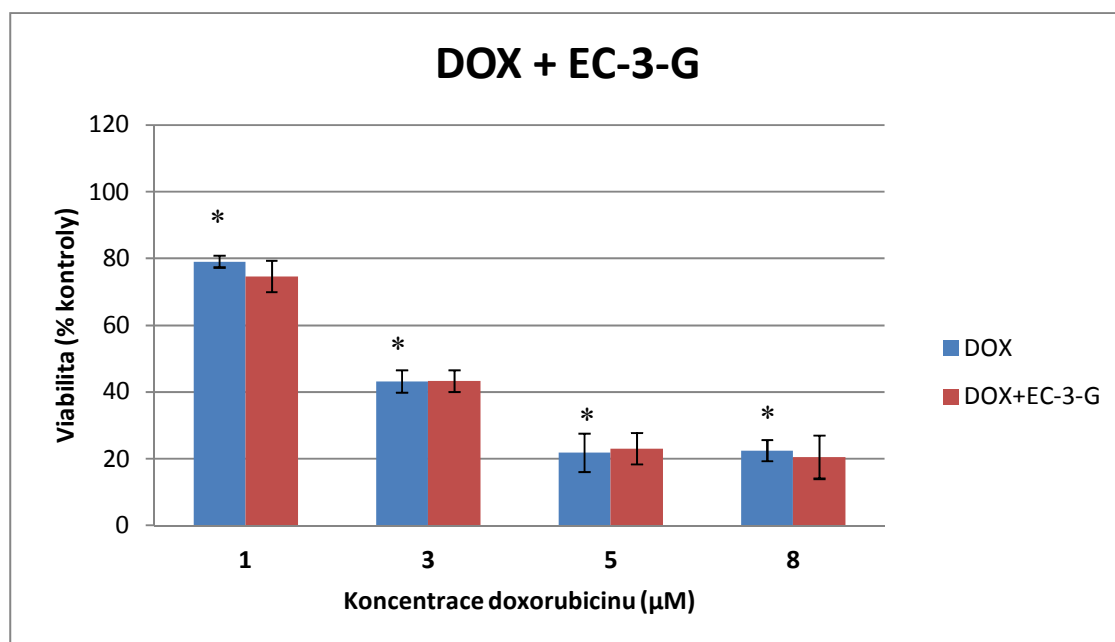


**Obr. 33:** Vliv EGC na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

**Tab. 15:** Vliv EC-3-G na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 48 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+EC-3-G 5 $\mu$ M	experiment
1 $\mu$ M	79 $\pm$ 2	1 $\mu$ M	75 $\pm$ 4
3 $\mu$ M	43 $\pm$ 3	3 $\mu$ M	43 $\pm$ 3
5 $\mu$ M	22 $\pm$ 5	5 $\mu$ M	23 $\pm$ 4
8 $\mu$ M	22 $\pm$ 3	8 $\mu$ M	20 $\pm$ 6



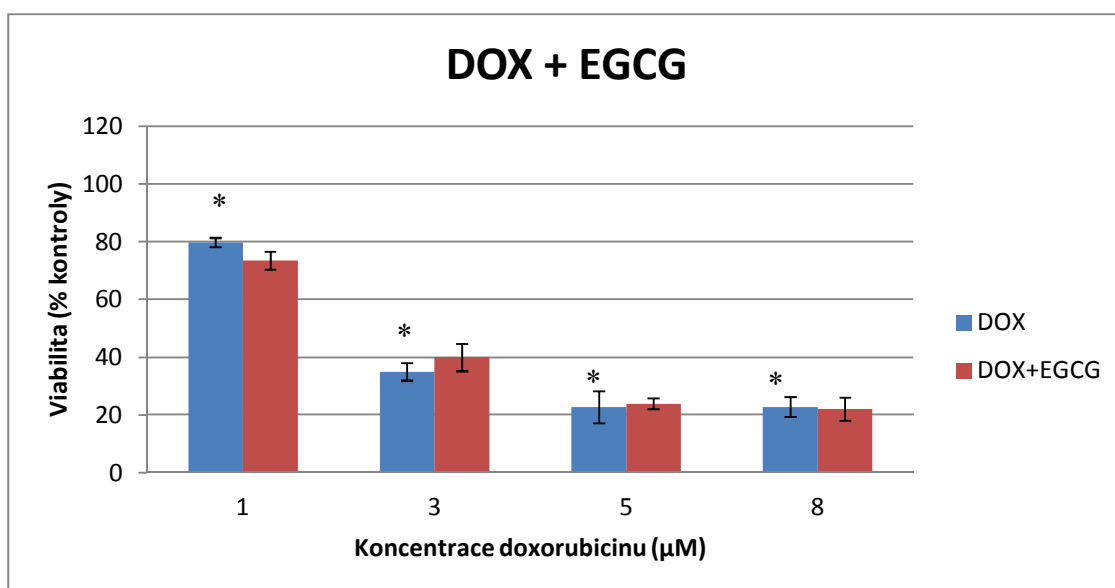
**Obr. 34:** Vliv EC-3-G na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole



**Tab. 16:** Vliv EGCG na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 48 hodin.

Viabilita HCT-8 (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+EGCG 5 $\mu$ M	experiment
1 $\mu$ M	80 $\pm$ 1	1 $\mu$ M	73 $\pm$ 3
3 $\mu$ M	35 $\pm$ 3	3 $\mu$ M	40 $\pm$ 4
5 $\mu$ M	23 $\pm$ 5	5 $\mu$ M	24 $\pm$ 2
8 $\mu$ M	23 $\pm$ 3	8 $\mu$ M	22 $\pm$ 4



**Obr. 35:** Vliv EGCG na antiproliferativní účinek DOX na buněčnou linii HCT-8

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

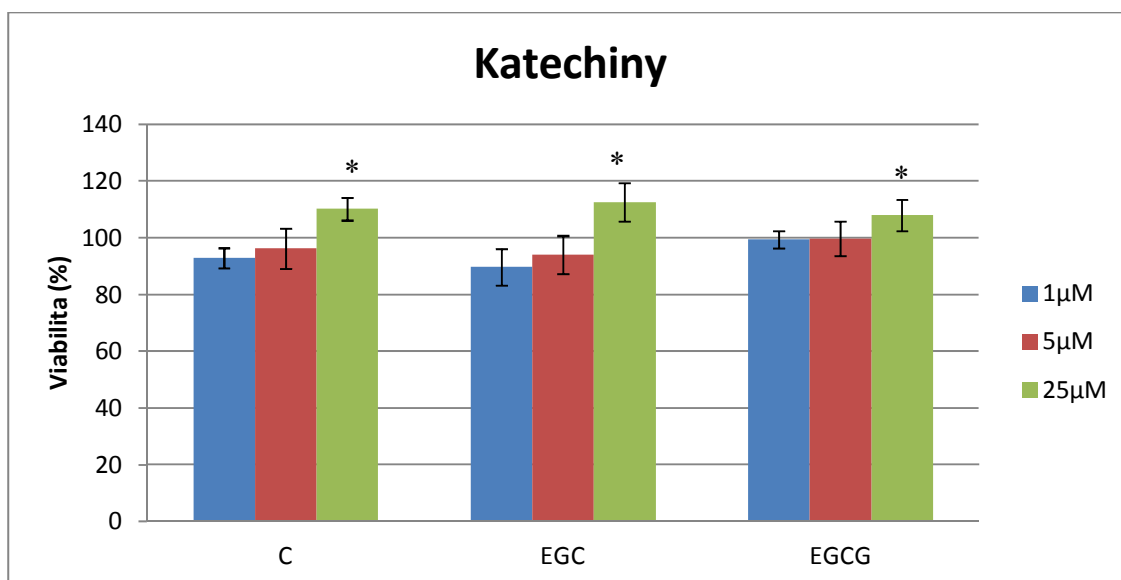
Výsledky na obrázcích 31-35 ukazují, že po 48 hodinové expozici DOX při koncentraci 1 $\mu$ M již výrazně snižuje proliferaci buněčné linie HCT-8 (na 80 % oproti kontrole). Se zvyšující se koncentrací DOX klesala proliferace buněk, při 8  $\mu$ M koncentraci DOX dosahovala pouze 20 % ve srovnání s kontrolou (bez DOX). Žádný z testovaných katechinů výrazně nezvyšuje antiproliferativní vliv DOX na buněčnou linii HCT-8.

### 5. 3 Testování vlivu katechinů na viabilitu hepatocytů

K testování viability byly použity: katechin (C), epigallokatechin (EGC), epigallokatechin gallát (EGCG) a Polyfenon E (POE). Katechiny byly použity v koncentracích 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ , POE v koncentracích 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ . Každá koncentrace byla nanášena do jednoho celého sloupce na mikrotitrační destičce tj. v šesti paralelních vzorcích. Kontrola byla nanášena na destičce do krajního sloupku a obsahovala 0,1 % DMSO, protože testované látky byly v DMSO rozpuštěny. Expozice trvala 24 hodin a pak následovalo vyhodnocení pomocí testu MTT. Test byl proveden podle návodu popsáního v kapitole 4.2.4. s každou látkou dvakrát. Výsledné hodnoty absorbance vzorků byly vztaženy k průměrné hodnotě absorbancí kontrol, která představovala 100 %. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 17 a 18 a na obrázcích 36 a 37.

**Tab. 17:** Vliv katechinů na viabilitu hepatocytů. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly ± směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita hepatocytů (%) ± SD (%)					
C	experiment	EGC	experiment	EGCG	experiment
<b>1μM</b>	93±3	<b>1μM</b>	90±6	<b>1μM</b>	99±3
<b>5μM</b>	96±7	<b>5μM</b>	94±6	<b>5μM</b>	100±6
<b>25μM</b>	110±4	<b>25μM</b>	113±6	<b>25μM</b>	108±5



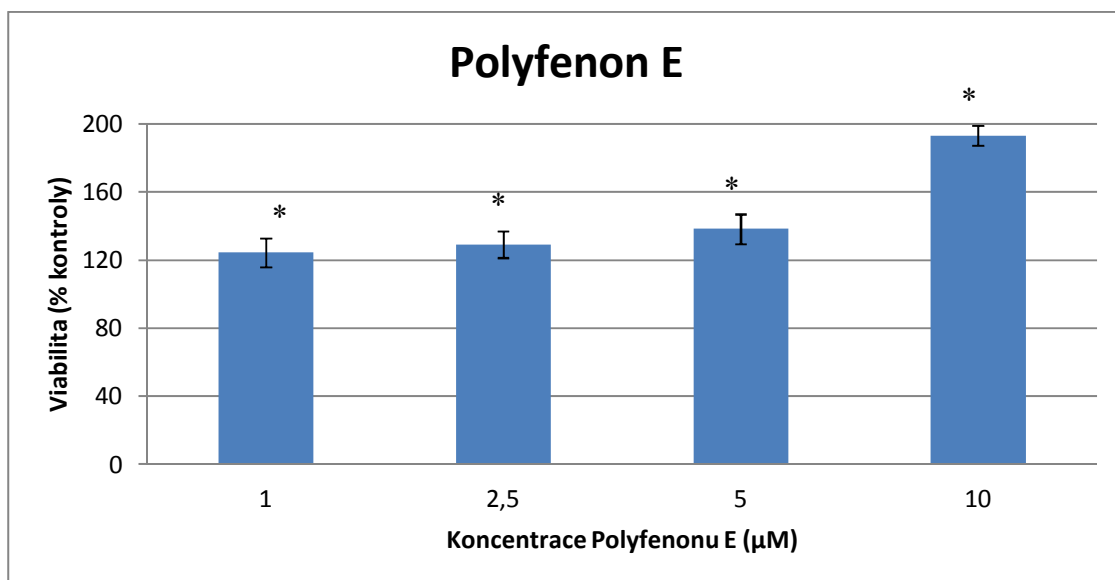
**Obr. 36:** Vliv katechinů na viabilitu hepatocytů

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

Testované katechiny o koncentraci 1 μM a 5 μM neměly protektivní vliv na viabilitu hepatocytů. Zvýšení životnosti se projevilo u všech katechinů při koncentraci 25 μM. Největší vliv vykazoval EGC, kdy se viabilita zvýšila na 113 %.

**Tab. 18:** Vliv POE na viabilitu hepatocytů. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly ± směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita hepatocytů (%) ± SD (%)	
Polyfenon E	experiment
1μM	124±8
2,5μM	129±7
5μM	138±8
10μM	193±5



**Obr. 37:** Vliv POE na viabilitu hepatocytů

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

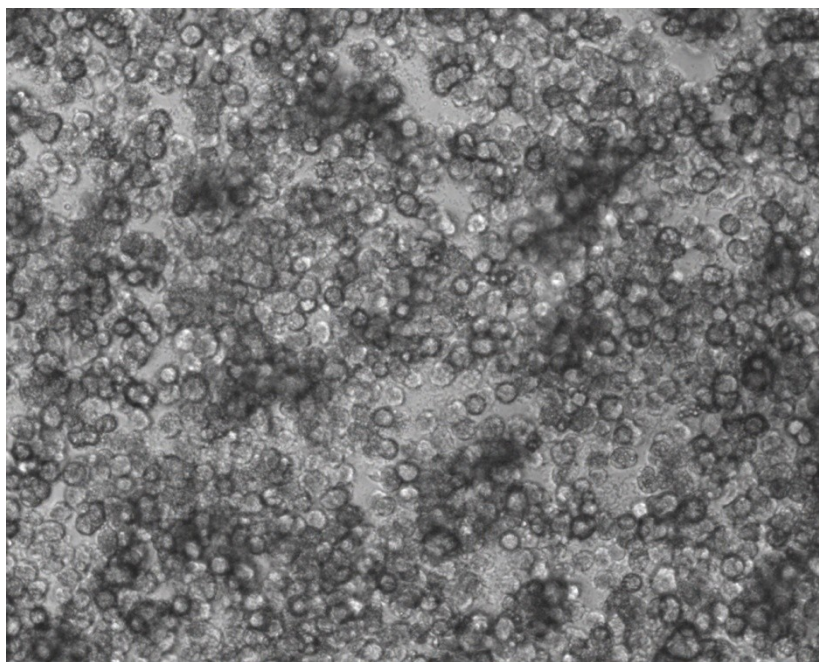
Zvýšení viability hepatocytů bylo pozorováno již od nejnižší použité koncentrace 0,1 μM, při které došlo ke zvýšení viability o 24 %. Se zvyšující se koncentrací viabilita stoupala. Nejvyšší vzestup viability byl pozorován u koncentrace 10 μM, kde viabilita stoupla až na 193 %.

## 5.4 Testování vlivu EGCG a POE na cytotoxicitu DOX

Hepatocyty byly vystaveny jak vlivu samotného DOX o koncentracích 10  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ , tak současně vlivu DOX (o koncentracích 10  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ ) a EGCG nebo POE. Využité koncentrace EGCG a POE byly 0,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ .

Vyhodnocení viability bylo provedeno po 24 hodinové expozici. Každá látka, nebo dvojice látek byly testovány v celém sloupci mikrotitrační destičky tj. v šesti paralelních vzorcích. Pozitivní kontrola obsahovala 0,1 % DMSO a byla nanesena na destičce v prvním sloupci. Jako negativní kontrola byl použit 2 % Triton X100 a na destičku byl nanesen do druhého sloupce. K vyhodnocení byl využit test MTT. Test byl proveden podle návodu popsaného v kapitole 4.2.4. Výsledné hodnoty absorbance vzorků byly vztaženy k hodnotě absorbance pozitivní kontroly, která představovala 100 %.

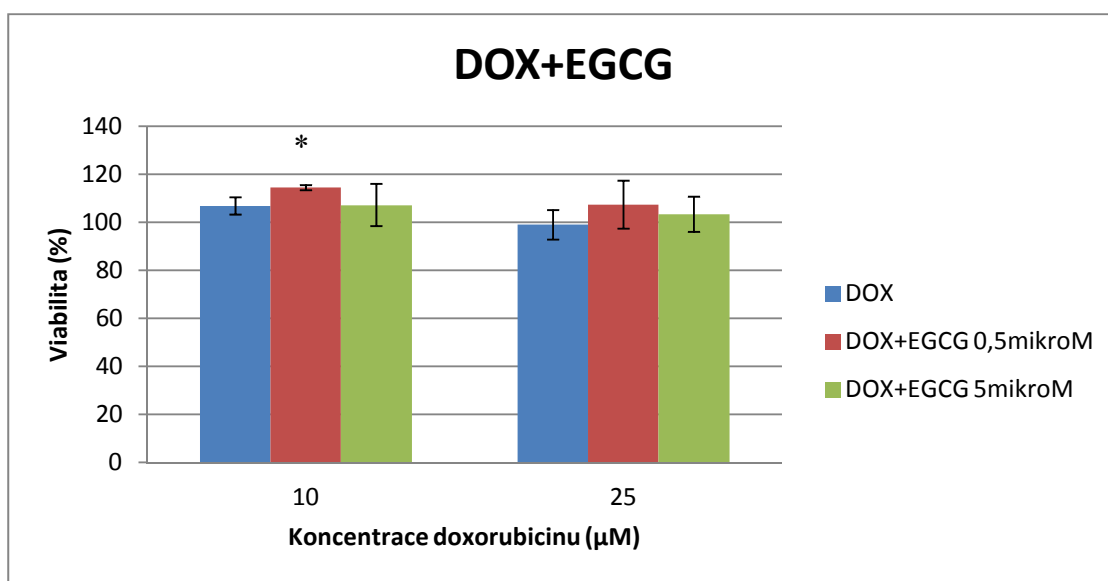
Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 19 a 20 a na obrázcích 38- 46. Na obrázcích 38 a 40-43 a 45 a 46 jsou hepatocyty vyfoceny pod mikroskopem.



**Obr. 38:** Neovlivněné hepatocyty (24 hod)

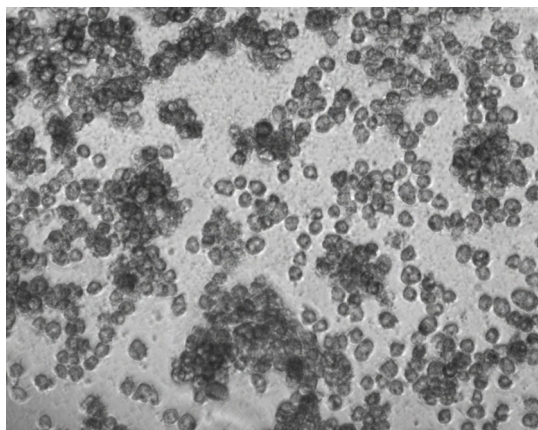
**Tab. 19:** Vliv 0,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$  EGCG na toxicitu DOX na hepatocyty. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita hepatocytů (%) $\pm$ SD (%)			
DOX	experiment	DOX+EGCG 0,5 $\mu\text{M}$	experiment
10 $\mu\text{M}$	107 $\pm$ 4	10 $\mu\text{M}$	114 $\pm$ 1
25 $\mu\text{M}$	100 $\pm$ 6	25 $\mu\text{M}$	107 $\pm$ 9
		DOX+EGCG 5 $\mu\text{M}$	experiment
		10 $\mu\text{M}$	107 $\pm$ 8
		25 $\mu\text{M}$	103 $\pm$ 7

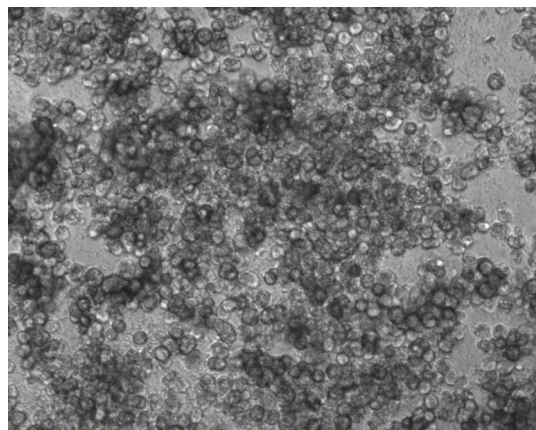


**Obr. 39:** Vliv 0,5  $\mu\text{M}$  a 5 $\mu\text{M}$  EGCG na toxicitu DOX na hepatocyty

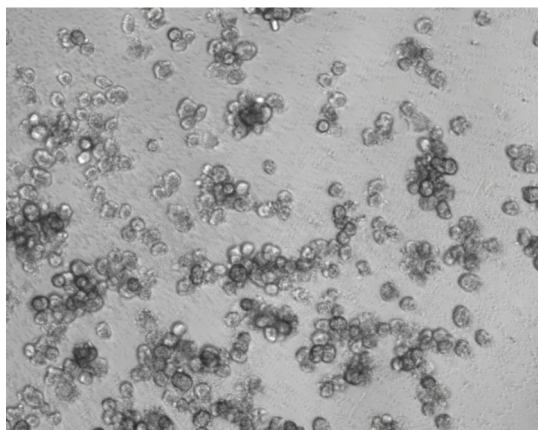
\* statisticky významný rozdíl proti samotnému DOX



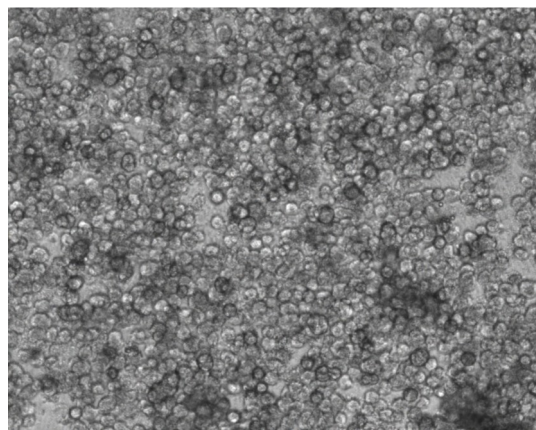
**Obr. 40:** Hepatocyty + 10 μM DOX



**Obr. 41:** Hepatocyty +10 μM DOX+  
5 μM EGCG



**Obr. 42:** Hepatocyty + 25 μM DOX

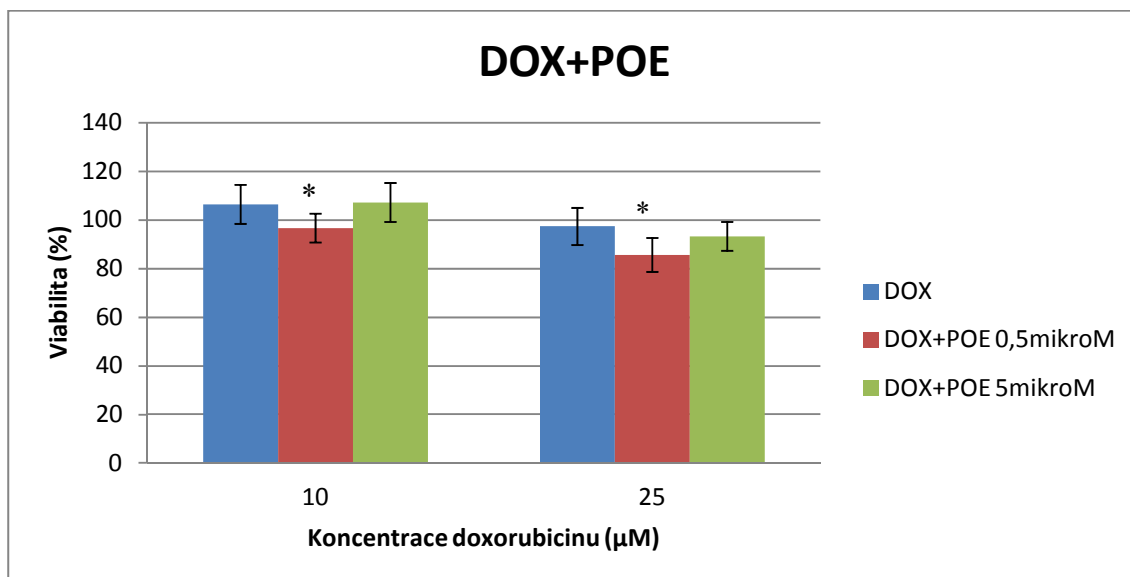


**Obr. 43:** Hepatocyty + 25 μM DOX+  
5 μM EGCG

Výsledky ukazují, že DOX v koncentracích 10 μM a 25 μM působí na hepatocyty toxicky. U koncentrace 10 μM DOX se projevilo zvýšení viability buněk na 114 % po přidání 0,5 μM EGCG. Po přidání 5 μM EGCG k hepatocytům ovlivněných DOX se projevilo protektivní účinek EGCG na toxicitu DOX na hepatocyty, jak je vidět na obrázcích 40- 43.

**Tab. 20:** Vliv 0,5 $\mu$ M a 5 $\mu$ M POE na toxicitu DOX na hepatocyty. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

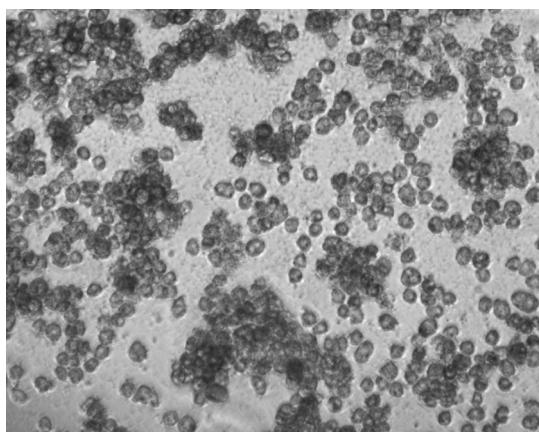
Viabilita hepatocytů (%) $\pm$ SD (%)					
DOX	experiment	DOX+POE 0,5 $\mu$ M	experiment	DOX+POE 5 $\mu$ M	experiment
10 $\mu$ M	106 $\pm$ 8	10 $\mu$ M	96 $\pm$ 6	10 $\mu$ M	107 $\pm$ 8
25 $\mu$ M	97 $\pm$ 7	25 $\mu$ M	86 $\pm$ 7	25 $\mu$ M	93 $\pm$ 6



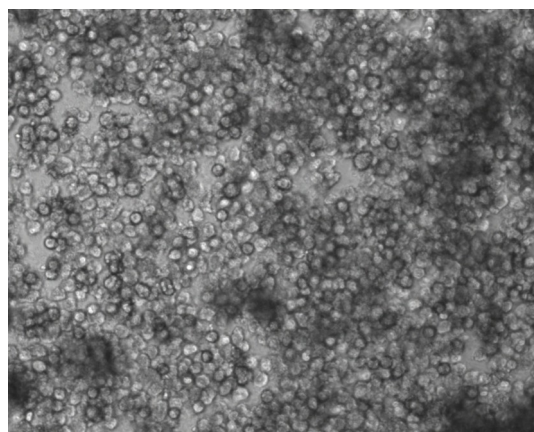
**Obr. 44:** Vliv 0,5 $\mu$ M a 5 $\mu$ M POE na toxicitu DOX na hepatocyty

\* statisticky významný rozdíl proti samotnému DOX

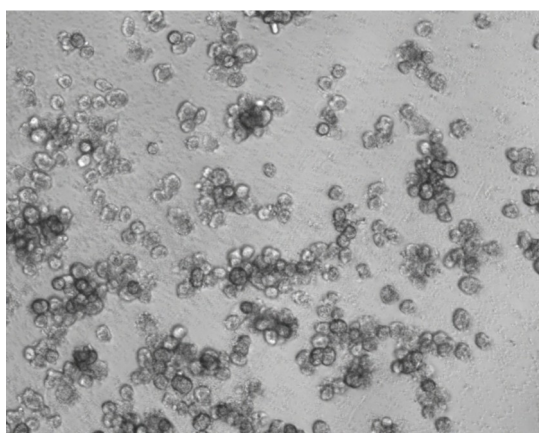




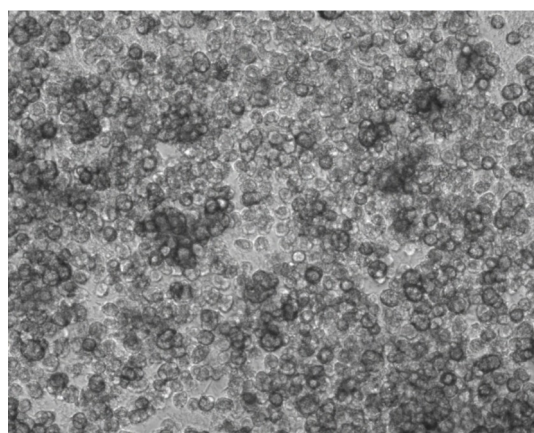
**Obr. 40:** Hepatocyty + 10μM DOX



**Obr. 45:** Hepatocyty + 10μM DOX+  
5μM POE



**Obr. 42:** Hepatocyty + 25 μM DOX



**Obr. 46:** Hepatocyty + 25μM DOX+  
5μM POE

Výsledky ukazují, že DOX v koncentracích 10 μM a 25 μM působí na hepatocyty toxicky. Po přidání 0,5 μM POE se viabilita snížila u obou koncentrací zhruba o 10 % oproti samotnému DOX. Po přidání 5 μM POE k hepatocytům ovlivněným DOX se projevil protektivní účinek POE na toxicitu DOX na hepatocyty, jak je vidět na obrázcích 40, 42, 45 a 46.

## 5.5 Testování vlivu EGC, EGCG a POE na cytotoxicitu PARA

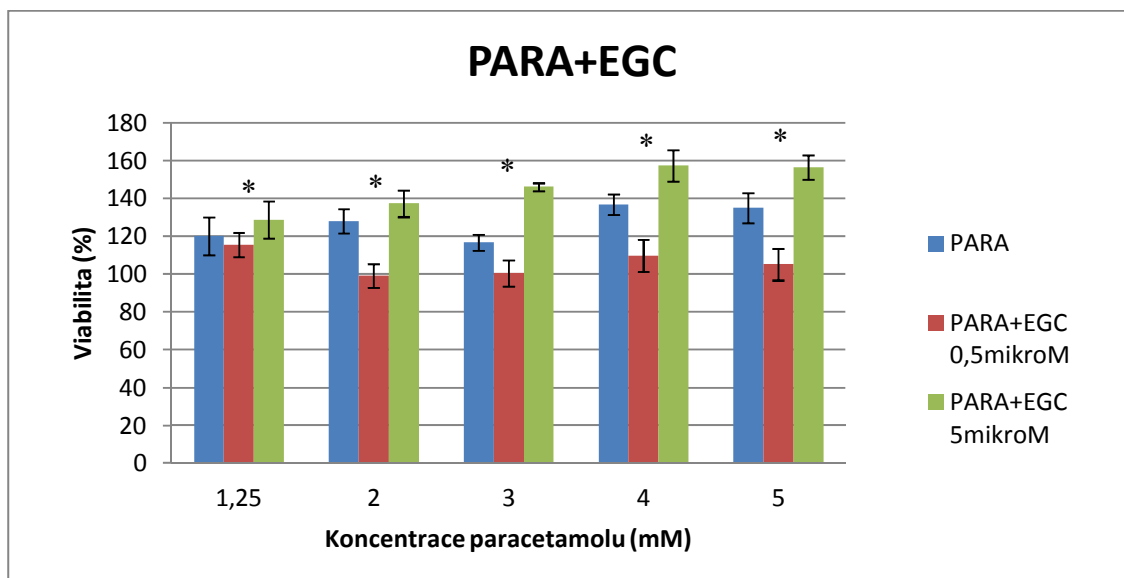
Hepatocyty byly vystaveny jak samotnému vlivu paracetamolu (PARA) o různých koncentracích, tak současně vlivu PARA a EGC, EGCG nebo POE. Použité koncentrace EGC, EGCG a POE byly 0,5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M.

Expozice trvala 24 hodin. Každá látka, nebo dvojice látek byly testovány v celém sloupci mikrotitrační destičky tj. v šesti paralelních vzorcích. Pozitivní kontrola obsahovala 0,1 % DMSO a byla nanášena na destičku v prvním sloupci. Jako negativní kontrola bylo použito 10 % DMSO a na destičku byl nanášen do druhého sloupce. K vyhodnocení byl využit test MTT. Test byl proveden podle návodu popsaného v kapitole 4.2.4. Výsledné hodnoty absorbance vzorků byly vztaženy k hodnotě absorbance pozitivní kontroly, která představovala 100 %.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 21- 23 a na obrázcích 47- 49.

**Tab. 21:** Vliv EGC na cytotoxicitu PARA na hepatocyty. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

<b>Viabilita hepatocytů (%) <math>\pm</math> SD (%)</b>					
<b>PARA</b>	experiment	<b>PARA+EGC 0,5<math>\mu</math>M</b>	experiment	<b>PARA+EGC 5<math>\mu</math>M</b>	experiment
<b>1,25mM</b>	120 $\pm$ 9	<b>1,25mM</b>	115 $\pm$ 6	<b>1,25mM</b>	129 $\pm$ 9
<b>2mM</b>	128 $\pm$ 6	<b>2mM</b>	99 $\pm$ 6	<b>2mM</b>	137 $\pm$ 7
<b>3mM</b>	117 $\pm$ 4	<b>3mM</b>	100 $\pm$ 7	<b>3mM</b>	146 $\pm$ 2
<b>4mM</b>	137 $\pm$ 5	<b>4mM</b>	110 $\pm$ 8	<b>4mM</b>	157 $\pm$ 8
<b>5mM</b>	135 $\pm$ 7	<b>5mM</b>	105 $\pm$ 8	<b>5mM</b>	156 $\pm$ 6



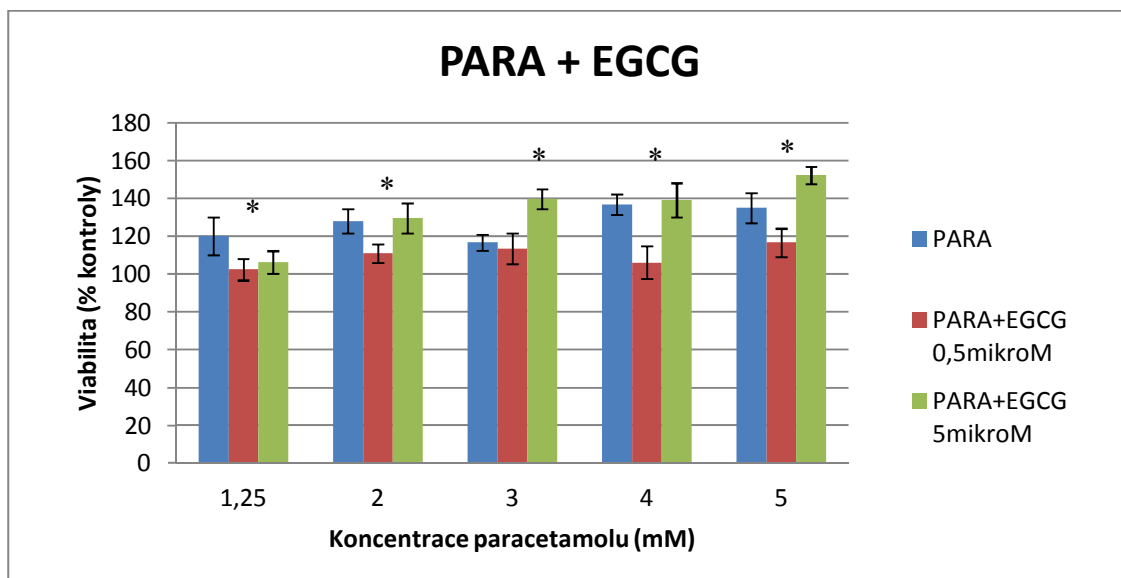
**Obr. 47:** Vliv 0,5 $\mu$ M a 5 $\mu$ M EGC na cytotoxicitu PARA na hepatocyty

\* statisticky významný rozdíl proti samotnému PARA

Samotný PARA způsobil zvýšení viability hepatocytů už při nejnižší použité koncentraci 1,25 mM, při které byla viabilita 120 %. Po přidání 0,5  $\mu$ M EGC se viabilita snížila v průměru o 15 % oproti samotnému PARA. Naopak po přidání 5  $\mu$ M EGC se viabilita o 15 %, oproti samotnému PARA, zvýšila.

**Tab. 22:** Vliv EGCG na cytotoxicitu PARA na hepatocyty. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita hepatocytů (%) $\pm$ SD (%)					
PARA	experiment	PARA+EGCG 0,5 $\mu$ M	experiment	PARA+EGCG 5 $\mu$ M	experiment
1,25mM	120 $\pm$ 9	1,25mM	102 $\pm$ 6	1,25mM	106 $\pm$ 6
2mM	128 $\pm$ 6	2mM	111 $\pm$ 5	2mM	130 $\pm$ 7
3mM	117 $\pm$ 4	3mM	113 $\pm$ 8	3mM	140 $\pm$ 5
4mM	137 $\pm$ 5	4mM	106 $\pm$ 8	4mM	139 $\pm$ 9
5mM	135 $\pm$ 7	5mM	117 $\pm$ 7	5mM	152 $\pm$ 4



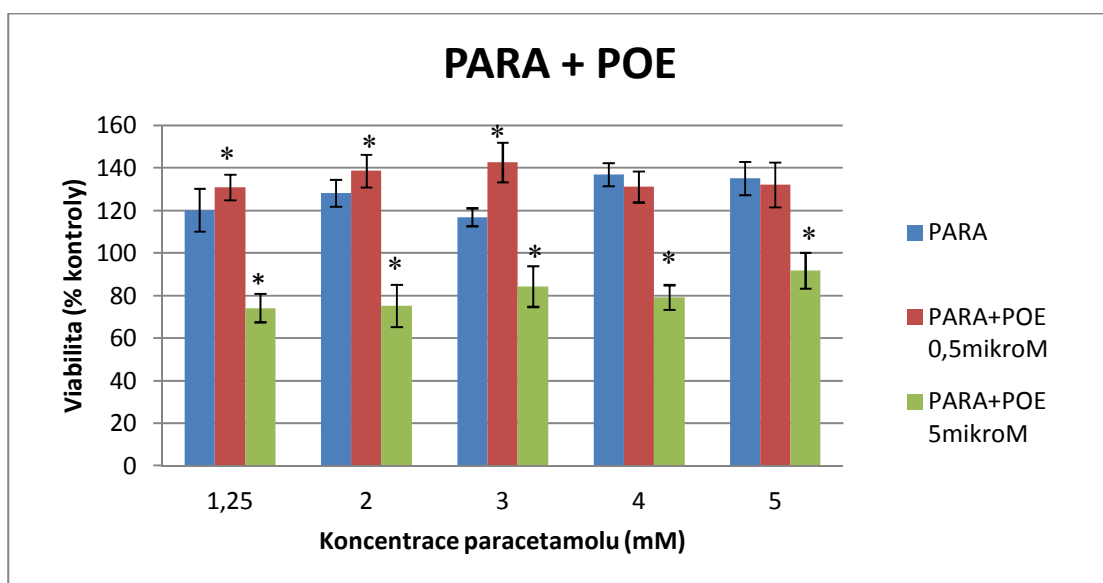
**Obr. 48:** Vliv 0,5 $\mu$ M a 5 $\mu$ M EGCG na cytotoxicitu PARA na hepatocyty

\* statisticky významný rozdíl proti samotnému PARA

Samotný PARA způsobil zvýšení viability hepatocytů už při nejnižší použité koncentraci 1,25 mM, při které byla viabilita 120 %. Po přidání 0,5  $\mu$ M EGCG se viabilita snížila v průměru o 15 % oproti samotnému PARA. Naopak po přidání 5  $\mu$ M EGCG se viabilita o 10 %, oproti samotnému PARA, zvýšila. Pouze u 1,25  $\mu$ M PARA došlo po přidání 5  $\mu$ M EGCG ke snížení viability o 14 % na 106 %.

**Tab. 23:** Vliv POE na cytotoxicitu PARA pro hepatocyty. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly  $\pm$  směrodatná odchylka v %. Doba expozice 24 hodin.

Viabilita hepatocytů (%) $\pm$ SD (%)					
PARA	experiment	PARA+POE 0,5 $\mu$ M	experiment	PARA+POE 5 $\mu$ M	experiment
1,25mM	120 $\pm$ 9	1,25mM	131 $\pm$ 6	1,25mM	74 $\pm$ 6
2mM	128 $\pm$ 6	2mM	139 $\pm$ 8	2mM	75 $\pm$ 9
3mM	117 $\pm$ 4	3mM	142 $\pm$ 9	3mM	84 $\pm$ 9
4mM	137 $\pm$ 5	4mM	131 $\pm$ 7	4mM	79 $\pm$ 6
5mM	135 $\pm$ 7	5mM	132 $\pm$ 10	5mM	92 $\pm$ 8



**Obr. 49:** Vliv 0,5 $\mu$ M a 5 $\mu$ M POE na cytotoxicitu PARA pro hepatocyty

\* statisticky významný rozdíl proti samotnému PARA

Samotný PARA způsobil zvýšení viability hepatocytů už při nejnižší použité koncentraci 1,25 mM, při které byla viabilita 120 %. Po přidání 0,5  $\mu$ M POE se viabilita zvýšila v průměru o 10 %, oproti samotnému PARA, u koncentrací 1,25  $\mu$ M, 2  $\mu$  a 3  $\mu$ M. U 4  $\mu$ M a 5  $\mu$ M nedošlo k ovlivnění viability. Naopak po přidání 5  $\mu$ M POE došlo k výraznému poklesu viability hepatocytů v průměru o 40 % oproti samotnému PARA.

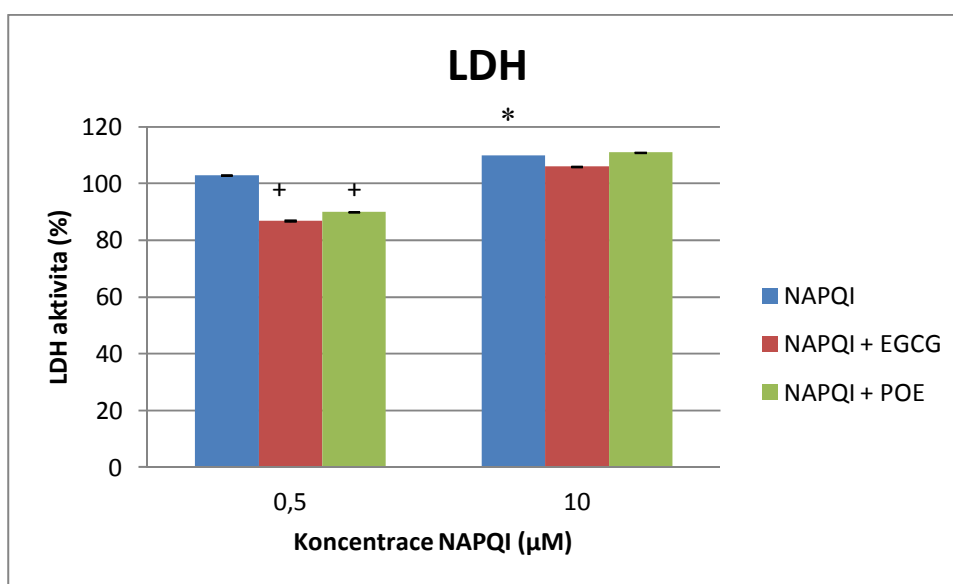
## 5. 6 Testování vlivu EGCG a POE na cytotoxicitu NAPQI

Hepatocyty byly vystaveny různým kombinacím NAPQI, EGCG a POE. Použité koncentrace byly NAPQI 0,5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ , EGCG 0,5  $\mu\text{M}$  a POE 0,5  $\mu\text{M}$ . Nasazení na destičky bylo provedeno podle schéma uvedeného v kapitole 4.2.5.1. Každá látka, nebo dvojice látek byly testovány v celém sloupci mikrotitrační destičky tj. v šesti paralelních vzorcích. Jako kontrola bylo použito 0,1 % DMSO a na destičku byla nanesena do druhého sloupce. Ke stanovení cytotoxicity byla využita metoda LDH. Test byl proveden podle návodu popsaného v kapitole 4.2.5. Výsledné hodnoty vzorků byly vztaženy k hodnotě kontroly, která představovala 100 %.

Výsledky jsou uvedeny na obrázku 50 a v tabulce 24.

**Tab. 24:** Vliv EGCG a POE na cytotoxicitu NAPQI

LDH aktivita (%)			
NAPQI	experiment	NAPQI+EGCG	experiment
<b>0,5<math>\mu</math>M</b>	103 $\pm$ 0	<b>0,5<math>\mu</math>M</b>	87 $\pm$ 0
<b>10<math>\mu</math>M</b>	110 $\pm$ 0	<b>10<math>\mu</math>M</b>	106 $\pm$ 0
		NAPQI+POE	experiment
		<b>0,5<math>\mu</math>M</b>	90 $\pm$ 0
		<b>10<math>\mu</math>M</b>	111 $\pm$ 0



**Obr. 50:** Vliv 0,5 $\mu$ M EGCG a 0,5 $\mu$ M POE na cytotoxicitu NAPQI

\* statisticky významný rozdíl proti kontrole

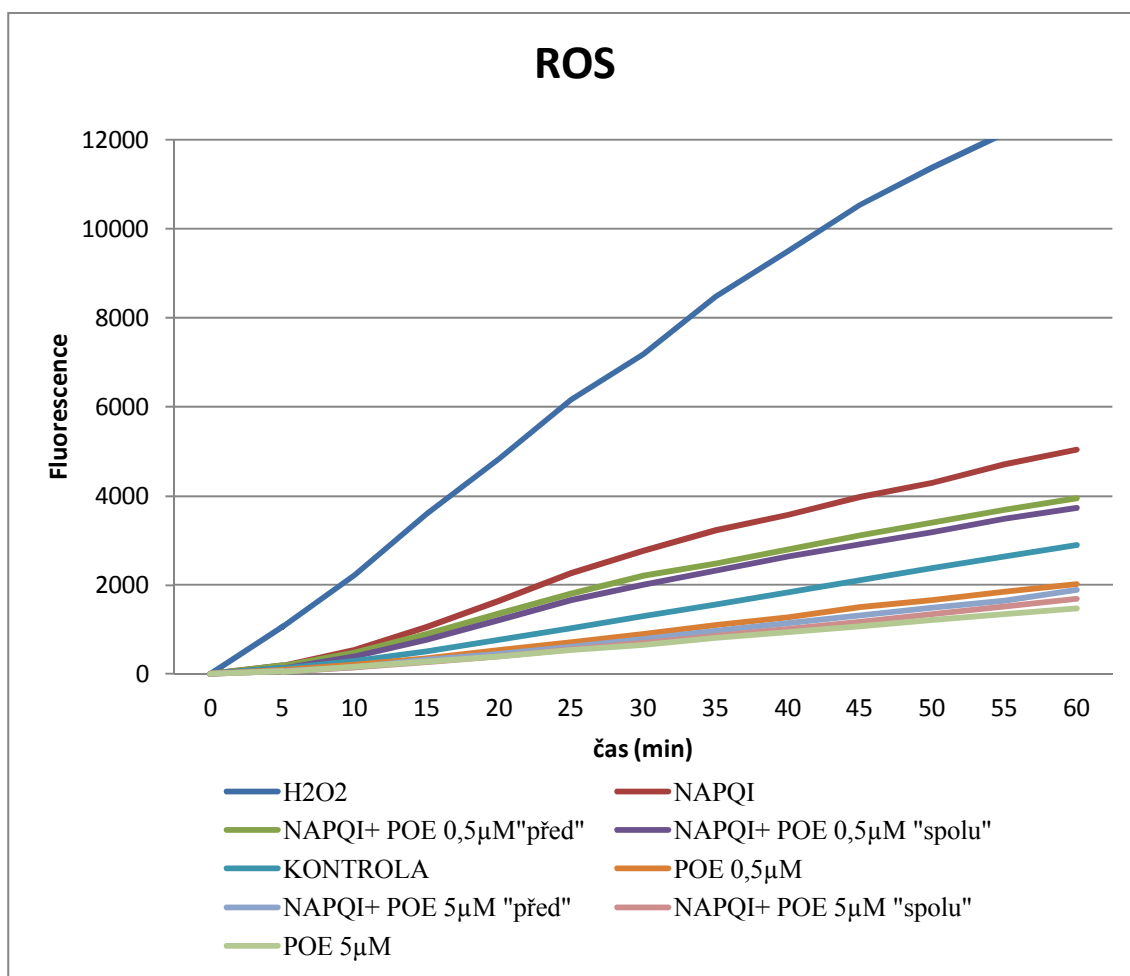
+ statisticky významný rozdíl proti samotnému NAPQI

NAPQI byl pro hepatocyty toxický při koncentraci 10  $\mu$ M, kdy se hodnota absorbance zvýšila o 10 % oproti kontrole (bez NAPQI). Přidání EGCG a POE k 0,5  $\mu$ M NAPQI se projevilo zvýšením viability zhruba o 15 %. U koncentrace 10  $\mu$ M NAPQI neměl EGCG ani POE vliv na jeho toxicitu.

## 5.7 Detekce oxidačního stresu

Hepatocyty byly vystaveny různým kombinacím NAPQI a POE. Použité koncentrace byly NAPQI 10  $\mu\text{M}$  a POE 0,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ . Nasazení na destičky bylo provedeno podle schéma uvedeného v kapitole 4.2.6.2. Každá látka, nebo kombinace látek, byla testována v celém sloupci mikrotitrační destičky tj. v šesti paralelních vzorcích. Pozitivní kontrola obsahovala  $\text{H}_2\text{O}_2$  a byla nanášena na destičce v druhém sloupci. Jako negativní kontrola byly použity hepatocyty pouze s 0,1 % DMSO. Test byl proveden podle návodu popsání v kapitole 4.2.6., měření probíhalo po dobu 60 minut. Nárůst fluorescence je přímo úměrný produkci ROS. Experiment byl proveden dvakrát.

Na obrázku 51 je znázorněn nárůst fluorescence po dobu 60 minut. Porovnání oxidačního stresu v 60 minutě měření ukazuje tabulka 25 a obrázek 52.

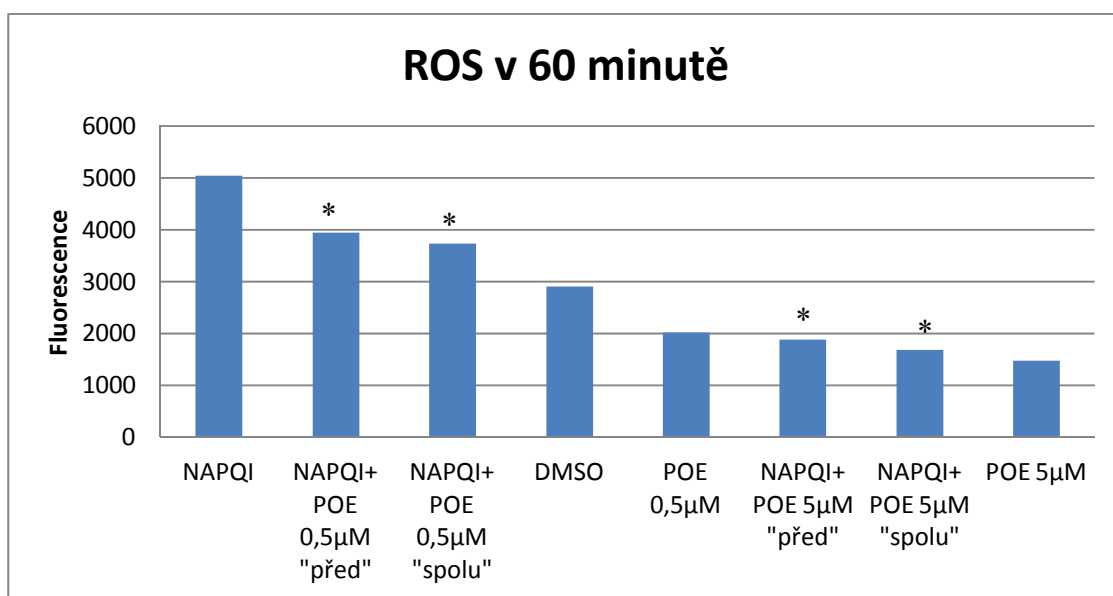


**Obr. 51:** Nárůst fluorescence v závislosti na tvorbě ROS u hepatocytů



**Tab. 25:** Oxidační stres hepatocytů v 60 minutě měření.

	ROS 60min
NAPQI	5036,5
NAPQI+ POE 0,5μM "před"	3943,3
NAPQI+ POE 0,5μM "spolu"	3729,2
KONTROLA	2906,8
POE 0,5μM	2019,6
NAPQI+ POE 5μM "před"	1888,3
NAPQI+ POE 5μM "spolu"	1686,0
POE 5μM	1482,5



**Obr. 52:** Oxidační stres hepatocytů v 60 minutě měření.

\* statisticky významný rozdíl proti samotnému NAPQI

Nejvyšší nárůst fluorescence a s ní spojenou produkci ROS vykazoval vzorek se samotným NAPQI. Po přidání 0,5 μM POE k NAPQI byla fluorescence výrazně snížena. Zda byl POE přidán k hepatocytům 30 minut „před“ nebo až současně („spolu“) s NAPQI, nemělo na produkci ROS téměř žádný vliv. Fluorescence byla

snížena více jak o polovinu po přidání 5  $\mu\text{M}$  POE k NAPQI. I zde nehrála žádnou roli 30-ti minutová preinkubace POE s hepatocyty. Nejnižší produkci ROS vykazoval vzorek obsahující pouze 5  $\mu\text{M}$  POE.

## 6 DISKUZE

První písemné zmínky o čaji pochází z let asi 3000 př. n. l., i když se čaj nepochybně užíval i dříve. Rostlina, z níž se čaj vyrábí, čajovník čínský neboli *Camellia sinensis*, se pěstuje ve více než třiceti zemích světa, zejména v Číně, Japonsku, Indii a na Srí Lance (Mitscher and Dolby 2006). Při výrobě prochází čajové lístky složitým procesem zpracování, kdy jsou více, či méně vystaveny oxidaci. V závislosti na procesu se podle stupně fermentace rozlišuje několik druhů čaje. Během procesu oxidace dochází ke změnám látek obsažených v čaji. To je vysvětlením, proč se zelený čaj liší svým účinkem i chutí od čaje černého. Z celkové roční produkce sušeného čaje připadá asi dvacet procent na čaj zelený, téměř dvě procenta na oolong a sedmdesát osm procent na čaj černý (Mitscher and Dolby 2006).

V současnosti je známo kolem 400 nejrůznějších látek obsažených v čajovém listě (Oppliger 2000). Mezi nejvýznamnější biologicky účinné látky obsažené v čaji patří polyfenoly (flavonoidy, katechiny), purinové alkaloidy (kofein), třísloviny, silice, vitaminy a své místo zaujímají i anorganické látky. Polyfenoly jsou sloučeniny přirozeně se vyskytující v čaji. Vytváří jeho typickou vůni a svíravou chuť. Nejvýznamnějšími polyfenoly čaje jsou katechiny (Mitscher and Dolby 2006).

Jeden z nejzajímavějších výzkumů naznačuje, že pitím zeleného čaje lze předcházet rakovině (Cabrera et al. 2006). Potenciálně antikarcinogenní účinky katechinů jsou nejvíce spojovány s jejich antioxidační aktivitou (Procházková et al. 2011). Díky antioxidačním schopnostem by katechiny mohly působit protektivně při užití léčiv, které vyvolávají tvorbu ROS. Na druhou stranu, účinek některých léčiv je mimo jiné spojován s vyvoláním oxidačního stresu. V tomto případě by současný příjem katechinů mohl snížit účinnost těchto léčiv. Navíc bylo prokázáno, že katechiny jsou inhibitory glutathion-S-transferas (GST), významných biotransformačních enzymů, které se podílejí na detoxikaci řady léčiv a jiných xenobiotik (Boušová et al. 2012). Proto nelze vyloučit, že současný příjem léčiv-substrátů GST s katechiny by mohl snížit detoxikaci těchto léčiv a zvýšit jejich nežádoucí účinky.

Proto cílem této práce bylo testovat vliv katechinů na toxicitu dvou vybraných léčiv: cytostatika doxorubicinu (DOX) a antipyretika a analgetika paracetamolu (PARA). Obě léčiva resp. jejich metabolity vyvolávají tvorbu ROS. Prooxidační působení DOX je jedním z mechanismů jeho protinádorového působení, avšak současně i jeho toxického působení na zdravé buňky. Za hepatotoxicitu vysokých dávek PARA je

zodpovědný jeho reaktivní a prooxidačně působící metabolit NAPQI, který je v organismu detoxikován pomocí GST. U obou léčiv byl tedy určitý předpoklad možného vlivu katechinů na jejich účinnost a toxicitu. Pro naši studii byly vybrány katechiny, které jsou v zeleném čaji přítomny v nejvyšších koncentracích, a to katechin, epikatechin, epigallokatechin, epikatechin-3-gallát a epigallokatechin gallát. Všechny tyto katechiny jsou nerozpustné ve vodě, proto bylo nutné použít jako rozpouštědlo DMSO, které je však podle předchozích studií, prováděných na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, v koncentraci nad 1 % toxické (Volková 2010). V našich studiích bylo proto použito 0,1 % DMSO. Studie byly prováděny na buněčné linii HCT-8 a potkaních hepatocytech.

Prvním úkolem bylo zjistit, zda samotné katechiny nemají antiproliferativní vliv na buněčnou linii HCT-8. Pro stanovení byla využita metoda barvení neutrální červení. Cabrera et al. (2006) uvádí, že katechiny, zejména pak EGCG, mají významný antiproliferativní vliv. Testování prováděli na lidských buňkách karcinomu prsu MCF-7. V naší studii žádný z testovaných katechinů nevykazoval, ani při nejvyšší použité koncentraci 25  $\mu$ M, signifikantní antiproliferativní vliv na buňky HCT-8. Z toho vyplývá, že antiproliferativní působení katechinů záleží na typu nádorové linie a především na koncentraci přijímaných katechinů. Zelený čaj je považován za neúčinnější nápoj pro prevenci rakoviny. Při testování vlivu čajových katechinů na protinádorový účinek DOX využíval Liang et al. (2010) jako modelovou tkáň myši hepatocelulární karcinom (HCC). Zjistil, že účinek DOX na nádorovou linii byl zvýšen současným podáváním čajových katechinů, obzvláště ECG a EGCG. Účinek EGCG byl výrazně vyšší než ECG. Rozdíl v účinnosti je vysvětlen odlišnou chemickou strukturou obou látek. EGCG obsahuje ve své molekule o jednu hydroxylovou skupinu více než ECG. Uplatňuje se tak efekt aromatického kruhu a hydroxylové skupiny, sloužící jako donory elektronů, čímž vykazují lepší antioxidační vlastnosti EGCG. V našem experimentu byl testován vliv jednotlivých katechinů (v koncentraci 5  $\mu$ M) na antiproliferativní vliv DOX na buněčnou linii HCT-8. Jak po 24 hodinové inkubaci, tak po 48 hodinové inkubaci byl pozorován výrazný koncentračně-závislý antiproliferativní účinek DOX. Ani jeden z katechinů však nezvýšil účinek DOX. Ačkoli Liang et al. (2010) uvádí, že katechiny a cytostatika jsou synergenty, záleží zřejmě na typu nádorových buněk a především na koncentraci katechinů. Liang v experimentech ovlivňoval DOX EGCG o koncentraci 30 mM, to je tisícinásobně větší koncentrace než v našich experimentech. My jsme se chtěli ve svých studiích přiblížit koncentraci

katechinů, která je dosažitelná běžnou konzumací zeleného čaje. Podle Cabrery (2006) může obsahovat šálek (200 ml) zeleného čaje až 90 mg EGCG, to je zhruba 2,3  $\mu\text{M}$  koncentrace. Po vypití 2 šálků, se tedy dostáváme na naši použitou koncentraci 5  $\mu\text{M}$ . Z výsledků vyplývá, že běžné pití zeleného čaje nemá vliv na zvýšení účinku DOX.

DOX vyvolává v nádorových buňkách tvorbu ROS, což přispívá k jeho cytotoickému působení (Hanušová et al. 2012). Jelikož katechiny působí antioxidantně, zajímalo nás, zda pití zeleného čaje či konzumace potravních doplňků s katechiny nemůže snížit antiproliferativní aktivitu DOX a tím snižovat účinek DOX na nádorové buňky. Výsledky našeho testování tuto možnost vyvrátily. Žádná z testovaných koncentrací nesnižovala účinek DOX. Konzumace zeleného čaje by tedy neměla snížit účinek protinádorové léčby pomocí DOX.

Čajové katechiny mohou svým antioxidantním působením ovlivnit funkci a životnost izolovaných hepatocytů. Z našich výsledků je zřejmé, že katechiny, zejména pak ve směsi (Polyfenon E), mají na izolované hepatocyty protektivní vliv. Tento efekt se u jednotlivých katechinů projevil při koncentraci 25  $\mu\text{M}$ , při které viabilita hepatocytů vystoupila u neúčinnějšího katechinu EGC na 112 %. Podstatně lepších výsledků bylo dosaženo při použití POE. Zvýšená životnost hepatocytů, která dosáhla 120 %, byla patrná již při koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . Životnost 193 % byla dosažena použitím 10  $\mu\text{M}$  POE.

Hlavním nežádoucím účinkem DOX je jeho systémová toxicita, zvláště pak kardiotoxicita. Ve vyšších koncentracích působí DOX toxicky i na jaterní buňky (Hanušová et al. 2012). V našich experimentech DOX v testovaných koncentracích 10  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  byl, podle snímků pořízených pod mikroskopem, pro hepatocyty toxický. Po přidání EGCG a POE o koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  došlo k dalšímu mírnému snížení viability o cca 10 %. Naopak vyšší koncentrace EGCG a POE působila výrazně protektivně, snímky pořízené pod mikroskopem ukazují zvýšení životnosti hepatocytů po přidání kombinace EGCG nebo POE s DOX oproti samotnému DOX. Protektivní působení katechinů na toxicitu DOX v hepatocytech by mohlo být způsobeno jak antioxidantním působením katechinů, tak i jejich schopností inhibovat karbonylreduktasu 1 (CBR1). Tento enzym je enzymem metabolismu DOX, tvoří hlavní metabolit, sekundární alkohol doxorubicinol (DOXOL). Tato struktura je méně antiproliferativně aktivní, ale je více toxický než původní DOX.

V druhé části naší studie jsme testovali vliv katechinů na toxicitu PARA a jeho metabolitu NAPQI. Metabolismus PARA probíhá třemi cestami, primárně v játrech. Ze

všech tří cest vznikají jako koncové produkty netoxické sloučeniny, které jsou vylučovány ledvinami. V jedné z cest však vzniká i toxický meziprodukt - metabolit NAPQI, který je vysoce reaktivní a prooxidačně působící a je primárně zodpovědný za toxické účinky PARA. NAPQI vzniká za účasti cytochromu P-450, konkrétně isoformem CYP2E1 a CYP3A4. NAPQI podléhá konjugaci s glutationem, významným antioxidantem, a tím je odbouráván, aniž by poškozoval organismus, zejména játra. Problém nastává při požití nadměrných dávek PARA, literatura uvádí vyšších jak 8 g/den, při kterých dojde k vyčerpání glutationu v játrech, NAPQI se kumuluje a reaguje se složkami jaterních buněk. Dochází k jaterní nekróze a buňky zanikají. Dávkování PARA pro dospělého člověka se pohybuje mezi 0,5-1,0 g až 4x denně. Látka se po p.o. podání dobře resorbuje a vylučuje ledvinami. Eliminační poločas je cca 2 hodiny (Lüllmann 2002). Při normálním dávkování se tedy PARA dobře snáší a riziko hepatotoxicity je malé.

Naše výsledky tuto teorii potvrdily. Použité koncentrace PARA, z nichž ta nejvyšší byla 5 mM, což odpovídá 0,8 g, nepůsobily hepatotoxicky. Naopak vykazovaly z neznámých příčin určité zvýšení viability hepatocytů.

Katechiny vykazují jak antioxidační vlastnosti, tak schopnost inhibovat GST (Boušová et al. 2012) tj. enzymy, které se významně podílí na detoxikaci NAPQI. Vystala tedy otázka, který účinek převáží po přidání katechinů k PARA. Po přidání 0,5  $\mu$ M EGC a EGCG došlo ke snížení viability hepatocytů a naopak po přidání 5  $\mu$ M koncentrace katechinů ke zvýšení viability hepatocytů oproti samotnému PARA v netoxických koncentracích. Což naznačovalo, že u vyšších koncentrací katechinů se více uplatňují antioxidační vlastnosti.

Bohužel tuto domněnku nepotvrdil experiment s POE, kdy došlo po přidání 5  $\mu$ M POE k výraznému poklesu viability hepatocytů. Tento rozpor je možno vysvětlit synergistickým inhibičním účinkem směsi katechinů na GST. Je také nutno poznamenat, že práce s izolovanými hepatocyty je náročná. Díky jejich hustotě si neustále sedají ke dnu, ale velmi neochotně se k němu přichytávají. Při malém otřesu nebo neopatrné manipulaci s destičkami se hepatocyty ode dna okamžitě odpoutávají a rozptylují v médiu. Díky těmto vlastnostem může docházet k napipetování nedokonale homogenizované suspenze na destičky, nebo při odstraňování média z destiček může dojít současně i k odsátí hepatocytů. Práce s hepatocyty vyžaduje pečlivost, rozvážnost a především trpělivost.

Při vzniku reaktivního metabolitu NAPQI prožívá organismus oxidační stres spojený s tvorbou ROS. Tomuto toxickému efektu lze zabránit dodáním antioxidantů, které zabrání jaternímu poškození. V naší práci jsme testovali jako antioxidant POE. NAPQI o 10  $\mu\text{M}$  koncentraci způsobil největší nárůst oxidačního stresu, hned po peroxidu vodíku, který je silně reaktivní a potencuje tvorbu ROS. POE se v našich experimentech uplatnil, jako výborný antioxidant. Už 0,5  $\mu\text{M}$  POE způsobil snížení oxidačního stresu vyvolaného 10  $\mu\text{M}$  NAPQI. 5  $\mu\text{M}$  POE dokonce snížil oxidační stres i pod hodnotu oxidačního stresu samotného 0,5  $\mu\text{M}$  POE. Nejnižší oxidační stres vykazoval samotný 5  $\mu\text{M}$  POE.

V dalším experimentu jsme zkoušeli, zda katechiny budou chránit jaterní buňky před toxicitou NAPQI. Toxicitu testovaných látek a jejich kombinací jsme stanovovali pomocí LDH. Samotné 0,5  $\mu\text{M}$  NAPQI mělo pouze mírný cytotoxický účinek. Přídavek EGCG i POE měl výrazně protektivní účinek. Při použití 5  $\mu\text{M}$  NAPQI se výrazněji projevil cytotoxický účinek. U této koncentrace však nemělo přidání EGCG a POE žádný vliv na životnost buněk. Tento test potvrdil, že katechiny působí jako účinné antioxidanty, avšak koncentrace toxických sloučenin nesmí být příliš vysoká.

Získané výsledky je však nutné brát jako pouze orientační, jejich výpovědní hodnota je ovlivněna několika skutečnostmi, především použitou metodou a typem studované tkáně. Naprostá většina experimentů je studována *in vitro* a dají se jen omezeně přiblížit na člověka *in vivo*. Metabolismus zkoumaného substrátu je zprostředkován mnoha enzymovými systémy, přičemž převládající forma záleží na koncentraci substrátu. Výsledný efekt katechinů v těle je ovlivněn výší jejich příjmu a také dalšími látkami, které do těla spolu s nimi přicházejí. Určitý význam hraje i to, že v experimentech nebyly použity lidské, ale potkaní hepatocyty.

Přesto věřím, že dosažené výsledky přinesly nové poznatky, které mohou být využity v dalším výzkumu vlivu katechinů na pozitivní i negativní účinky léčiv.

## 7 ZÁVĚRY

- Katechin, epikatechin, epigallokatechin, epikatechin-3- gallát a epigallokatechin gallát neovlivňují proliferaci nádorových buněk HCT-8
- Katechin, epikatechin, epigallokatechin, epikatechin-3- gallát a epigallokatechin gallát nesnižují a zároveň ani nezvyšují antiproliferativní účinek doxorubicinu na buněčnou linii HCT-8
- Katechin, epigallokatechin a epigallokatechin gallát mají protektivní vliv na viabilitu hepatocytů při koncentraci 25  $\mu\text{M}$ , nižší koncentrace tento vliv nemají. Polyfenon E vykazuje protektivní účinky na viabilitu již od koncentrace 1  $\mu\text{M}$
- Doxorubicin o koncentracích 10  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  působí na hepatocyty toxicky. Zvýšení viability se projevilo po přidání 0,5  $\mu\text{M}$  epigallokatechin gallátu k 10  $\mu\text{M}$  doxorubicinu. Naopak 0,5  $\mu\text{M}$  Polyfenon E způsobil pokles viability. Epigallokatechin gallát i Polyfenon E o koncentraci 5  $\mu\text{M}$  působí protektivně na toxicitu doxorubicinu na hepatocyty.
- Paracetamol není v koncentraci 5 mM pro hepatocyty toxický. 0,5  $\mu\text{M}$  epigallokatechin a epigallokatechin gallát způsobily snížení životnosti hepatocytů, naopak jejich 5  $\mu\text{M}$  vzorky způsobily zvýšení životnosti. 5  $\mu\text{M}$  Polyfenon E je v kombinaci s paracetamolem pro hepatocyty výrazně toxický již při koncentraci 1,25 mM. U 0,5  $\mu\text{M}$  Polyfenonu E záleží na koncentraci paracetamolu, do 3 mM se viabilita zvyšovala od 5 mM se viabilita snižovala.
- Epigallokatechin gallát a Polyfenon E vykazují dobré antioxidační vlastnosti již při koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$ .



## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
C	Katechin
CBR1	Karbonyl reduktáza
COX-2	Cyklooxygenáza
CYP2E1	Isoforma P-450
CYP1A2	Isoforma P-450
CYP3A4	Isoforma P-450
DCFH <sub>2</sub> -DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
DCFH <sub>2</sub>	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
DCFH	2',7'-dichlorofluorescein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOX	Doxorubicin
DOXOL	Doxorubicinol
EC	Epikatechin
ECG	Epikatechin- gallát
EGC	Epigallokatechin
EGCG	Epigallokatechin- gagát
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
FBS	Fetální bovinní sérum
HCC	Hepatoceulární karcinom
HCT-8	Buněčná linie odvozená z lidského adenokarcinomu ilea
HDL	High Density Lipoproteins

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
LDH	Laktátdehydrogenáza
LDL	Low Density Lipoproteins
MCF-7	Lidské buňky karcinomu prsu
MNNG	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
NOS	Synthasy oxidu dusnatého
eNOS	Endoteliální synthasy oxidu dusnatého
NR	Neutrální červeň
P-450	Skupina enzymů obsahujících ve své molekule hem
PARA	Paracetamol
PBS	Fosfátový pufr
POE	Polyfenon E
SD	Směrodatná odchylka od aritmetického průměru
XO	Xantinoxidasa

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

Arcimovičová, J. – Valíček, P. *Vůně čaje*. 1. vydání. Benešov: Start, 1998. 117 s. ISBN 80-902005-9-1.

Augustín, Jozef. *Povídání o čaji: čajovníkový list (Camellia sinensis L.), čaj, jako potravinářská pochutina, léčebný, mystický nápoj a jiné tonizující nápoje světa*. 1. vydání. Olomouc: Fontána, 2001. 205 s. ISBN 80-86179-75-3.

Boušová, Iva, et al. *Naturally occurring flavonoids as inhibitors of purified cytosolic glutathione S-transferase*. *Xenobiotica* 2012 ; 42(9) :872-879.

Cabrera, Carmen, et al. *Beneficial effects of green tea – A review*. *Journal of the American College of Nutrition* 2006; Vol. 26, No. 2 : 79-99.

*Cyberlipid center: Monoterpenes* [online]. Poslední revize 13.2.2011. [cit. 2011-3-3] URL <<http://www.cyberlipid.org/simple/simp00041.htm>>.

*Cyberlipid center: Sesquiterpenes* [online]. Poslední revize 13.2.2011. [cit. 2011-3-3] URL <<http://www.cyberlipid.org/simple/simp00042.htm>>.

Dufresne, C. J. – Farnworth, E. R. *A review of latest research findings on the health promotion properties of tea*. *J. Nutr. Biochem.* 2001 ; 12: 404-421.

*Free patents online: all the inventions of mankind: Methods of making and using theaflavin, theaflavin-3-gallate, theaflavin-3'-gallate and theaflavin 3,3'-digallate and mixtures thereof* [online]. c2004-2011 [cit. 2011-2-22]. URL <<http://www.freepatentsonline.com/7157493.html>>.

*Gate2Biotech: Extrakt zeleného čaje zkoumán pro protirakovinné účinky* [online]. c2006-2013. [cit. 2013-3-26]. URL <<http://www.gate2biotech.cz/extrakt-zeleneho-caje-zkouman-pro-protirakovinne-ucinky>>.

*Gruentee: Gruentee-dierkt.de: Informationen über Grüntees aus China: Die Inhaltsstoffe* [online]. [cit. 2011-3-14] URL <[http://www.gruentee-direkt.de/Teepflanze/inhaltsstoffe\\_des\\_Tees.htm](http://www.gruentee-direkt.de/Teepflanze/inhaltsstoffe_des_Tees.htm)>.

Hanušová, Veronika, et al. *Possibilities to increase the effectiveness of doxorubicin in cancer cells killing*. Drug Metabolism Reviews 2011; 43 : 540-557.

Hanušová, Veronika, et al. *The influence of oracin on reduction and toxicity of doxorubicin in hepatocytes and mammary epithelial cells MCF-10A*. Xenobiotica 2012, 42 : 571-579.

Chow, K. - Kramerová, I. *Všechny čaje Číny*. Přeložil Michal Synek. 3. opr. vyd. Praha: DharmaGaia, 1998. 284 s. ISBN 80-85905-54-X.

Janega, P. – Babál, P. *Tea – source of a delicious drink with health benefits*. In: Ďuračková Z. a Knasmüller S. (eds.) *The activity of natural compounds in diseases prevention and therapy*. 1st ed., Slovak Academic Press, Bratislava, 2007, str. 107-125. ISBN 978-80-8095-019-4.

Jirsa, Milan. *Biochemické vyšetřovací metody v hematologii* [online]. [cit. 2013-4-11]. URL <<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text5.htm>>.

Khan, N. – Mukhtar, H. *Tea polyphenols for health promotion*. Life Sci. 2007 ; 81: 519-533.

King, W. Michael. *The Medical Biochemistry Page: Introduction to Vitamins and Minerals* [online]. c1996-2011 [cit. 2011-3-3]. URL <<http://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.html>>.

Kolečkář, Vít, et al. *Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita*. Chem. Listy 2012 ; 106: 113-121.

Kozák, Vojtěch. *Espirito café: Bezkofeinová kava* [online]. c2010. [cit. 2011-2-28]. URL <<http://www.espirito.cz/blog/entry/14-bezkofeinova-kava.html>>.

Kučera, Otto, et al. *Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro*. Československá fyziologie 3/2006, 52-59.

Liang, Gang, et al. *Green tea catechins augment the antitumor activity of doxorubicin in an in vivo mouse model for chemoresistant liver cancer*. Internacional journal of oncology 2010 ; 37: 111-123.

Liang, Yu- Chih, et al. *Carcinogenesis: Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3,3'-digallate* [online]. c2011 [cit. 2011-2-22]. URL <<http://carcin.oxfordjournals.org/content/20/4/733.full>>.

Lübeck, Walter. *Zelený čaj: uzdravující požitek*. Přeložil Miroslav Hubáček. 1. vydání. Olomouc: Fontána, 2007. 141 s. ISBN 978-80-7336-413-7.

Lüllmann, Heinz, et al. *Barevný atlas farmakologie*. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2001. 382 s. ISBN 80-7169-973-X.

Lüllmann, H. – Klaus, M. za spolupráce Wehlinga, M. *Farmakologie a toxikologie*. 1. vydání. Praha: Grada, 2002. 694 s. ISBN 80-7169-976-4.

Macková Jana (2010): *Zelený čaj*. Bakalářská práce. Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně, str. 26.

Martínková, Jiřina, et al. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Praha: Grada, 2007. 397 s. ISBN 978-80-247-1356-4.

Mitscher, L. A. – Dolby, V. *Knih o zeleném čaji: Čínský pramen mláde: Jak pomoci zeleného čaje předcházet rakovině a zpomalovat stárnutí*. Přeložila Markéta Janouchová. 1. vydání. Praha: Zems; Praha: Pragma, 2006. 191 s. ISBN 80-903305-9-2 (Zems), ISBN 80-7205-153-9 (Pragma).

*Medac: Doxorubicin medac* [online]. c2009. [cit. 2013-4-10]. URL <<http://www.medac-cz.eu/cs/doxorubicin-medac/product.html?id=34>>.

*Montana Whole Health: NAPQI Archives* [online]. c2013. [cit. 2013-4-5]. URL <[http://www.mtwholehealth.com/wp-content/uploads/paracetamol\\_metabolism.jpg](http://www.mtwholehealth.com/wp-content/uploads/paracetamol_metabolism.jpg)>.

Oppliger, Peter. *Nová kniha o zeleném čaji*. Přeložila Romana Barfussová. 1. vydání. Praha: Pragma, 2000. 80 s. ISBN 80-7205-758-8.

Patočka, Jiří. *Toxikologie: Pozor na paracetamol* [online]. c2004. [cit. 2013-3-26]. URL <<http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=66>>.

Petit, Elise, et al. *Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes*. Toxicology in Vitro 2008.

Petruželka, L. – Konopásek, B. *Klinická onkologie*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2003. 274 s. ISBN 80-246-0395-0.

Pourahmad, Jalal, et al. *Tetramethylphenylenediamine-induced hepatocyte cytotoxicity caused by lysosomal labilisation and redox cycling with oxygen activation*. *Chemico-Biological Interactions* 2008 ; 172: 39-47.

Pratt, J. N. – Rosen, D. *Rádce milovníka čaje: průvodce pro pravého znalce o tom, jak kupovat, připravovat a vychutnávat čaj*. 1. vydání. Praha: Pragma, 1999. 128 s. ISBN 80-7205-672-7.

Procházková, D., et al. *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*. *Fitoterapia* 2011 ; 82(4):513-523.

Sharangi, A. B. *Medicinal and therapeutic potentialities of tea (Camellia sinensis L.) – A review*. *Food Res. Int.* 2009 ; 42: 529-535.

Shay, J. W. – Wright, W. E. : *Telomerase and cancer*. *Human Molecular Genetics* 2001 ; 10 (7): 677-685.

Slanina, J. – Táborská, E. *Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka*. *Chem. Listy* 2004 ; 98: 239-245.

Sneader, Walter. *Drug discovery: a history*. 1st edition. England: Willey, 2005. 468 s. ISBN 0-471-89979-8.

Stiborová, Marie, et al. *Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví*. *Chem. Listy* 1999 ; 93: 229-237.

Svačina, Š. – Bretšnajdrová, A. *Cukrovka a obezita: Proč dostávají obézní lidé cukrovku? : Jak bojem s obezitou předcházet cukrovce? : Jak cukrovku léčit?*. 1. vydání. Praha: Maxdorf, 2003. 246 s. ISBN 80-85912-58-9.

Šindelka, Gustav. *Cukrovka: (diabetes mellitus)*. 1. vydání. Praha: J. Vašut, 2000. 32 s. ISBN 80-7236-179-1.

Teufl, Cornelia. *Zelený čaj: elixír zdraví*. Přeložila Romana Barfussová. 1. vydání. Praha: Metramedia, 2000. 95 s. ISBN 80-238-5536-0.

Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc [online]. c2010. [cit. 2013-3-27]. URL <[http://www.medchem.upol.cz/images/ft268 mini prep 04052006\\_02.jpg](http://www.medchem.upol.cz/images/ft268_mini_prep_04052006_02.jpg)>.

Valter, Karel. *Vše o čaji pro čajomily*. 1. vydání. Praha: Granit, 2000. 190 s. ISBN 80-85805-91-X.

Velayutham, Pon, et al. *Green tea catechins and cardiovascular health: An update*. *Curr Med Chem*. 2008 ; 15 (18): 1840-1850.

Velišek, Jan. *Chemie potravin 1*. 1. vydání. Tábor: Osis, 1999. 352 s. ISBN 80-902391-3-7.

Velišek, Jan. *Chemie potravin 2*. 1. vydání. Tábor: Osis, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-4-5.

Velišek, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vydání. Tábor: Osis, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.

Volková Marie (2010): *Modulační účinky quercetinu a rutinu na aktivitu a expresi cytochromu P4501A ve střevních buňkách*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 22-23.

Wachendorfová, V. *Čaj*. Přeložila Dagmar Eisenmannová. 1. vydání. Praha: Slovart, 2007. 96 s. ISBN 978-80-7209-922-1.

Wikimedia: *Doxorubicin* [online]. c2013. [cit. 2013-3-26]. URL <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Doxorubicin.svg>>.

Wikimedia: *N-Acetyl-p-benzochinonimin* [online]. c2012. [cit. 2013-4-5]. URL <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/65/N-Acetyl-p-benzochinonimin.svg>>.

Wikimedia: *N-Acetyl-p-aminophenol* [online]. c2012. [cit. 2013-4-5]. URL <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/N-Acetyl-p-aminophenol.svg>>.

Wikimedia: *Wikimedia commons: Purin num2.svg* [online]. Poslední revize 1.5.2010. [cit. 2011-2-28]. URL <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Purin\\_num2.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Purin_num2.svg)>.

*Wiktionary: Das freie Wörterbuch: Xanthin* [online]. Poslední revize 4.2.2011. [cit. 2011-2-28]. URL <<http://de.wiktionary.org/wiki/Xanthin>>.

Young, Jin Moon, et al. *Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism*. *Toxicology in Vitro* 2006 ; 20 :187-210.