

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: 6. Zdravotnictví

Biologická aktivita extraktů z květů levandule úzkolisté

(*Lavandula angustifolia* Mill.)

Tomáš Heger

Olomoucký kraj

Olomouc 2016

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: 6. Zdravotnictví

Biologická aktivita extraktů z květů levandule úzkolisté

(*Lavandula angustifolia* Mill.)

Biological activity of extracts from narrow-leaved lavender

(*Lavandula angustifolia* Mill.) flower

Autor: Tomáš Heger
Škola: Slovanské gymnázium Olomouc
třída Jiřího z Poděbrad 13
771 11 Olomouc
Kraj: Olomoucký
Konzultant: Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, články, studie, prezentace, studentské práce atd.) uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Olomouci dne podpis:

Poděkování

Slova díky patří RNDr. Přemyslu Indrákovi, CSc., který vedl moji farmakognostickou část práce na pracovišti Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin (VÚRV). Velmi mi pomohly jeho cenné zkušenosti v oblasti extrakce a výzkumu obsahových látek rostlin. doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D. z Oddělení biofyziky CRH dlužím velké díky za nabídku vyzkoušet si Baginského ATPasovou esej a následné odborné vedení praxe v laboratoři a diskutování teoretické části mé práce na toto téma. Hlavní poděkování patří mé vedoucí práce, Mgr. Lucii Rárové, Ph.D., z Laboratoře růstových regulátorů, která zaštitila největší část praktické části – testy cytotoxicity. Poskytovala mi veškeré instrukce k manipulaci s buněčnými kulturami a odborné konzultace ohledně teoretické části práce a směru, kterým by se měla v tomto ohledu dál ubírat. V souvislosti s tím děkuji také laborantce Olze Hustákové ze stejného pracoviště, bez jejíž pomoci by bylo nakládání s buňkami pro mě nejspíš neslučitelné s normální školní docházkou. Stejně tak bez podpory rodiny a přátel, kterým jsem taktéž vděčný, by bylo vše zcela jistě mnohem náročnější.

Tato práce byla, jakožto součást projektu Badatel, podpořena grantem MŠMT 0017/7/NAD/2015 Rozvoj talentovaných žáků základních a středních škol prostřednictvím přírodovědných výzkumných aktivit.

Abstrakt

Ve své práci jsem se zaměřil na problematiku výzkumu biologické aktivity rostlinných látek, jakožto potenciálních zdrojů budoucích léčiv. V teoretické části se zabývám samotným procesem výzkumu rostlinné drogy až samotných účinných látek a popisují teorii extrakce drogy. Hluběji zde také rozvíjím principy a význam postupů užitých v praktické části.

Jádrem práce je praktická část, která částečně navazuje na můj předchozí výzkum levandulové silice z předešlého roku. Opět jsem se zaměřil na tři kultivary levandule úzkolisté (*Lavandula angustifolia* Mill.): 'Beta', 'Krajová' a 'Bílá'. Srovnal jsem zastoupení terpenů v levandulové silici navzájem mezi jednotlivými odrůdami a také s výsledky z léta roku 2014. Dále jsem provedl horkovodnou extrakci a extrakci macerací květů kultivaru 'Bílá'. Ze tří testovaných koncentrací drogy v extrahovadle byla pro každé rozpouštědlo vybrána koncentrace, při které extrakce proběhla s nejvyšším výtěžkem. Jako extrahovadla byly použity: vroucí voda, methanol, ethylethanoát, propan-2-ol a heptan. Byly provedeny *in vitro* testy levandulových extraktů zahrnující měření cytotoxicity a inhibičního účinku na Na^+/K^+ -ATPasu měřenou pomocí koncentrace fosfátů zjišťované Baginského metodou. Pro měření cytotoxicity byly využity nádorové linie HeLa, MCF7 a G-361 a nenádorová kontrola, lidské pokožkové fibroblasty BJ. Buněčná viabilita byla zjišťována fluorimetrickou esejí s Calceinem AM. Posléze byla opět uskutečněna extrakce, tentokrát všech tří odrůd, která již proběhla za použití postupu s největší výtěžností zjištěného u kultivaru 'Bílá', a cytotoxické účinky takto získaného horkovodného a methanolového extraktu byly vzájemně porovnány za účelem vybrat nejúčinnější extrakt dané odrůdy.

Klíčová slova

Levandule úzkolistá (*Lavandula angustifolia* Mill.), extrakt, hydrodestilace, silice, antiproliferační aktivita, HeLa, MCF7, G-361, fibroblasty BJ, Baginského metoda, Na^+/K^+ -ATPasa

Abstract

In this thesis I focused on the issue of plant substances biological activity research as a potential source of future medicines. In theoretical part of the thesis I characterize the process of investigation of plant drug or active substance and describe the theory of crude drugs extraction. The principle of the procedures used in the practical part are also deeply discussed.

The core of the thesis is the practical part which partly builds on my previous research of lavender essential oil from a year before. Again I focused on three narrow-leaved lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) cultivars: 'Beta', 'Krajová' and 'Bílá'. I compared relative representations of terpenes in lavender essential oils between each individual cultivar and also with results from summer 2014. Furthermore, crude drug represented by flowers of 'Bílá' cultivar was infused with boiling water and macerated with various solvents. From three tested concentrations of crude drug in the solvents the highest extract yield providing drug concentration was chosen for each type of the solvents (boiling water, methanol, ethyl acetate, propan-2-ol and heptane). Obtained lavender extracts were *in vitro* tested, performed assays included investigation of cytotoxicity in various cells and inhibitory activity on Na^+/K^+ -ATPase measured via inorganic phosphate concentration determined using Baginsky assay. Cytotoxicity was measured in HeLa, MCF7, and G-361 tumour lines and non-malignant control BJ human foreskin fibroblasts using cell viability Calcein AM fluorometric assay. Subsequently the extraction of crude drugs was performed again, that time all of the three cultivars were represented, using the highest extract yield providing process found previously for 'Bílá' cultivar. Extraction was conducted with methanol maceration and boiling water infusion. Cytotoxic activity of extracts were compared in order to choose the most active extract.

Keywords

Narrow-leaved lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.), extract, hydrodistillation, essential oil, antiproliferative activity, HeLa, MCF7, G-361, BJ fibroblasts, Baginsky assay, Na^+/K^+ -ATPase

Obsah

ÚVOD.....	1
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	2
1.1 Biomedicínský výzkum rostlin a klinické zkoušky	2
1.1.1 Klinická hodnocení	2
1.1.2 Význam biomedicínského výzkumu rostlin	4
1.1.3 Úskalí biomedicínského výzkumu rostlin.....	8
1.2 Teorie extrakce drogy	10
1.2.1 Eluotropní řada rozpouštědel	10
1.3 Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	11
1.3.1 Struktura a funkce Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy	11
1.3.2 Reakční cyklus Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy.....	18
1.3.3 Farmakologie Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy	20
1.4 Baginského test ATPasové aktivity	21
2 PRAKTICKÁ ČÁST	22
2.1 Sběr a sušení drogy	22
2.2 Analýza silice	22
2.2.1 Hydrodestilace	23
2.2.2 GC-MS analýza.....	23
2.2.3 Meziroční změny v relativním zastoupení komponent silice v letech 2014–2015	24
2.3 Příprava extraktů	29
2.3.1 Použitá extrahovadla.....	29
2.3.2 Podmínky extrakce	29
2.3.3 Odpařování extrahovadla.....	30
2.3.4 Vyhodnocení extrakce a výběr vzorků pro testy biologické aktivity	31
2.4 Testování biologické aktivity	36
2.4.1 Testy cytotoxicity extraktů	36
2.4.2 Vliv extraktů na aktivitu Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy	41
3 DISKUZE	44
4 ZÁVĚR.....	45
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A DALŠÍCH ZDROJŮ INFORMACÍ.....	47

ÚVOD

Rostliny jsou cenným zdrojem biologicky aktivních látek, přičemž jisté druhy jich obsahují značné množství a tělo na ně poskytuje rozličnou biochemickou až biologickou odpověď. Výzkum na tomto poli může být velmi přínosný z hlediska nacházení takových nových látek, které mají potenciál stát se léčivy. Velká pestrost fytochemikálií poskytuje rozsáhlé zřídlo možných adeptů pro podrobnější zkoumání, které se již od samého počátku odehrává v případě rostlinných látek v odlišném schématu, než je tomu při výzkumu působení látek syntetických.

V případě rostlin existuje možnost předchozí lidové empirické zkušenosti s použitím drogy, kterou mohou badatelé zohlednit a stanovením pracovních hypotéz fokusovat svůj výzkum ke konkrétnějším cílům, které mohou být s touto zkušeností v souladu. Taková možnost využití „empirických dat“ ohledně biologického působení se v případě zcela nově nasyntetizované látky nenabízí, přesto však v rámci současného moderního výzkumu bývá její struktura modelována tak, aby jistou předpovídanou biochemickou odezvu vyvolala.

Dalším specifickým faktorem výzkumu fytochemikálií je fakt, že se jedná o rostlinné metabolity, což je spojeno s mnoha několika výhodami i nevýhodami z hlediska jejich získávání, které v práci dále rozvádím. Již jen samotný proces izolace účinné látky z drogy může být značně náročný. Navíc v některých případech může být účinný pouze celý komplex několika fytochemikálií, a jedna účinná složka tedy nemůže být nalezena. Zpravidla platí, že v biologické aktivitě se účinky složek extraktu dané drogy vzájemně modulují.

Cesty výzkumu přírodních a syntetických látek se však mohou potkávat hned v několika bodech a doplňovat se, např. vývoj syntetické látky může být inspirován již známou skupinou látek přírodních nebo třeba může být známá přírodní látka dále chemicky modifikována tak, aby měla z hlediska své aktivity lepší parametry – možností je tedy mnoho.

1.1 Biomedicínský výzkum rostlin a klinické zkoušky

Takřka nepřetržitě se v nesčetně mnoha světových laboratořích snaží vědci hledat účinné látky, které by mohly pomoci zlepšit kvalitu zdraví člověka, ať už ve stavu nemoci nebo pouze v rámci prevence. V současnosti je pečlivý primární výzkum týkající se biologické aktivity a chemického složení účinných látek základem pro potenciální klinické zkoušky vedoucí k registraci určité látky nebo skupiny látek jako léčiva.

1.1.1 Klinická hodnocení

Výzkum vztahující se k *in vitro* testování biologické aktivity a následnému *in vivo* testování na zvířatech může v případě pozorované významnější aktivity látky postoupit do klinického hodnocení, které si kladou za cíl zjistit, zda je daná látka bezpečná a účinná, jejich součástí je také popis chování látky v organismu (farmakokinetika a farmakodynamika) a stanovení terapeutické dávky. Jejich účelem je také porovnat účinnost testované nové léčby s léčbou již existující, např. s tzv. zlatým standardem, což je lékařskou obcí obecně akceptovaný klasický postup terapie při dané diagnóze, který byl odvozen ze závěrů věrohodných klinických studií [1]. (Mezi léky jsou klasifikována také homeopatika, jejich klinické testování se od následujícího popisu liší, obecně je celý proces jednodušší a trvá kratší dobu.)

Výstupem preklinické fáze vývoje potenciálního léčiva je mimo experimentální data tzv. protokol, což je dokument, kterým se klinické zkoušky následně řídí. Obsahuje plán výzkumu – uvádí účel studie a předpokládanou dobu jejího trvání, definuje způsobilost ke vstupu do klinické zkoušky (kritéria účasti) a potřebný počet participantů, vyjmenovává zaznamenávané údaje o účastnících, dále obsahuje podrobnosti ohledně dávkování testované látky nebo průběhu testované terapie aj. [2]. V průběhu klinických zkoušek je protokol sestavován opakovaně pro každou fázi a jeho obsah se odvíjí od poznatků nabytých v předešlém výzkumu. Platí, že před vstupem do klinické zkoušky

jsou budoucí účastníci vždy obeznámeni s délkou jejího trvání. Klinické testování se odehrává v nemocnicích, lékařských ordinacích nebo i na univerzitách, což je spíše vzácností. Provádí ho lékaři a vědečtí pracovníci s posilou zdravotníků nebo třeba sociálních pracovníků.

Zákon o léčivech přesně definuje pravidla vztahující se k procesu schvalování látky nebo skupiny látek jako léčiva a podrobnosti jeho následného uvádění na trh ve formě léčivého přípravku. V České republice má registrování a dohled nad léky na trhu na starosti Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL), v rámci Evropy se pak jedná o Evropskou lékovou agenturu (EMA). Registraci předchází velice složitý, extrémně nákladný a nakonec i zdoluhavý proces již zmiňovaných klinických zkoušek, který navíc většina látek z různých důvodů ani nedokončí. Dále uvádím nejčastěji užívanou klasifikaci a popis jednotlivých fází tohoto procesu, které uvádí ve svých materiálech také SÚKL.

Fáze I, zahrnuje klinické hodnocení bezpečnosti, při kterém skupina desítek dobrovolníků užívá testovanou látku. Dobrovolníci jsou zdraví lidé, ale pokud je látka pro zdravé jedince zvlášť nebezpečná, dobrovolníky tvoří pacienti – tak je tomu např. při testování cytostatik. Jsou zjišťovány farmakokinetické a farmakodynamické parametry látky v lidském organismu a její nežádoucí účinky. Stanovuje se maximální tolerovaná dávka látky postupným zvyšováním jejího dávkování od nízkých množství na počátku.

Fáze II, zahrnuje klinické hodnocení účinků. Teprve v této fázi začne testování látky na pouze na pacientech, a ti musí splňovat přísná kritéria vstupu do studie. V rámci této fáze se zjišťují účinky testované látky a rizika spojená s jejím užíváním, také se upřesňuje její dávkování. Ve fázi II participuje obvykle až 500 pacientů.

Fáze III zahrnuje klinické hodnocení prospěšného účinku, který byl vyselektován v předchozích fázích a nyní je podrobně zkoumán z hlediska jeho efektivity a bezpečnosti. Prokazuje se často i účinnost potenciálního nového léčiva vůči současnému zlatému standardu a látka se testuje v kombinacích s již zavedenými postupy. Z různých testovaných množství se hledá optimální podávaná dávka. V České republice probíhají v této fázi nejčastěji studie mezinárodní nebo multicentrické. Fáze III může trvat několik let a pacientů zahrnuje stovky až tisíce, obvykle do 5 000.

Registrace, jak již bylo zmíněno výše, je proces schvalování léčiva, ke kterému se dokládá velice rozsáhlá dokumentace všech provedených testů. Může trvat měsíce až roky než je látka schválena jako léčivo čili léčivá látka. Farmaceutické firmy pak z léčivých látek (samotné aktivní substance) vyrábějí v adekvátní lékové formě léčivý přípravek, ke kterému se přikládá příbalový leták shrnující výsledky výzkumu provedeného s léčivou látkou.

Fáze IV zahrnuje testy, které rozšiřují poznatky o léku a zaměřují se na vyhledávání vzácných vedlejších účinků a studium farmakogenetiky. Také se přichází na účinky projevující se v delším intervalu užívání léčiva. Ve fázi IV je látka schválena jako léčivo na trhu distribuována ve formě léčivého přípravku.

Patentová ochrana léčiva trvá 20 let, ale je nutné si uvědomit, že do této doby spadá také klinické hodnocení a registrace, což samo o sobě může zabrat 8–12 let. Po vypršení doby platnosti patentu mohou i jiné firmy začít vyrábět léčivé přípravky se stejnou látkou, ale pod jiným obchodním názvem. Takové léky se nazývají generika a jejich cena je významně nižší oproti originálnímu léku. Registrování generik nevyžaduje provádění klinických studií, avšak je nutné prokázat tzv. bioekvivalenci v rámci bioekvivalenční studie, která prokáže, že generikum má stejné vlastnosti jako originální lék. Prominutí klinických zkoušek nelze vztáhnout na biotechnologicky připravené léky, které není možné dokonale charakterizovat po strukturní stránce, a proto je nutné klinickou studii s nově připravením biologickým léčivem provést znovu. Biotechnologická léčiva vyrobená po skončení ochranné lhůty patentu podle vzoru originálního biologického léčiva se označují jako biosimilars – nelze u nich zcela přesně napodobit originální lék, což je dáno právě způsobem jejich získávání [3;4].

1.1.2 Význam biomedicínského výzkumu rostlin

Předtím, než započne testování účinné látky v klinických zkouškách, musí existovat dostatek tzv. preklinických údajů o dané látce, jejichž obsahem jsou právě výsledky biomedicínského výzkumu. Konkrétně se jedná samozřejmě o informace o strukturní identitě dané molekuly nebo skupiny molekul, dále také o výsledky *in vitro* testů (na buněčných kulturách, chemické přístupy k měření antioxidační aktivity,…) a *in vivo* testů

(na zvířatech) – významné jsou především informace o mechanismu účinku, účinnosti a toxicitě látky.

Poznání struktury látky je zásadní jak z hlediska její aktivity, tak pokročilejšího výzkumu v rámci klinických studií, pokud by aktivita látky byla v jistém smyslu nadějná. Dnešní pokročilé metody analytické chemie nám dovolují velice efektivní analýzy a díky pokroku na poli strukturní biologie, biochemie a bioinformatiky jsme schopni, např. pomocí výpočetní chemie, odhadovat interakce mezi studovanou látkou a buněčnými strukturami nebo metabolickými dráhami. Příkladem mohou být např. inhibitory enzymů hledané metodou molekulového dokování, regulátory transkripce zjišťované na základě transkriptomických analýz, předpoklad antioxidační aktivity na základě struktury, simulace přechodu látky přes membránu nebo existující softwary odhadující např. proteinové interakce v důsledku up nebo down regulace proteinů. Zjistit celkovou biologickou aktivitu dané látky metodami zohledňujícími však zatím nelze, proto tyto metody slouží jako velice účinné katalyzátory pohánějící výzkum kupředu a s jejich pomocí jsme schopni správně interpretovat nezbytná experimentální data. Co je však značně složitější, je zjistit komplexní chování studované látky v těle organismu. K tomu slouží preklinické testování na zvířatech a klinické studie na lidech. V rámci testů *in vitro* může látka působit přímo na buňky s konkrétním postižením nebo může vykazovat jistou aktivitu, např. inhibovat enzym nebo působit jako antioxidant, avšak v kontextu podání látky v některé z přijatelných forem, jaké známe u léků, musíme započítat faktory farmakokinetické, farmakodynamické a náležité metabolické procesy probíhající na úrovni organismu.

Automatizované vysokoobjemové testy umožňují zjišťování aktivity obrovské knihovny molekul v rámci daného testu ve velmi krátkém čase oproti tradičním postupům a vybírají z nich pouze ty účinné molekuly, na které se následný výzkum zaměří. Vysoký výkon v množství testovaných látek za čas je dána robotizací testování i jeho vyhodnocování samotného. V současnosti lze získat pomocí syntéz nepřeberné množství molekul s potenciální aktivitou, od kterých se odvozuje další velké množství jejich derivátů a není tedy v silách člověka ani výzkumného týmu, aby testy těchto látek prováděl sám, proto byly vyvinuty automatizované vysokoobjemové testy, které je výhodné používat především v případě snadno syntetizovatelných nízkomolekulárních látek. Multidimenzionální optimalizace zahrnuje modifikace zkoumané látky tak, aby

měla co nejvyšší požadovanou aktivitu, aby byla organismem co nejlépe tolerována a aby se při jejím užívání vyskytovalo co nejméně vedlejších účinků. Uvádí se údaj, že ze 100 000 nových látek postoupí do klinického hodnocení pouze 5–10 z nich [5].

Mnozí výzkumníci se zaměřují na studium přírodních látek, tedy takových, které se vytváří v rámci biochemie nějakého organismu. Přírodní látky z exogenního zdroje mohou být lidskému organismu vlastní (říkejme alogenní) nebo cizí (xenogenní). Alogenní látky jsou v lidském těle přirozeně obsaženy, jedná se o přirozenou součást biochemických pochodů v lidském těle. Xenogenní látky nejsou přirozenou součástí lidského metabolismu, a proto se jich tělo snaží zbavit detoxikačními procesy. Předtím, než tak učiní, může látka v lidském organismu vyvolat charakteristickou biologickou odpověď, což platí i v případě dodávání alogenní látky do těla, neboť dochází k posilování jistých metabolických drah a oslabování drah jiných, případně se mohou zapojit takové dráhy, které se neprojevují v případě přirozené koncentrace dané látky v těle. Za využití empirických poznatků, které nasbírala lidová tradice, a strukturních analýz je možné efektivně se zaměřit na výzkum potenciálních účinných látek v pozitivním slova smyslu.

Přesto, že mnoho zkoumaných nebo již v medicíně využívaných biologicky aktivních přírodních látek má xenogenní povahu, tím, že vznikají v rámci přirozených mechanických pochodů, mohou být tělem lépe snášeny. Jistě, že vždy záleží na konkrétní molekule a hned nás napadne spousta životu nebezpečných přírodních toxinů, ale nyní uvažujeme obecně srovnání uměle připravených, rozumějme pouze člověkem vytvořených, látek a látek přírodních, u kterých nacházíme více zástupců lidským tělem lépe snesitelných. Je to dáno tím, že centrální metabolické pochody (neuvažujeme teď dráhu specifickou pouze pro nějakou danou skupinu organismů) ve kterých vznikají dle definice přírodní látky, jsou pro život univerzální – v rámci nich mohou být syntetizovány i degradovány. Pravdou je, že většinou velice zajímavou biologickou aktivitu vyvolávají ty látky, které vznikají právě v drahách, jež se v člověku neuskutečňují. Pro názornost uvedu syntézu antibiotik v bakteriích – např. vancomycin je přírodní látkou xenogenní povahy, glykopeptidový halogenderivát, který má na tělo výrazné působení. Dále lze uvést celou třídu β -laktamových antibiotik. Přírodní xenogenní látky, které jsou tělu cizorodé do vysoké míry (např. právě halogenderiváty), mohou mít také závažné vedlejší účinky a ocitáme se tedy u stejného problému, který způsobují umělé molekuly. Na druhé straně uvedu např. lecitin, který dokáže zlepšovat kognitivní aktivitu – také se jedná

o přírodní látku s terapeutickým významem, přesto však minimem vedlejších účinků [6;7]. Takových příkladů lze najít mnoho, těžko lze tedy problematiku nějak generalizovat, ale jisté je, že mezi látkami přírodními najdeme více látek pro tělo snesitelnějších, než je tomu u většiny umělých látek.

Organismy, ze kterých je účinná látka získávána, nám poskytují tu výhodu, že slouží jako jakási „továrna“ na tuto látku. Z biotechnologického hlediska je pak možné zkoumat, jak by se dala syntéza dané látky v organismu jejího původu zvýšit. Častý problém při získávání určité látky z nějakého organismu je kolísání jejího obsahu a variabilita jejího složení v případě, že se jedná o směs různých molekul. Účinné přírodní látky se často získávají extrakcí, která běžně poskytuje široké spektrum látek podobné polaritě v rámci extraktu, a proto je nutné extrakt dále zpracovávat a v případě jeho využití jako léku zavést jeho tzv. standardizovanou podobu nebo vyselektovat hlavní účinnou složku extraktu, neboť léčivá látka musí být náležitě charakterizována [8].

Rostlinný produkt obsahující drogu nebo některé její účinné látky může být klasifikován jako doplněk stravy nebo tradiční rostlinný lék. Zatímco doplňkem stravy může být prakticky jakákoli látka, která není jedovatá, u tradičního rostlinného léku musí proběhnout zjednodušený schvalovací proces, jenž potvrdí, že látka splňuje definici tradičního rostlinného léku a je bezpečná. Jak uvádí SÚKL na své webové stránce v souvislosti s registrací léků, tradiční rostlinné léky

- *„jsou určeny k podání ústy, zevně nebo inhalací,*
- *jsou určeny k podání výhradně v určité síle a dávkování,*
- *jejich indikace odpovídají výhradně indikacím tradičně používaných rostlinných léků, určených a navržených na základě jejich složení a účelu použití pro použití bez dohledu lékaře potřebného pro diagnostické účely, předepsání nebo pro monitorování léčby,*
- *přípravek se používá minimálně 30 let, z toho nejméně 15 let v EU*
- *je prokázáno, že tento přípravek za daných podmínek použití není škodlivý, že farmakologické účinky nebo účinnost tohoto přípravku jsou zřejmé na základě dlouhodobého používání a zkušeností.“ [9]*

1.1.3 Úskalí biomedicínského výzkumu rostlin

Proto, aby se poznatky ze základního biomedicínského výzkumu prakticky uplatnily, je třeba drogu uvést na trh jako produkt s požadovaným účinkem, případně jistou formou zpopularizovat výsledky vědeckého bádání v dané oblasti tak, aby se o tom dozvěděla širší veřejnost. Výroba doplňku stravy nebo zvláště pak klinické testování vyžaduje nákladnou investici, kterou si každé pracoviště nemůže dovolit, čímž je odkázáno buďto na sponzory klinického výzkumu nebo prodej svého duševního vlastnictví jiné firmě, která náležité prostředky vynaložit může.

Většina výzkumných center a univerzitních laboratoří nemá prostředky pro pokrytí nákladů na klinické testování, proto jsou odkázáni na investory, kterými jsou pochopitelně nejčastěji farmaceutické firmy. Tyto koncerny se však chovají jako klasické tržní subjekty a požadují finanční návratnost prostředků vynaložených na klinické zkoušky, neboť nelze, aby výzkum pouze donekonečna sponzorovaly, pak by neměla jejich existence dlouhého trvání. K návratu investice jim napomáhají patenty na testované látky, které mají být budoucími léky. Pokud by totiž látka prošla úspěšně zkouškami a byla schválena jako léčivo, mohla by jej začít produkovat jakákoli způsobilá firma a výrazně se sníží pravděpodobnost, že prodej léku pokryje náklady svého klinického testování. Tento fakt přirozeně vede k tomu, že farmaceutické firmy investují především do vývoje pouze těch látek, které jsou pod ochranou patentu, aby jim bylo zaručeno, že po dobu platnosti patentu mají privilegium výroby léku a jiná firma může zahájit generickou produkci až po jeho vypršení. Pokud je objevena nadějná přírodní látka, která má potenciál postoupit z preklinické fáze do klinické, stejně se obvykle hledají její syntetické deriváty. Smyslem tohoto snažení je samozřejmě najít její účinnější formu, cíleně modifikovat její aktivitu, ale je to také důsledek snahy, aby byla látka z výše zmíněných důvodů chráněna jako duševní vlastnictví.

Často se navíc objevují nežádoucí účinky na buňky (v důsledku pak i tkáně a orgány) jiného druhu, než na kterých byla pozitivní aktivita látky primárně zjišťována. A dále, mnoho látek je sice účinných, ale až v takových koncentracích, kterých není reálně možné dosáhnout v organismu podstupujícím farmakoterapii nebo ve kterých se již začínají zásadně projevovat nežádoucí účinky. Přechod mezi pozitivními a negativními účinky často není diskrétní, ale spojitý a hledá se taková látka, u které jsou negativní účinky v ideálním případě zanedbatelné vůči těm pozitivním. Z praxe však

víme, že o většině léčiv lze tvrdit v tomto ohledu pouze to, že pozitivní účinky převyšují ty negativní, a vždy je otázkou, do jaké míry tomu tak je. K podání léčiv, která mají toto rozpětí malé, se lékař uchyluje v případě, že důsledky nemoci by byly těžší než nežádoucí účinky léčiva. Vidíme, že se nám diskutovaná tematika úzce prolíná s vědeckou a lékařskou etikou.

Oblast výzkumu přírodních látek čelí také riziku prosazování osobního přesvědčení vědce. Této oblasti se totiž často věnují lidé se zájmem o nekonvenční způsoby léčby, jako je tradiční lidové léčení nebo fytotherapie, a mohou s výsledky pracovat neobjektivně nebo je dokonce manipulovat tak, aby stranili alternativní terapii, což rozhodně nelze považovat za vědecký přístup. Jako příklad lze uvést zfalšované studie o blahodárném působení resveratrolu obsahující vymyšlené výsledky, které publikoval prof. Dipak Kumar Das. Tyto studie, ve kterých bylo prokázáno celkem 145 případů plagiátorství a manipulace s výsledky, musely být následně staženy [10]. Tento neblahý fenomén, kdy předem existuje představa o výsledku, kterou se snaží vědci v rámci studie prokázat i za cenu manipulace průběhu výzkumu nebo jeho výsledků, se jistě týká i výzkumu na poli umělých látek. Nejedná se dokonce ani o ojedinělou záležitost, nýbrž se to děje častěji, než bychom asi očekávali. Farmaceutické firmy se v těchto případech snaží prorazit hranici mezi vědou a marketingem, aby výsledky klinických studií vedly k úspěšné registraci léčiva nebo rozšíření indikací léčiva již existujícího [5].

Další problémy mohou být důsledkem zavedených systémů hodnocení vědecké práce jednotlivých pracovišť. Pokud tento systém nezohledňuje kvalitu publikací, nýbrž pouze jejich počet, laboratoře se snadno stávají jakýmsi „fabrikami na výsledky“, které získávají rychle za pomoci levných testů s malou vypovídací hodnotou do praxe, jen aby vykazaly vědeckou činnost. Tento přístup často neposouvá výzkum kupředu, ale vede k pouhé rutině a shromažďování dat ze základního výzkumu bez jeho postupu do dalších fází směrem k praktickému využití poznatků.

Nakonec ve své úvaze uvedu asi největší problém z pohledu úspěšnosti výzkumu, a to jest fakt, že výsledky získané *in vitro* se často neshodují s pozorovaným účinkem *in vivo* v rámci preklinického testování, a pokud látka postupuje do klinických zkoušek, hned v průběhu první fáze se na člověku často nepotvrdí účinek pozorovaný ve zvířecích studiích.

1.2 Teorie extrakce drogy

Principem separační metody extrakce je přechod částic z jedné fáze látky extrahované do druhé fáze reprezentované extrahovadlem. Extrahovaná směs látek se rozděluje mezi obě fáze na základě rozdílné rozpustnosti a dochází k postupnému ustalování rovnováhy. Obecným cílem extrakce je buď samotné získání analytu, nebo jeho přečišťování extrahováním rušících látek. Extrakce má výhodu v tom, že ji lze uskutečňovat za rozličných fyzikálních podmínek, čímž je mnohdy umožněno získat širokou škálu analytů s vysokou výtěžností a minimálními ztrátami. Šetrnost některých extrakčních technik oceňujeme zvláště v případě nutnosti získat termolabilní analyt.

1.2.1 Eluotropní řada rozpouštědel

Na základě hodnot relativních permitivit (ϵ_r) rozpouštědel, které kvantitativně vyjadřují míru jejich polarity, je možné sestavit tzv. eluotropní řadu rozpouštědel, v níž jsou seřazena podle vzrůstající polarity. Polarita rozpouštědla roste s hodnotou relativní permitivity. Pro srovnání uvádím ϵ_r často používaných rozpouštědel. Zvýrazněná jsou rozpouštědla, které jsem využil k extrahování drogy v praktické části mé práce.

Látka	ϵ_r	Teplota [°C]	Látka	ϵ_r	Teplota [°C]
Pentan	1,84	20	Ethylethanoát*	6,02	25
Hexan	1,89	20	Tetrahydrofuran*	7,58	25
Heptan	1,92	20	Pyridin*	12,4	20
Cyklohexan	2,025	20	Isopropanol*	19,92	25
Chlorid uhličitý	2,24	20	Aceton	20,7	25
Benzen	2,284	20	Ethanol	24,51	25
Toluen	2,39	20	Methanol	32,65	25
Sirouhlík	2,64	20	Acetonitril*	37,5	20
Diethylether	4,34	20	DMSO*	46,68	20
Chloroform*	4,81	20	Voda*	80,1	20

Tab. 1: Často užívaná rozpouštědla seřazená podle vzrůstající polarity do tzv. eluotropní řady rozpouštědel (převzato z [11]* a z [12])

Z toho plyne, že rozpouštědla ležící v eluotropní řadě blízko u sebe budou mezi sebou dobře mísitelná, ale s jejich vzrůstající vzdáleností jejich vzájemná mísitelnost klesá.

1.3 Na⁺/K⁺-ATPasa

Po zjištění učiněném na počátku dvacátého století, že se excitabilním svalovým buňkám následkem tvorby akčních potenciálů snižuje postupně koncentrace intracelulárních K⁺ iontů a zvyšuje se koncentrace Na⁺ iontů, vyvstala otázka, jak se buňky s tímto nepoměrem dokáží vyrovnávat. Za vysvětlení tohoto problému se zasloužil dánský lékař Jens Christian Skou, když s prvotním účelem studia působení anestetik v padesátých letech odhalil enzym transportující Na⁺ a K⁺ ionty. Významnou studii na tohle téma publikoval v roce 1957, ve které se však pro pouhé nepřímé důkazy ještě neodvažoval označit enzym za iontovou pumpu. Během konference ve Vídni se seznámil s Robertem Postem, který ho přivedl na experimenty s ouabainem. Sám Post totiž zjistil stechiometrii transportu Na⁺ a K⁺ iontů u erytrocytů a k zainhibování průběhu tohoto děje využíval ouabain. Úspěšnou inhibicí Skouova enzymu ouabainem, která byla následně provedena, se tedy definitivně prokázalo, že se jedná o iontovou pumpu – Na⁺/K⁺-ATPasu. Za tento znamenitý objev získal v roce 1997 Nobelovu cenu s 50% podílem, jejíž udělení bylo opodstatněno jako „for the first discovery of an ion-transporting enzyme, Na⁺,K⁺ - ATPase“ [13].

1.3.1 Struktura a funkce Na⁺/K⁺-ATPasy

Na⁺/K⁺-ATPasa je enzym patřící mezi transmembránové přenašeče, které za současné intracelulární hydrolýzy ATP přenáší proti elektrochemickému gradientu tři sodné kationty ven z buňky a následně dva draselné kationty do buňky, jedná se tedy o případ aktivního transportu. Tímto procesem se Na⁺/K⁺-ATPasa primárně podílí na ustanovení klidového membránového potenciálu (i) a tvorbě gradientu K⁺ iontů (ii) mezi buňkou a okolím. Elektrogenní účinek Na⁺/K⁺-ATPasy vyrovnává elektrický potenciál snižováním napětí na membráně, protože normálně pumpuje tři kationty do extracelulárního prostředí a pouze dva kationty do buňky. V buňce je nižší koncentrace Na⁺ iontů než K⁺ iontů a v extracelulárním prostoru je naopak nižší koncentrace K⁺ iontů

než Na^+ iontů – to je důvod, proč musí pumpa využívat k přenosu energii z ATP, transport se totiž uskutečňuje proti elektrochemickému gradientu. Druhotně je pak nerovnovážné iontové rozložení mezi buňkou a extracelulárním prostředím zdrojem energie pro sekundární aktivní transport, při kterém se vykonává práce na úkor vyrovnávání iontových hladin. Zcela obecně význam popsaného děje spočívá v zajištění integrity prakticky každé buňky, zvláště důležitý je pak ve fyziologii nervové a svalové činnosti, která je založena na změně membránového potenciálu. Popsaný proces se podílí také na tvorbě optimálního osmotického tlaku v buňce, a tím udržování jejího objemu, a na hodnotě osmolarity krve (sekundárně umožňuje reabsorpci Na^+ z primární moči zpět do krve v kanálcích nefronu), ale také např. na stabilním úzkém intervalu optimálního pH organismu. Esenciální význam této iontové pumpy vyzdvihuje fakt, že v klidu padne na její aktivitu 20–30 % celkové produkce ATP, v případě neuronů mohou energetické výdaje dosáhnout až na 2/3 spotřeby ATP [14;15].

Na^+/K^+ -ATPasu klasifikujeme jako ATPasu P-typu, kterou charakterizuje mimo enzymatickou hydrolýzu ATP také specifický reakční cyklus. Funkce ATPas P-typu je zajištěna fosforylací aspartylového zbytku („P“ typ od angl. *phosphate*) na úkor ATP, čímž se aktivní místo dostane do energeticky bohatého stavu, což umožní transport látek v důsledku konformačních změn proteinu. Cyklus zahrnuje dva mezní konformační stavy enzymu označované jako E_1 a E_2 , pro které je charakteristická afinita ke konkrétnímu substrátu. Transportér však prochází mezi stavy E_1 a E_2 ještě několika konformačními mezistupni, což pro případ Na^+/K^+ -ATPasy dále rozvedu. Ve stavu E_1 vykazuje enzym vysokou afinitu k částicím nacházejícím se uvnitř prostoru ohraničeném membránou, které podstupují eflux, a naopak nízkou afinitu k částicím podstupujícím influx, které se nacházejí v prostoru od opačné strany membrány. Stav E_2 charakterizuje situace zcela opačná, kdy vysoká afinita přísluší částicím importovaným a velmi nízká afinita částicím exportovaným.

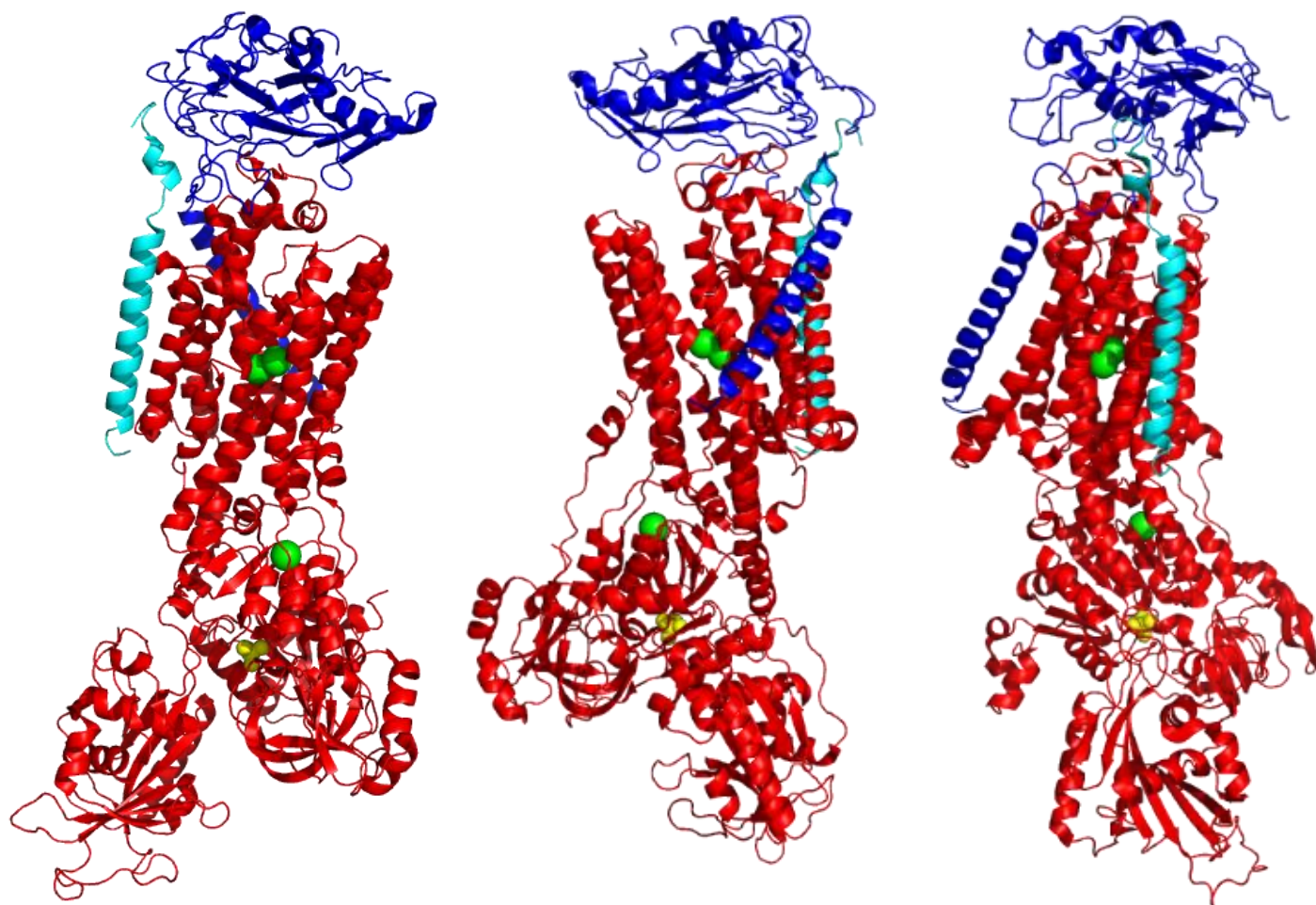
Díky tomuto mechanismu je zaručen střídavý eflux a influx dvou rozdílných druhů látek. Z toho vidíme, že se nejedná o případ antiportu, jak by se při velice zjednodušeném popisu funkce pump tohoto typu mohlo na první pohled zdát. Není splněna podmínka kotransportu proto, že ATPasy P-typu nejprve transportují jeden druh látky, a následně se může v důsledku konformačních změn enzymu přenést druhý druh látky opačným směrem – tento děj není současný, ale sousledný.

Na^+/K^+ -ATPasa spadá do P-typu ATPasa topologické třídy II, která se vyskytuje především u eukaryot a zahrnuje transportéry se specifitou k Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} a fosfolipidům (Chan *et al.*, 2010). Přesně se jedná o typ IIC, který má specifitu pro K^+ ionty a strukturně obsahuje podjednotku β . Z celé rodiny ATPas P-typu Na^+/K^+ -ATPasa společně s H^+/K^+ -ATPasou jako jediné obsahují více než jednu podjednotku a obě tyto pumpy tvoří zmíněnou topologickou třídu IIC [17].

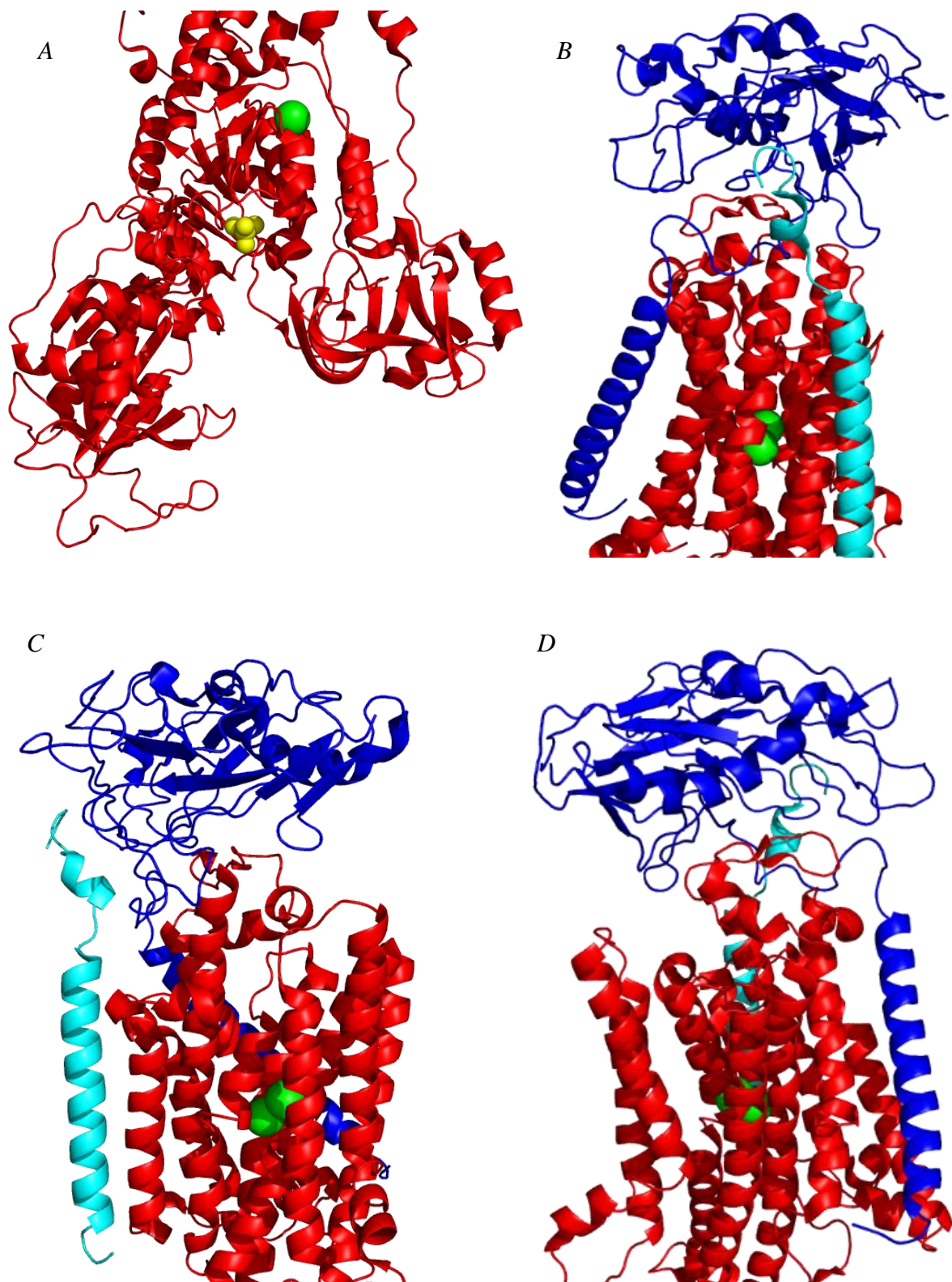
Na^+/K^+ -ATPasa je složena ze dvou katalyticky aktivních podjednotek (α a β) tvořících nejmenší funkční jednotku. $\alpha\beta$ heterodimer může být sdružený ještě s modulační podjednotkou spadající mezi FXYD proteiny, které obecně regulují iontové rozložení v prostorech oddělených membránami tím, že ovlivňují aktivitu iontových kanálů a pump, jako je tomu v případě Na^+/K^+ -ATPasy. Každá podjednotka může mít více isoform s odlišnými kinetickými parametry, takže ve výsledku existuje více kombinací podjednotkového složení pumpy, které se odvíjí od typu tkáně v závislosti na genetické distribuci konkrétních isoform – tak vzniká několik kineticky odlišných izozymů. Teoreticky může existovat až dvanáct izozymů Na^+/K^+ -ATPasy tvořených kombinacemi existujících čtyř isoform podjednotky α a tří isoform podjednotky β .

EC klasifikace Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy	
EC číslo	Enzym
EC 3	Hydrolasa
EC 3.6	Působící na anhydridy kyselin
EC 3.6.3	Katalyzátory transmembránového přenosu
EC 3.6.3.9	ATPasa P-typu

Tab. 2: EC klasifikace Na⁺/K⁺-ATPasy



Obr. 1: Na⁺/K⁺-ATPasa
 Podjednotka α (červeně), podjednotka β (modře), protein FXYD (cyan)
 a navázané K⁺ ionty (zeleně)
 PDB ID: 2ZXE (rozlišení 2,4 Å) [16]



Obr. 2: Na^+/K^+ -ATPasa, PDB ID: 2ZXE (rozlišení 2,4 Å) [16]
 A: Cytosolová část podjednotky α ve stavu $E_2\text{-P}_i$ (červeně), žlutě $[\text{MgF}_4]^{2-}$ mimikující navázaný fosfát, zeleně K^+ ion
 B, C, D: Transmembránová část ve stavu $E_2\text{-P}_i$ tvořená α -helixy podjednotek α (červeně, 10 α -helixů) a β (modře, 1 α -helix) a proteinu FXYD (cyan, 1 α -helix)

Podjednotka α obsahuje deset transmembránových α -helixů a plní samotnou katalytickou a transportní funkci – váže a hydrolyzuje ATP a přenáší kationty. ATP vazebná doména se nachází v cytosolu, zatímco vazebná místa pro ionty v membránové části podjednotky. Sestává se přibližně z 1 000 aminokyselin a její molekulová hmotnost je asi 110 kDa. Byly identifikovány čtyři isoformy této podjednotky, což je významný poznatek z hlediska farmakologie, neboť právě podjednotka α obsahuje vazebná místa pro aktivátory a inhibitory enzymu, což bude dále rozvedeno. Transmembránové α -helixy jsou spojeny čtyřmi krátkými smyčkami a větší smyčkou mezi sedmým a osmým α -helixem (E78) zasahujícími do extracelulárního prostoru a čtyřmi smyčkami intracelulárními, z nichž jsou z hlediska funkce nejdůležitější tři největší. Jedná se o intracelulární smyčky mezi α -helixy M2 a M3 (C23), M4 a M5 (C45) a M6 a M7 (C67). Smyčky utvářejí domény se specifickou funkcí, jak bylo popsáno v kinetickém modelu SERCA (sarkoplazmatická/endoplazmatická retikulární Ca^{2+} ATPasa). Centrální smyčka C45 je složena přibližně ze 430 aminokyselin a utváří dvě domény – N a P – celkově tak tvoří přibližně 40 % hmoty podjednotky α [17]. Smyčka C23 se skládá asi ze 120 aminokyselin a formuje společně s N-terminální částí proteinu doménu A (z angl. actuator). Nukleotid-vazebná doména N (z angl. nucleotide binding) váže molekulu ATP, která je po navázání tří Na^+ iontů hydrolyzována a uvolněný fosfát se váže na aspartát v doméně P (z angl. phosphorylation) za vzniku aspartylfosfátu. Doména P se nachází mezi dvěma výrazně separovanými segmenty domény N. Nejmenší je doména A, která slouží jako převodník energie uvolněné při fosforylaci, kterou jakožto šířící se konformační změnu předává do transmembránové části pumpy. Další její funkcí je defosforylace aspartylového zbytku po navázání dvou K^+ iontů, čímž jsou opět indukovány konformační změny a dochází k obnově nukleotid vazebné funkce a celý reakční cyklus může být opakován. Obecně je přenos energie uvolněné hydrolýzou ATP v rámci proteinu velice diskutovanou tématikou a bylo dokonce prokázáno, že lokální snížení hodnoty elektrostatického povrchového potenciálu v případě otevřené konformace pumpy ovlivní nabitá rezidua ve smyčce C67, což přispívá ke konformační transdukcii, jinak řečeno ke vzájemné komunikaci mezi cytosolovou a transmembránovou částí Na^+/K^+ -ATPasy [18].

Podjednotka β zasahuje do membrány pouze jedním α -helixem a je většinou silně glykosylovaná ve specifických místech v extracelulárním prostoru – právě míra glykosylace rozhoduje vedle podjednotkového složení o výsledné molekulové hmotnosti enzymu. Působí primárně jako chaperon podjednotky α , následně pomáhá jejímu zabudování do membrány a obecně podjednotku α konformačně stabilizuje a celkově je podjednotka β nezbytná pro enzymatickou aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy, i když ji sama o sobě nevykonává. Extracelulární část podjednotky β má globulinům podobný tvar a shora zcela pokrývá smyčky E56 a E78. Strukturně je formována pomocí tří disulfidických můstků, které jsou významné v procesu zabudování podjednotky α do membrány. Specifickými interakcemi s podjednotkou α moduluje její aktivitu, afinitu k oběma kationtům a účastní se vazby K^+ iontů i jejich okluze. Transmembránový α -helix je vytočený přibližně o 32° a je téměř paralelní s α -helixem M7 podjednotky α . Další fakt, který nasvědčuje významu podjednotky β při katalytických procesech, je to, že během přechodu mezi stavy E_1 a E_2 dochází k významným dynamickým změnám zahrnujícím konformační změny podjednotky β a vzájemný pohyb podjednotek α a β vůči sobě.

Podjednotka FXYD spadá do rodiny malých transmembránových proteinů o jednom α -helixu (výjimkou je FXYD3, který může obsahovat dva transmembránové α -helixy v důsledku zachování signální sekvence), které všechny mají společný aminokyselinový motiv FXYD, podle čehož dostaly své pojmenování. Podjednotka FXYD regulující aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy je tvořena jediným transmembránovým α -helixem a je schopná interakce pouze s komplexem podjednotek $\alpha\beta$, ne zvláště s každou z těchto podjednotek. Jedná se zároveň o tkáňově specifický protein, který je indukován ve stresových podmínkách a má schopnost modulovat transportní aktivitu pumpy úpravou jejích kinetických parametrů – např. ji stabilizuje ve stavu E_1 . V literatuře se vyskytuje pro tuto podjednotku také označení γ , což je správně název pouze pro ledvinový FXYD regulační protein, který byl prvně vyizolován pevně vázaný ke komplexu podjednotek $\alpha\beta$ z ledvinné tkáni.

V savčích buňkách byly nalezeny celkem čtyři isoformy podjednotky α (α_1 – α_4) a tři isoformy podjednotky β (β_1 – β_3). Samotná Na^+/K^+ -ATPasa pak funguje jako dimer komplexu $\alpha\beta$ podjednotek. Je nutné zmínit, že se nabízí více alternativních modelů pro strukturu a kinetiku Na^+/K^+ -ATPasy. Kromě heteromonomerní $\alpha\beta$ varianty enzymu byla během experimentů zjištěna také heterodimerní $(\alpha\beta)_2$ nebo heterotetramerní $(\alpha\beta)_4$ varianta. Názory jednotlivých vědeckých skupin se v tomto ohledu liší a je nutné získat další informace z experimentů, nejlépe *in vivo*.

Rezidua, jenž se nacházejí v α -helixech M4, M5, M6 a M8, utvářejí vazebná místa pro kationty, která jsou společná jak pro Na^+ , tak i K^+ ionty. Helixy M7–M10 podstupují v průběhu reakčního cyklu rozsáhlé konformační změny, čímž umožňují přechod pumpy mezi stavy E1 a E2. Vazebné místo pro ionty Na^+ je vysoce specifické, pouze v malé míře je schopno vázat H^+ nebo Li^+ ionty, což však nelze tvrdit o vazebném místě pro K^+ ionty, které může poutat také amoniak, Li^+ , Rb^+ , Cs^+ , Tl^+ , dokonce i Na^+ nebo ion žádný [17;18].

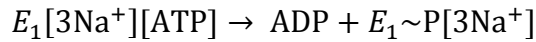
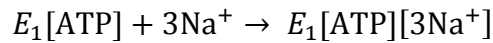
1.3.2 Reakční cyklus Na^+/K^+ -ATPasy

Pumpy typu P procházejí charakteristickým cyklem, který byl popsán Albersem a Postem. Z dnešního hlediska se jedná vzhledem k narůstajícím poznatkům o model k plnému objasnění kinetiky enzymu nedostačující, ale je velice názorný, protože je také nejznámější, a to pod názvem Albers-Postův cyklus nebo Albers-Postovo schéma [17].

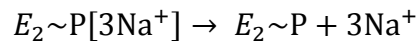
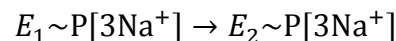
Jednotlivé kroky Albers-Postova cyklu lze zapsat v následujících reakčních schématech, ke kterým uvádím krátký komentář (vytvořeno podle [19;13]) Protože se pumpa nachází ve dvou mezních stavech, E₁ a E₂, označuje se tento model také jako E₁/E₂ teorie. Následující popis se vztahuje na přirozenou funkci Na^+/K^+ -ATPasy, kdy uvažují transport $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$:

Ve stavu E₁ je pumpa svou konformací otevřená do cytosolu, vykazuje vysokou afinitu k Na^+ iontům, které po navázání do kationtového vazebného místa indukují konformační změnu, což zapříčiní rozštěpení ATP přítomného v nukleotid vazebném místě (doména N). Z enzymu se uvolňuje ADP a fosfát se váže na aspartylový zbytek ve fosforylačním místě (doména P) – jedná se o typický znak ATPas P-typu, jak bylo

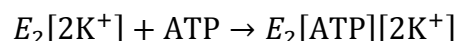
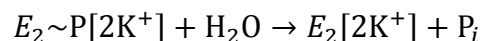
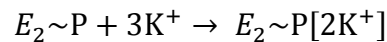
zmíněno výše. Stav $E_1\sim P[3Na^+]$ je konformačně charakterizován okluzí Na^+ iontů, tzn., že cytosolová i extracelulární hradla pumpy jsou uzavřena.



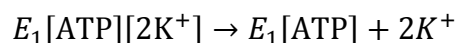
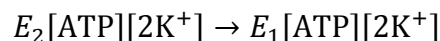
Následně se pumpa z okludovaného stavu zvrátí do stavu $E_2\sim P[3Na^+]$, kdy se otevírá směrem do extracelulárního prostoru, přičemž se uvolňují $3Na^+$ ionty.



Vazba K^+ iontů je ve stavu $E_2\sim P$ vysokoafinitní. Vidíme, že stavy E_1/E_2 jsou opravdu mezními jak z hlediska konformace pumpy (E_1 – otevřena do cytosolu, E_2 – otevřena do extracelulárního prostoru), tak jejich vazebných vlastností (E_1 – vysoká afinita pro Na^+ a velice nízká pro K^+ , E_2 – vysoká afinita pro K^+ a nízká pro Na^+). Vazba K^+ iontů indukuje hydrolýzu aspartylfosfátu, čemuž následuje uzavření extracelulárních hradel a nastává okluze pumpy v defosforylovaném stavu.



Stav $E_2[2K^+]$ je stabilní, pomalu poutá ATP, a tím se pumpa přepíná do stavu $E_1[ATP][2K^+]$, kdy je otevřená směrem do cytosolu.



Ve stavu $E_1\sim P[ATP]$ vykazuje pumpa vysokou afinitu k Na^+ iontům a celý cyklus může začít od znova.

Celý reakční cyklus Na^+/K^+ -ATPasy je za vynechání jednotlivých mezikroků možné zjednodušeně shrnout v následujícím schématu, které ukazuje výsledek činnosti tohoto enzymu:

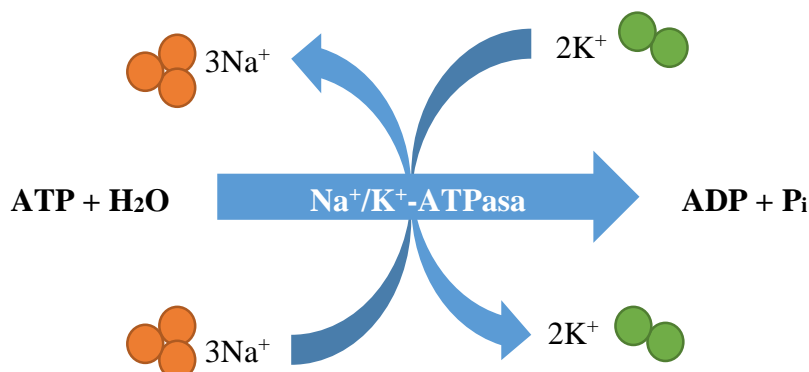


Schéma 1: Hydrolýzou ATP získává Na^+/K^+ -ATPasa energii pro transport 3Na^+ iontů ven z buňky a 2K^+ iontů dovnitř buňky proti koncentračnímu gradientu – primárně se její činností vytváří chemický gradient iontů a stechiometrií transportu 3:2 vede její činnost směrem k hyperpolarizaci membrány, tyto děje přispívají k „housekeepingu“ buňky (upraveno podle [c])

1.3.3 Farmakologie Na^+/K^+ -ATPasy

Steroidní glykosidy je možné dělit na kardenolidy a bufadienolidy, přičemž se označují také jako kardioglykosidy, neboť významně působí na myokard a otrava těmito látkami vede až k srdeční zástavě. Jejich podávání v malém množství je ale využíváno v kardiologii jako farmakoterapie při srdečních chorobách, např. arytmií. Inhibičně působí na Na^+/K^+ -ATPasu steroidní aglykon těchto látek, který interaguje se svým vazebným místem v extracelulární části podjednotky α [20].

Podjednotky α mají různou selektivitu ke kardenolidům, α_2 a α_3 vykazují oproti α_1 až čtyřikrát vyšší afinitu k digitalisovým glykosidům digoxinu, β -methyldigoxinu a digitoxinu, zatímco na α_1 se nejpevněji váže ouabain, přibližně s 2,5krát větší afinitou oproti α_2 [21]. Disociační konstanta pro ouabain klesá v řadě α_1 , α_3 a α_2 . U digitalisových glykosidů je z hlediska selektivity rozhodující sacharidová složka molekuly, která se podílí na upoutání inhibitoru v receptorovém místě pomocí vodíkových vazeb.

1.4 Baginského test ATPasové aktivity

Aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy je možné zjišťovat na základě toho, kolik se vyprodukuje její činností anorganického fosfátu. Tohoto předpokladu využívá test, který jsem použil v praktické části.

Po určitou dobu se na Na^+/K^+ -ATPasu nechá působit testovaný inhibitor. Přidáním ATP k pumpě doposud inkubované pouze s inhibitorem, může být zahájena její ATPasová aktivita. Poté, co uplyne doba, po kterou necháme pumpu pracovat v přítomnosti ATP a případného inhibitoru, se přidá do reakce roztok obsahující molybdenan amonný a kyselinu askorbovou. Volný anorganický fosfát tvoří s molybdenanovými anionty komplexní sloučeninu, která se redukuje kyselinou askorbovou do fialového zbarvení za vzniku molybdenové modři. Barvení se ukončuje přidáním citrátu sodného a bismutitého – citrát stabilizuje vzniklý fosfomolybdenát a bismutitý kation zamezí vzniku dalšího fosfomolybdenátu, protože veškerý volný molybdenanový anion se s ním sloučí, a sekundárně i zvyšuje citlivost testu. Tím je reakce ukončena a pro komplex molybdenové modři je následně stanovena absorbance při 710 nm. Platí úměra, že čím vyšší je absorbance, tím více bylo přítomno fosfátů, a tedy tím vyšší byla míra aktivity Na^+/K^+ -ATPasy.

Určité množství enzymu nemusí být citlivé k inhibitorům a může štěpit ATP i v jejich přítomnosti, proto je třeba tohle množství enzymu z testu vyloučit, aby nezkreslovalo výsledek míry aktivity Na^+/K^+ -ATPasy měřené na základě koncentrace anorganického fosfátu. Provádí se tedy paralelní test, ve kterém mimo testovanou látku a ATP jako hlavní složky vystupuje i inhibitor, o kterém zcela jistě víme, že aktivně Na^+/K^+ -ATPasy úplně zamezí – využívá se ouabain. Pokud se v tomto testu ocitne nějaká Na^+/K^+ -ATPasa rezistentní k ouabainu, její vliv je z testu odstraněn odečtením změřené absorbance od testu, ve kterém se měří účinek potenciálního inhibitoru bez ouabainu. Takto získáme výsledek vypovídající pouze o míře aktivity pumpy ovlivněné testovanou látkou.

2.1 Sběr a sušení drogy

Rostlinný materiál pocházel z výzkumných polí pracoviště Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin spadajícího pod Výzkumný ústav rostlinné výroby. Jednalo se o tři kultivary levandule úzkolisté (*Lavandula angustifolia* Mill.): 'Beta' (09A5500003/ 2285), 'Krajová' (09A5500001/2287) a 'Bílá', jejíž šlechtění nebylo dokončeno, takže nemá jinak v závorce uváděné evidenční číslo v systému Genové banky Výzkumného ústavu rostlinné výroby. Kvetoucí nať levandule úzkolisté (*L. angustifolia* Mill.) byla sklizena začátkem července v dopoledních hodinách. Jak ve dnech sběru, tak v nejbližší době okolo těchto dnů bylo výrazné sucho a velmi slunné počasí. Droga schla ve stinné a suché místnosti se vzdušnou cirkulací. Schnoucí natě byly zarovnány v jedné tenké vrstvě na síťovině, aby byl zajištěn přístup proudícího vzduchu z obou stran drogy. Proces usychání trval přibližně týden, na jeho konci byla nať výrazně lámavá, droga si zachovala příjemnou vůni a nebyla pozorována nežádoucí změna barvy květů, která by indikovala snížení kvality drogy. Usušená nať levandule byla šetrně sklizena do síťovinových pytlů, ve kterých byla uložena do tmavé a suché místnosti k pozdějšímu zpracování.

2.2 Analýza silice

Protože mě zajímala změna relativního zastoupení těkavých látek v levandulové silici v roce 2014 ve srovnání s rokem 2015, provedl jsem dle stejného schématu hydrodestilaci drogy a následný rozbor za použití techniky GC-MS. Následně posuzuji meziroční změnu relativního zastoupení hlavních komponent silice.

2.2.1 Hydrodestilace

Za účelem získání silice z květů byla provedena hydrodestilace v Clevengerově aparatuře. Z celkového množství sušené drogy daného kultivaru byla ta část pro hydrodestilaci vybrána náhodně a z několika míst v pytli a její množství přesahovalo množství pro hydrodestilaci nezbytné, aby mohly být květy ještě šetrně promíchány. Tento postup měl vyloučit možnost, že by se k dalšímu zpracování dostala droga pouze z jedné rostliny. Květy byly z natě ručně odstraněny před hydrodestilací a jejich navážka činila 20 g na aparaturu. Po dosažení bodu varu byly květy dále vařeny v aparatuře tři hodiny. Na konci hydrodestilace byl každý kultivar zastoupen pěti vzorky levandulové silice, na základě kterých byla mj. vypočítána výtěžnost silice, kterou ukazuje tab. 3.

Kultivar <i>L. angustifolia</i> Mill.	Výtěžnost silice
'Bílá'	44,6 ± 0,02 ml/kg
'Krajová'	35,8 ± 0,01 ml/kg
'Beta'	79,8 ± 0,04 ml/kg

Tab. 3: Výsledky hydrodestilace

2.2.2 GC-MS analýza

Každý ze vzorků silice byl podroben analýze metodou plynové chromatografie spřažené s hmotnostním spektrometrem. GC/MSD byl zakoupen od firmy Agilent Technologies (USA). Dále uvádím podrobnosti ohledně použitých přístrojů a kolony:

- Plynový chromatograf: 7890A GC
- Přidružený hmotnostní spektrometr: Inertní MSD 5975C s Triple-Axis detektorem a možností spektrální dekonvoluce
- Automatický vzorkovač GC Sampler 80/120
- Kolona: kapilární HP-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, (5%-fenyl)methylpolysiloxan

Provozní parametry plynového chromatografu:

- Teplotní gradient kolony: 70 °C po dobu jedné minuty, pak zvyšování teploty 2 °C/min až do 180 °C
- Nosný plyn: He s průtokem 1 ml/min
- Splitovací poměr: 1:100
- Objem nastříkované směsi: 1 ml
- Teplota injektoru: 220 °C

Provozní parametry hmotnostního spektrometru:

- Teplota MS detektoru: 150 °C
- Teplota ionizátoru: 230 °C
- Standardní rozsah a četnost skenování hmotnostních spekter
- Ionizační energie: 69,9 eV

2.2.3 Meziroční změny v relativním zastoupení komponent silice v letech 2014–2015

Následující výsečové grafy ukazují relativní zastoupení hlavních složek silice v roce 2014, které cituji ze své předchozí práce [22]*, ve srovnání s výsledky GC-MS analýzy silice získané stejným postupem v roce 2015.

Co se týče kultivaru 'Bílá', meziroční změny zastoupení jednotlivých hlavních komponent se nejvíce projevily v případě linalyl acetátu, jehož zastoupení bylo v roce 2015 asi 1,73krát větší oproti roku 2014. Hlavní složka této silice – linalool – si však zachovala své lehce nadpoloviční zastoupení. Můžeme říct, že v roce 2015 bylo oproti předešlému roku při stejné citlivosti metody zastoupeno obecně menší množství analytů.

Silice kultivaru 'Krajová' zaznamenala v roce 2015 v celkovém zastoupení všech látek nárůst linaloolu asi o 4 %, skoro na třetinové zastoupení však poklesl lavandulyl acetát. Zastoupení linalyl acetát vzrostlo dokonce o 82 % oproti hodnotě z roku 2014.

V případě silice kultivaru 'Beta' se zastoupení linaloolu opět drží mezi oběma roky na podobné hodnotě. Linalyl acetát zaznamenal zhruba 40% nárůst.

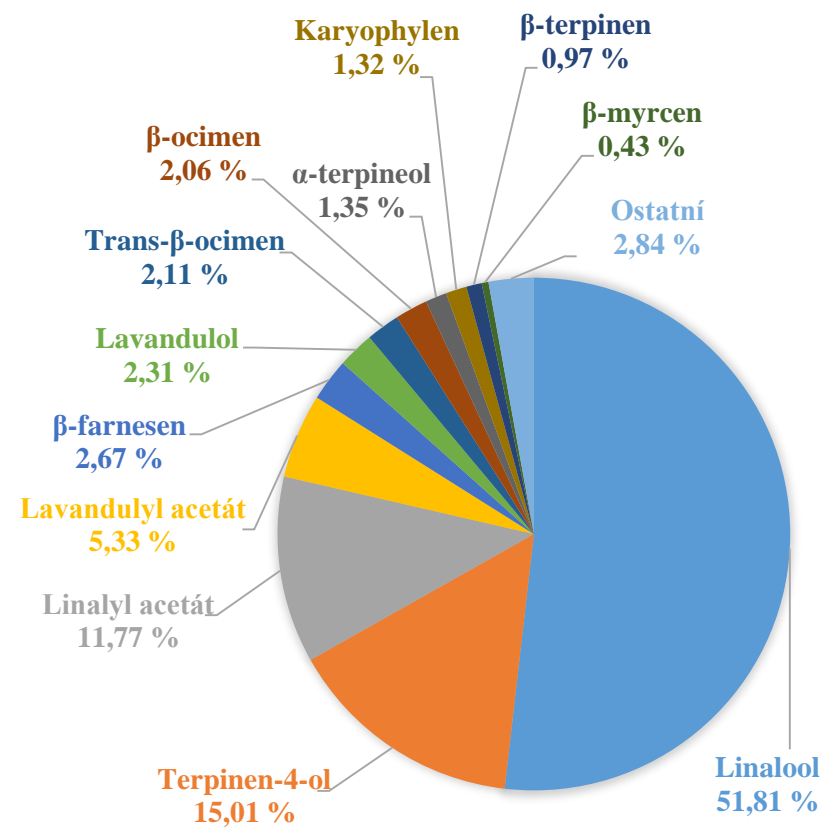
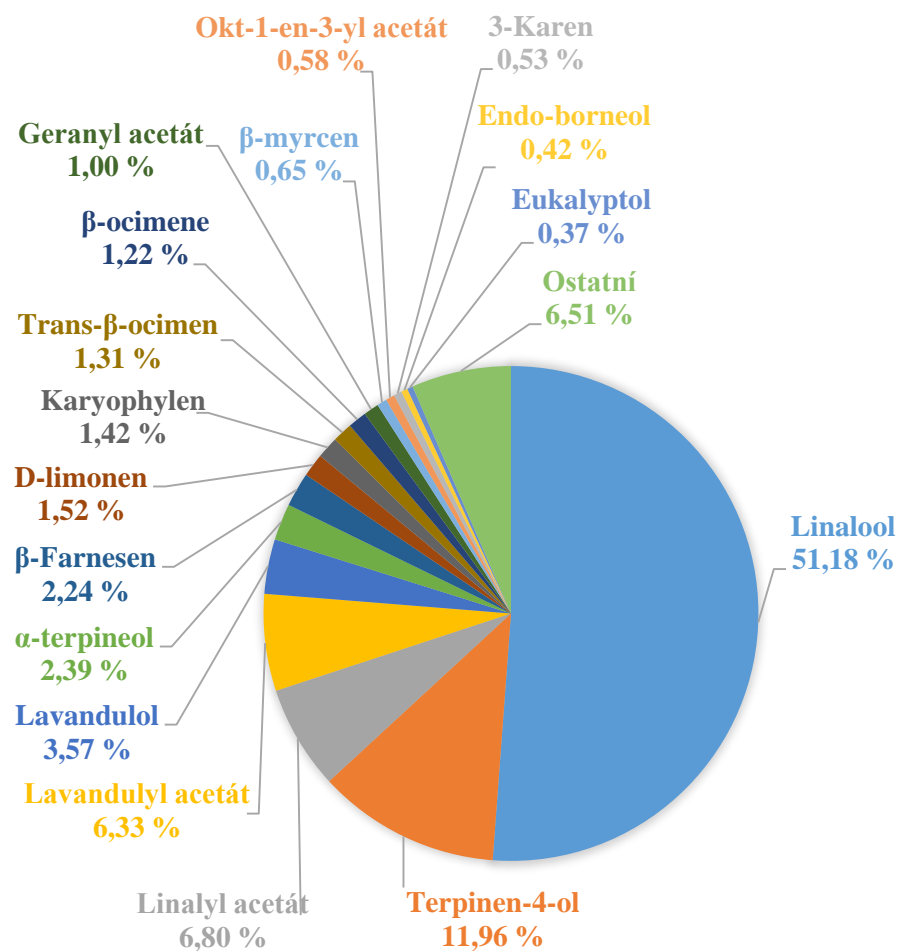
Na tomto místě se musíme omezit pouze na konstatování změn v zastoupení jednotlivých komponent, pokud bychom chtěli zjistit příčiny těchto změn, bylo by nutné provést podrobnější studii, která by brala v potaz například molekulárně genetické faktory změn exprese genů pro enzymy syntetizující tyto komponenty či se jinak podílející na jejich metabolismu a bylo by nutné zvážit také příslušné regulační mechanismy.

2014*

'BÍLÁ'

2015

Relativní zastoupení složek silice

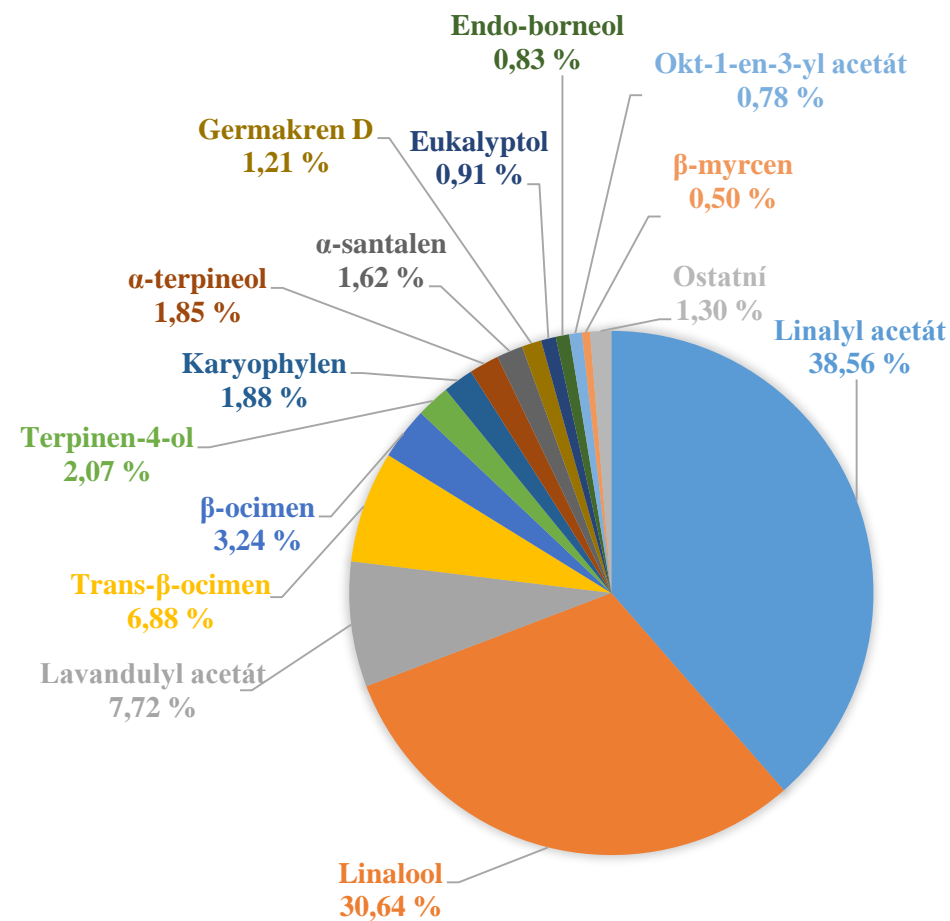
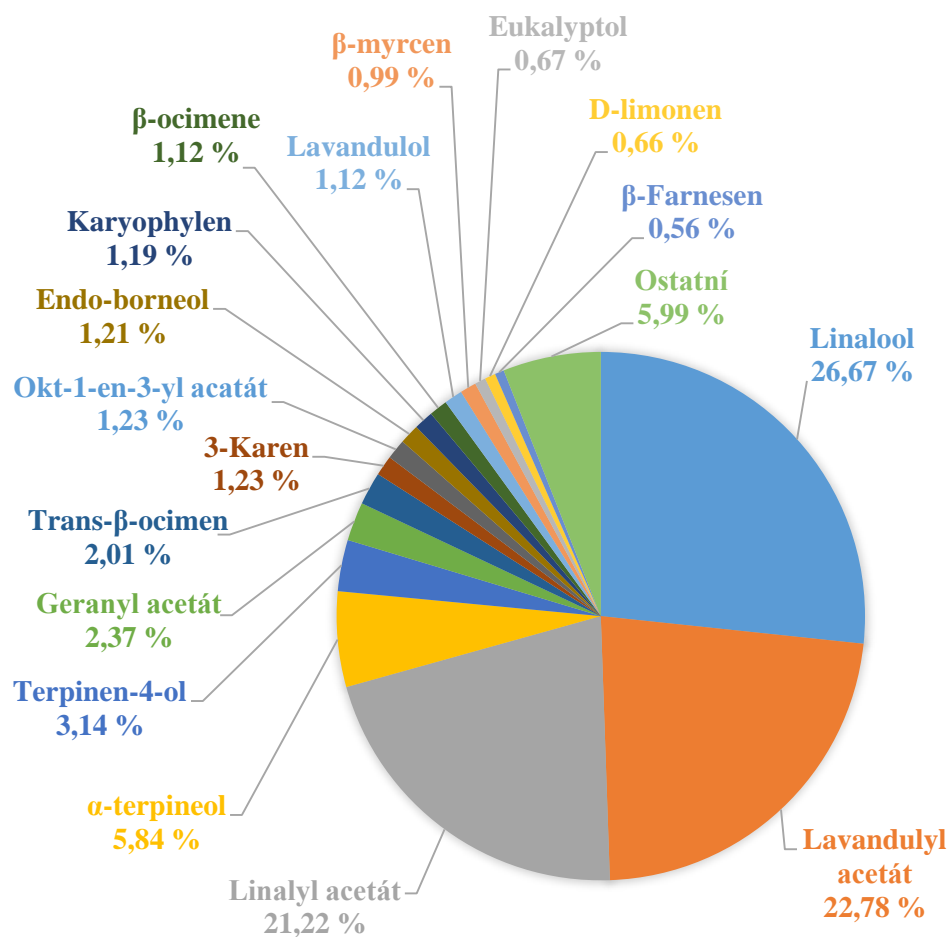


2014*

'KRAJOVÁ'

Relativní zastoupení složek silice

2015

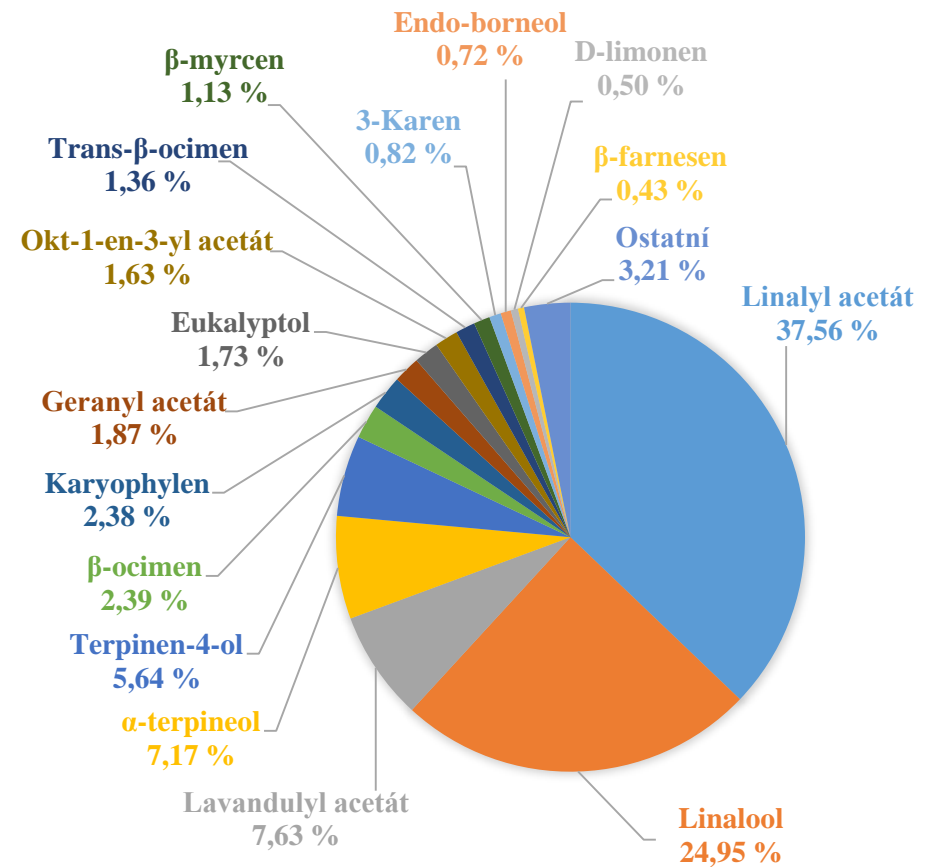
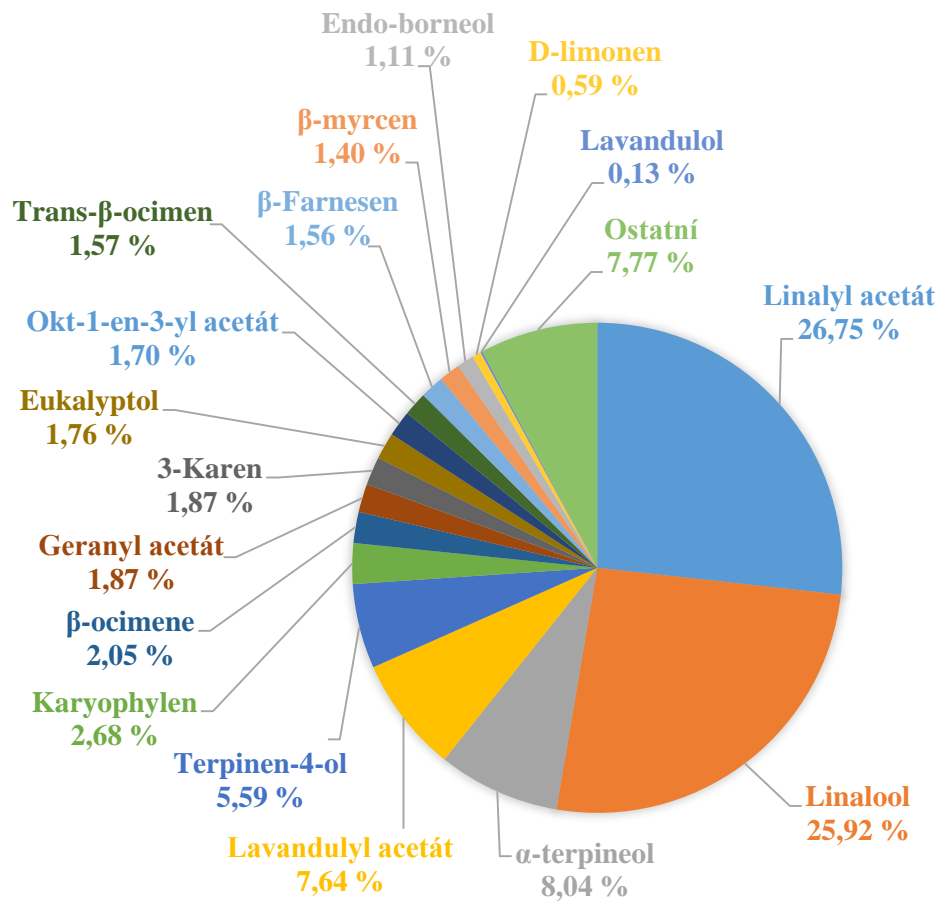


2014*

'BETA'

Relativní zastoupení složek silice

2015



2.3 Příprava extraktů

2.3.1 Použitá extrahovadla

Za účelem extrahování co nejširšího spektra obsahových látek byla zvolena extrahovadla rozdílné polarity. Míru polarity jsem zvažoval dle umístění extrahovadel v eluotropní řadě rozpouštědel (viz článek 1.2.1).

Bylo použito celkem pět druhů rozpouštědel, jak uvádí následující tab. 4.

Rozpouštědlo	Relativní permitivita ϵ_r	Druh extrakce
Destilovaná voda	80,1 (20 °C)*	Digesce
Methanol p.a. (Penta)	32,65 (25 °C)	Macerace
Ethylethanoát p.a. (Penta)	6,02 (25 °C)*	Macerace
Isopropanol p.a. (Penta)	19,92 (25 °C)	Macerace
Heptan p.a. (Penta)	1,92 (20 °C)	Macerace

Tab. 4: Extrahovadla použitá pro extrakci květů *L. angustifolia*, relativní permitivita převzata z [11]* a z [12]

2.3.2 Podmínky extrakce

Droga byla nanejvýš dvě hodiny před započnutím extrakce zhomogenizována do práškové podoby, aby extrakce probíhala za působení rozpouštědla na co největší plochu drogy. Vhodné podmínky extrakce levandulového květu se mi nepodařilo v dostupné literatuře dohledat, autoři studií často používali rozdílné postupy a rozpouštědla, přičemž málo kdy byl postup podrobněji rozveden. Proto jsem se rozhodl provádět extrakci daným rozpouštědlem vždy ve třech různých koncentracích drogy, abych zjistil, v jaké koncentraci získám extrakt s nejvyšší výtěžností.

Extrakce destilovanou vodou probíhala jako digesce – droga byla v baňce zalita vroucí vodou a ponechána za laboratorní teploty. Zbylá extrahovadla byla využita k maceraci – tzn., že celá extrakce probíhala za laboratorní teploty.

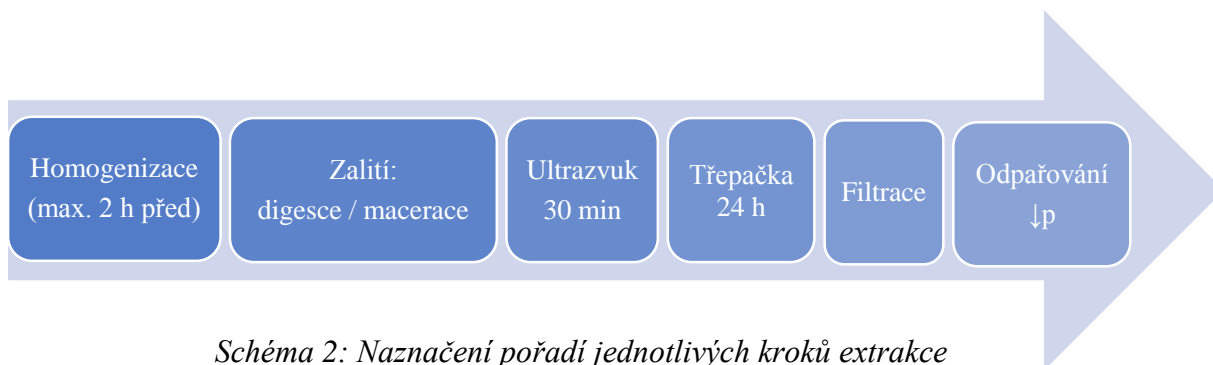


Schéma 2: Naznačení pořadí jednotlivých kroků extrakce

Bezprostředně po zalití drogy extrahovadlem byly baňky po dobu 30 min ultrazvukovány v ultrazvukové vaně Sonorex Digitec DT 103 H, BANDELIN electronic (Německo). Následovalo 24hodinové konstantní protřepávání na třepačce Multi PSU-20, Biosan (Lotyšsko), aby bylo zajištěno neustálé aktivní promíchávání fází.

Po ukončení doby extrakce byly extrakty zfiltrvány podtlakem ve filtrační baňce pomocí Büchnerovy nálevky, přičemž jsem dbal na jejich kvantitativní přenesení. Baňku a následně i přefiltrovanou drogu v Büchnerově nálevce za podtlaku jsem proplachoval užitým rozpouštědlem, aby byl extrakt co nejefektivněji přenesen.

2.3.3 Odpařování extrahovadla

Zfiltrované extrakty byly odpařeny na vakuové rotační odparce Hei-VAP Value, Heidolph (Německo) za sníženého tlaku (asi 5 mbar), čímž se snížil bod varu rozpouštědel, a tak byla omezena míra tepelné degradace účinných látek v extraktu. Podrobněji viz následující tab. 5.

Extrahovadlo	Teplota vodní lázně [°C]	Otáček za min
Voda	60	150
Methanol	40	
Ethylethanoát	60	
Isopropanol	50	
Heptan	40	

Tab. 5: Teplota vodní lázně odparky a počet otáček za minutu

Extrakt byly přeneseny z odpařovací baňky do skleněné uskladňovací vialky přímo pomocí špachtle a nedostupné zbytky extraktu byly z baňky vypláchnuty za pomoci rozpouštědla využitého k dané extrakci. Vypláchnutý rozpuštěný extrakt byl následně ve skleněné vialce zahříván na topné desce koncentrátoru (Thermo Scientific, USA), aby bylo rozpouštědlo postupně odpařováno a došlo přinejmenším k zakonzentrování roztoku extraktu. Pokud nebylo dosaženo úplného vytěknání rozpouštědla, zahuštěný rozpuštěný extrakt byl doodpařen proudem plynného dusíku. Takto získaný špachtlí nepřeveditelný zbytek extraktu byl opakovaně převažován, abych se ujistil, že došlo k úplnému odpaření rozpouštědla, a následně byl přidán ke špachtlí převedenému extraktu. Extrakt byly skladovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve skleněné skladovací vialce zadělané parafilmem.

2.3.4 Vyhodnocení extrakce a výběr vzorků pro testy biologické aktivity

Získané extrakt byly zváženy a pro každý z nich byla stanovena výtěžnost, což bylo možné, neboť během extrakce byly dodrženy zásady kvantitativního způsobu práce. Byl stanoven předpoklad, že extrakt získaný s největší výtěžností bude obsahovat největší množství látek s potenciální aktivitou, tudíž byl pro testy biologické aktivity vybrán od jednoho druhu rozpouštědla vždy extrakt s největší výtěžností, a proto, že v dané koncentraci drogy extrakce probíhala v triplikátu, jsem v důsledku testoval 3 x 5 extraktů v rámci screeningových testů.

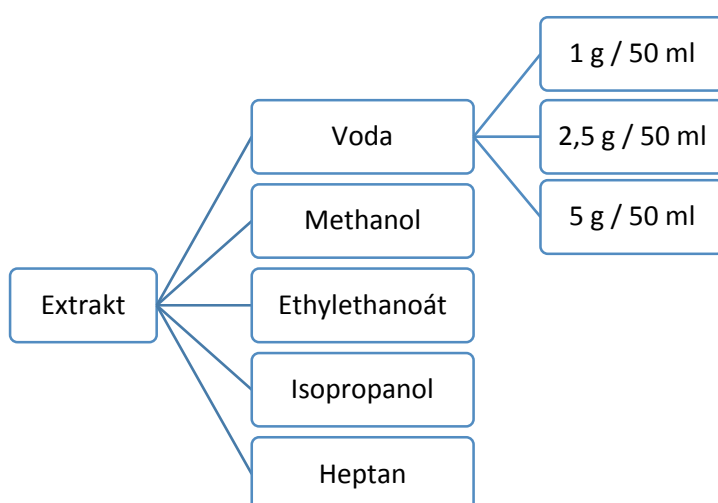


Schéma 3: Droga byla extrahována danými rozpouštědly vždy ve třech koncentracích (naznačeno pouze pro vodný extrakt)

Kultivar 'Bílá'					
Druh rozpouštědla	Objem rozpouštědla [ml]	Hmotnost drogy [g]	Koncentrace drogy [g/ml]	Průměrná hmotnost extraktu [mg]	Průměrná výtěžnost [%]
Voda vroucí	50	1	0,02	267,78 ± 9,52	26,78 ± 0,95
		2,5	0,05	499,75 ± 46,26	19,99 ± 1,85
		5	0,1	579,52 ± 60,24	11,59 ± 1,20
Methanol		1	0,02	194,55 ± 19,77	19,45 ± 1,98
		2,5	0,05	572,15 ± 32,40	22,89 ± 1,30
		5	0,1	909,34 ± 123,66	18,19 ± 2,47
Ethylethanoát		1	0,02	83,11 ± 8,29	8,31 ± 0,83
		2,5	0,05	210,87 ± 29,33	8,43 ± 1,17
		5	0,1	405,41 ± 38,64	8,11 ± 0,77
Isopropanol		1	0,02	85,42 ± 25,06	8,54 ± 2,51
		2,5	0,05	204,42 ± 12,73	8,18 ± 0,51
		5	0,1	457,84 ± 28,48	9,16 ± 0,57
Heptan		1	0,02	69,13 ± 15,55	6,91 ± 1,55
		2,5	0,05	28,95 ± 1,91	1,16 ± 0,08
		5	0,1	90,28 ± 10,47	1,81 ± 0,21

Tab. 6: Shrnutí výsledků extrakce květů kultivaru *L. angustifolia* 'Bílá'

Extrakce v každé ze tří koncentrací probíhala v triplikátu; modře vyznačeny extrakty s nejvyšší výtěžností, které byly dále využity ke screeningovému testu cytotoxicity na nádorové linii HeLa

Vzorek	Extrakční poměr [g/50 ml]	Koncentrace drogy [g/ml]	Hmotnost prázdné baňky [g]	Hmotnost baňky s extraktem [g]	VODA						
					Hmotnost extraktu [mg]	Průměrná hmotnost extraktu [mg]	Směrodatná odchylka [mg]	Procentuální výtěžnost [%]	Průměrná procentuální výtěžnost [%]	Směrodatná odchylka [%]	
A1			56,74823	57,27322	524,99				21,00		
A2	2,5	0,05	46,84621	47,28107	434,86	499,75	46,26	17,39	19,99	1,85	
A3			46,05299	46,5924	539,41			21,58			
B1			48,62169	49,20304	581,35			11,63			
B2	5	0,1	57,3935	57,89834	504,84	579,52	60,24	10,10	11,59	1,20	
B3			52,0722	52,72457	652,37			13,05			
C1			67,68966	67,96399	274,33			27,43			
C2	1	0,02	74,65066	74,90498	254,32	267,78	9,52	25,43	26,78	0,95	
C3			67,07976	67,35444	274,68			27,47			

Tab. 7: Záznam extrakce květů kultivaru *L. angustifolia* 'Bílá' – digesce vodou

Vzorek	Extrakční poměr [g/50 ml]	Koncentrace drogy [g/ml]	Hmotnost prázdné baňky [g]	Hmotnost baňky s extraktem [g]	METHANOL					
					Hmotnost extraktu [mg]	Průměrná hmotnost extraktu [mg]	Směrodatná odchylka [mg]	Procentuální výtěžnost [%]	Průměrná procentuální výtěžnost [%]	Směrodatná odchylka [%]
D1			48,32639	48,53756	211,17			21,12		
D2	1	0,02	67,08149	67,2872	205,71	194,55	19,77	20,57	19,45	1,98
D3			56,75074	56,91751	166,77			16,68		
E1			71,28	71,89108	611,08			24,44		
E2	2,5	0,05	65,61692	66,14867	531,75	572,15	32,40	21,27	22,89	1,30
E3			67,6934	68,26702	573,62			22,94		
F1			74,65161	75,44922	797,61			15,95		
F2	5	0,1	78,08305	79,16477	1081,72	909,34	123,66	21,63	18,19	2,47
F3			56,56696	57,41565	848,69			16,97		

Tab. 8: Záznam extrakce květů kultivaru *L. angustifolia* 'Bílá' – macerace v methanolu

ETHYLETHANOÁT										
Vzorek	Extrakční poměr [g/50 ml]	Koncentrace drogy [g/ml]	Hmotnost prázdné baňky [g]	Hmotnost baňky s extraktem [g]	Hmotnost extraktu [mg]	Průměrná hmotnost extraktu [mg]	Směrodatná odchylka [mg]	Procentuální výtěžnost [%]	Průměrná procentuální výtěžnost [%]	Směrodatná odchylka [%]
G1			78,08287	78,17638	93,51			9,35		
G2	1	0,02	74,65025	74,72346	73,21	83,11	8,29	7,32	8,31	0,83
G3			65,6156	65,69822	82,62			8,26		
I1			56,7461	56,92648	180,38			7,22		
I2	2,5	0,05	67,69127	67,94174	250,47	210,87	29,33	10,02	8,43	1,17
I3			71,2783	71,48005	201,75			8,07		
J1			48,32899	48,75003	421,04			8,42		
J2	5	0,1	56,56492	56,91717	352,25	405,41	38,64	7,04	8,11	0,77
J3			67,08059	67,52353	442,94			8,86		

Tab. 9: Záznam extrakce květů kultivaru *L. angustifolia* 'Bílá' – macerace v ethylethanoátu

ISOPROPANOL										
Vzorek	Extrakční poměr [g/50 ml]	Koncentrace drogy [g/ml]	Hmotnost prázdné baňky [g]	Hmotnost baňky s extraktem [g]	Hmotnost extraktu [mg]	Průměrná hmotnost extraktu [mg]	Směrodatná odchylka [mg]	Procentuální výtěžnost [%]	Průměrná procentuální výtěžnost [%]	Směrodatná odchylka [%]
K1			48,35032	48,40044	50,12			5,01		
K2	1	0,02	71,2781	71,38383	105,73	85,42	25,06	10,57	8,54	2,51
K3			78,0797	78,18011	100,41			10,04		
L1			56,56377	56,77252	208,75			8,35		
L2	2,5	0,05	56,74824	56,96564	217,4	204,42	12,73	8,70	8,18	0,51
L3			74,6643	74,85142	187,12			7,48		
M1			67,6914	68,11738	425,98			8,52		
M2	5	0,1	65,6167	66,11182	495,12	457,84	28,48	9,90	9,16	0,57
M3			67,08016	67,53259	452,43			9,05		

Tab. 10: Záznam extrakce květů kultivaru *L. angustifolia* 'Bílá' – macerace v isopropanolu

Vzorek	Extrakční poměr [g/50 ml]	Koncentrace drogy [g/ml]	HEPTAN								
			Hmotnost prázdného flakonku [g]	Hmotnost flakonku s extraktem [g]	Hmotnost extraktu [mg]	Průměrná hmotnost extraktu [mg]	Směrodatná odchylka [mg]	Procentuální výtěžnost [%]	Průměrná procentuální výtěžnost [%]	Směrodatná odchylka [%]	
N1			21,88239	21,97328	90,89				9,09		
N2	1	0,02	21,87408	21,92959	55,51	69,13	15,55	5,55	6,91	1,55	
N3			20,7299	20,79089	60,99			6,10			
O1			21,27476	21,30239	27,63			1,11			
O2	2,5	0,05	21,63326	21,66491	31,65	28,95	1,91	1,27	1,16	0,08	
O3			20,66953	20,6971	27,57			1,10			
P1			21,78432	21,88504	100,72			2,01			
P2	5	0,1	21,04317	21,13733	94,16	90,28	10,47	1,88	1,81	0,21	
P3			21,87022	21,94619	75,97			1,52			

Tab. 11: Záznam extrakce květů kultivaru L. angustifolia 'Bílá' – macerace v heptanu

2.4 Testování biologické aktivity

U triplikátů extraktů připravených z pěti druhů rozpouštědel byla v rámci screeningových testů stanovena hodnota poloviny maximální inhibiční koncentrace fluorimetrickou esejí za použití Calceinu AM a dále byl u vybraných extraktů zjištěn inhibiční vliv na sodno-draselnou pumpu pomocí Baginského ATPasového testu měřením absorbance. Následně jsem se zaměřil na extrakty, které vykazovaly aktivitu, a opětovně jsem provedl optimalizovanou extrakci, tzn. již za použití postupu poskytujícího největší výtěžnost.

2.4.1 Testy cytotoxicity extraktů

2.4.1.1 Příprava a skladování roztoků extraktů pro testy biologické aktivity

Každý z vybraných extraktů byl rozpuštěn ve směsi složené z 80 % tris-(hydroxymethyl)-aminomethanu a z 20 % methanolu na zásobní koncentraci 75 mg/ml. Zásobní roztoky byly rovněž skladovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v eppendorfkách zajištěných parafilmem, aby byl minimalizován nežádoucí odpar. Rozředování extraktů vodou do požadované koncentrace probíhalo bezprostředně před jejich testováním a předcházelo mu ultrazvukové promíchání s následným zcentrifugováním na stolní centrifuze, aby došlo k usazení nerozpuštěných částic v extraktu.

2.4.1.2 Buněčné linie a kultivační podmínky

Kultivační médium DMEM (Sigma-Aldrich, D5523) obsahovalo přídavek fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich), přidaný L-glutamin (Sigma-Aldrich) a antibiotickou směs Penicillin-Streptomycin o koncentraci penicilinu 10 000 U/ml a streptomycinu 10 mg/ml (Sigma-Aldrich). Veškeré použité buněčné linie byly zakoupeny od ATCC a jejich kultivace probíhala v inkubátoru za konstantní teploty $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v atmosféře 5 % CO_2 s relativní vlhkostí dosahující 100 %.

2.4.1.3 Fluorimetrická esej Calcein AM

Do každé jamky bylo přidáno 100 µl roztoku Calceinu AM (Sigma-Aldrich, 17783 SIGMA) o koncentraci 1 mg/ml, rozpuštěno v pufovaném fyziologickém roztoku PBS. Buňky byly inkubovány po dobu jedné hodiny, a následně proběhlo fluorimetrické měření na přístroji Fluoroskan (Labsystems, Finsko) – nastavena byla excitační vlnová délka 495 nm a emisní vlnová délka 515 nm za daných podmínek příslušející Calceinu vzniklému v živých buňkách působením endogenních esteráz na prekurzor Calcein AM.

2.4.1.4 Selektování vhodných extraktů – screeningové testy

Abych zjistil, který z extraktů vykazuje měřitelnou cytotoxicitu, tedy na který z extraktů se mám dále podrobněji zaměřit, provedl jsem screeningové měření buněčné viability linie HeLa po 72hodinové inkubaci se získanými extrakty. Celkem bylo testováno šest různých koncentrací extraktu, a to v triplicátu – na základě těchto měření byla vypočtena hodnota poloviny maximální inhibiční koncentrace – IC_{50} , která nám říká, že při dané koncentraci extraktu se množství buněk omezí právě na polovinu oproti kontrole. Můžou zde hrát roli faktory jak antiproliferační, tak i cytotoxické.

Extrakty s měřitelnou hodnotou IC_{50} jsou v tab. 12 vyznačeny modrou barvou – účinné byly tedy pouze extrakty vodné a methanolové, na které jsem se proto v průběhu další práce zaměřil podrobněji.

Aktivita heptanových extraktů byla v rámci testovaných koncentrací neměřitelná, avšak i tak je nutné poznamenat, že k tomuto výsledku musíme přistupovat pouze orientačně, neboť heptanový extrakt nebyl v použité směsi 80 % TRIS : 20 % MeOH velice málo rozpustný.

HeLa		
Rozpouštědlo	Vzorek	IC_{50} [µg/ml]
Voda	C1	> 500
	C2	330
	C3	233
Methanol	E1	458
	E2	377
	E3	194
Ethylethanoát	I1	> 500
	I2	> 500
	I3	> 500
Isopropanol	M1	> 500
	M2	> 500
	M3	> 500
Heptan	N1	> 500
	N2	> 500
	N3	> 500

Tab. 12: Hodnoty poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) kultivaru *L. angustifolia* 'Bílá' ve screeningových testech na nádorové linii HeLa

Modře vyznačeny účinné extrakty

c ₁	500
c ₂	166,67
c ₃	55,56
c ₄	18,52
c ₅	6,17
c ₆	2,06

Tab. 13: Hodnoty koncentrací extraktů testovaných na buněčných liniích, pro každou koncentraci probíhalo měření vždy v triplicátu

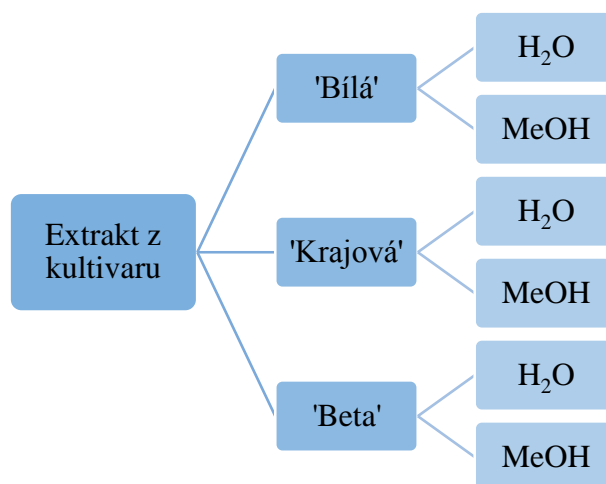


Schéma 4: Příprava vodných a methanolových extraktů z květů tří kultivarů *L. angustifolia* ('Bílá', 'Krajová' a 'Beta')

2.4.1.5 Příprava vodných a methanolových extraktů

Screeningové testy ukázaly, že ze všech extraktů připravených z květů kultivaru 'Bílá' vykazují na linii HeLa za daných podmínek měřitelný cytotoxický efekt pouze extrakty vodné a methanolové. Na základě těchto zjištění jsem se rozhodl dále se zaměřit právě na extrakt vodný a methanolový a porovnat cytotoxický účinek extraktů ze třech kultivarů mezi sebou. Za tímto účelem byly zmíněné extrakty připraveny ve větším množství, než poskytla screeningová extrakce, aby byl minimalizován velký rozptyl v hodnotách IC₅₀, který byl navzdory důkladné homogenizaci drogy pozorován mezi extrakty kultivaru 'Bílá' v rámci jednoho triplicátu získaného stejným postupem (viz tab. 12). Lze totiž předpokládat, že se s větším množstvím extrahované drogy některé odchylky ve složení extraktu projeví méně, než je tomu mezi několika extrakty připravenými z menších množství té samé drogy.

Schéma průběhu extrakce a výsledky uvádím níže v tab. 14. Srovnání výsledků výtěžnosti extrakce drogy uvádím v tab. 15.

Kultivar	Rozpouštědlo		Navážka drogy [g]	Koncentrace drogy [g/ml]	Množství extraktu [mg]	Výtěžnost [%]
	Druh	Množství [ml]				
'Bílá'	H ₂ O	250	5	0,02	1 446,03	28,92
	MeOH	250	12,5	0,05	2 427,50	19,42
'Krajová'	H ₂ O	250	5	0,02	1 335,81	26,72
	MeOH	250	12,5	0,05	2 617,97	20,94
'Beta'	H ₂ O	250	5	0,02	1 369,80	27,40
	MeOH	250	12,5	0,05	2 878,65	23,03

Tab. 14: Záznam a výsledky extrakce květů tří kultivarů *L. angustifolia* ('Bílá', 'Krajová' a 'Beta') připravených metodou s nejvyšší výtěžností zjištěnou pro kultivar 'Bílá'

	Výtěžnost [%]	
	Extrakt vodný	Extrakt methanolový
Předpokládaný výtěžek	26,78 ± 0,95	22,89 ± 1,30
'Bílá'	28,92	19,42
'Krajová'	26,72	20,94
'Beta'	27,40	23,03

Tab. 15: Srovnání výtěžností extrakce květů tří kultivarů *L. angustifolia* ('Bílá', 'Krajová' a 'Beta') s předpokládanou výtěžností zjištěnou v rámci screeningových testů kultivaru 'Bílá'

2.4.1.6 Cytotoxicita vodných a methanolových extraktů

Extrakty vodné a methanolové získané ze třech kultivarů byly ve dvou kolech otestovány na cytotoxicitu na buněčné linii prsního adenokarcinomu, MCF7, za dodržení výše popsaného schématu. Výsledky měření shrnuje tab. 16 uvedená níže. V některých případech nebyla hodnota IC₅₀ měřitelná – jedná se o vodné extrakty kultivarů 'Bílá' a 'Beta' a methanolový extrakt kultivaru 'Beta' v prvním kole testů. Je vidět, že aktivita extraktů kultivaru 'Beta' je velmi nízká, ve třech čtvrtinách případů nebyla vůbec měřitelná a v onom jednom případě se hodnota IC₅₀ blížila nejvyšší testované koncentraci 500 µg/ml. Co se týče kultivaru 'Krajová', aktivní byl pouze methanolový extrakt a nejvyšší cytotoxicity dosáhl extrakt kultivaru 'Krajová', a to jak vodný, tak i methanolový

Rozpouštědlo	MCF7			
	Kultivar	IC ₅₀ [µg/ml]		
		I. test	II. test	Průměrná hodnota
Voda	'Bílá'	> 500	> 500	> 500
	'Krajová'	148,3	392,4	270,4
	'Beta'	> 500	> 500	> 500
Methanol	'Bílá'	334,5	462,3	398,4
	'Krajová'	496	330,2	413,1
	'Beta'	> 500	486,9	/

Tab. 16: Hodnoty poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC₅₀) extraktů tří kultivarů *L. angustifolia* ('Bílá', 'Krajová' a 'Beta') v testech na nádorové linii MCF7 (modře vyznačeny dále zkoumané účinné extrakty)

Z provedených testů na linii MCF7 se tedy jako nejvíce účinné jevíly extrakt vodný kultivaru 'Krajová' a extrakty methanoloové kultivaru 'Bílá' a 'Krajová'. Jakožto u nejvíce aktivních látek z celého souboru doposud testovaných vzorků u nich byl prověřen cytotoxický účinek taktéž na nenádorové kontrole. Tento krok je velice důležitý k tomu, aby se zjistilo, jak látka vykazující inhibiční účinek na růst nádorových linií působí na zdravé buňky, zda například není více toxická pro nenádorové linie než vlastní nádorové buňky. Takový případ by byl z hlediska kýženého účinku nepříznivý, protože vhodná látka by měla být naopak co nejselektivnější vůči nádorovým liniím.

Výsledky testů ověřujících aktivitu vybraných účinných extraktů ukazuje tab. 17. Zde jsou zaznamenány hodnoty IC₅₀ jak pro nenádorovou kontrolu – lidské pokožkové fibroblasty BJ, tak i pro maligně transformované kožní epitelální buňky – melanom linie G-361.

Nejtoxičtější působil na fibroblasty extrakt vodný kultivaru 'Krajová', následovaly methanoloové extrakty – kultivaru 'Krajová' s dvakrát vyšší toxicitou oproti kultivaru 'Bílá'. Co se týče výsledků na melanomové linii G-361, blízko hranice maximální testované koncentrace dosáhla hodnota IC₅₀ methanoloového extraktu kultivaru 'Bílá', u zbylých dvou extraktů nebyla hodnota IC₅₀ na této linii detekovatelná.

Kultivar (rozpouštědlo)	IC ₅₀ [µg/ml]	
	BJ	G-361
'Krajová' (voda)	194	> 500
'Krajová' (methanol)	221	> 500
'Bílá' (methanol)	442	484

Tab. 17: Hodnoty poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC₅₀) vybraných extraktů v testech na lidských fibroblastech BJ jako nenádorové kontrole a na maligně transformovaných epiteliálních buňkách melanomové linie G-361

Přestože se oba buněčné typy vyskytují v jednom orgánu, a to v kůži, pozorujeme zde v případě kultivaru 'Krajová' významný rozdíl v cytotoxicitě. Pokud u kultivaru 'Krajová' zase srovnáme testy na stejných buněčných typech, epiteliálních buňkách, ale z různých orgánů, zjistíme i zde značné rozdíly hodnot IC₅₀ (G-361: vodný i methanolvý extrakt > 500 µg/ml; MCF7: vodný extrakt 270,4 µg/ml, methanolvý extrakt 413,1 µg/ml). Je známo, že proces maligní transformace je spojen s rozsáhlými fenotypovými změnami a jistou mírou dediferenciace nádorových buněk, která se navíc umocňuje kultivací v *in vitro* podmínkách, proto musíme brát takové srovnání s nadsázkou. Uvážíme-li průměrné hodnoty IC₅₀ z testů na linii MCF7, tak nám vyjde, že nejvíce účinné jsou oba druhy extraktů kultivaru 'Krajová' na fibroblastech BJ, které však byly využity jako nenádorová kontrola měření cytotoxicity.

2.4.2 Vliv extraktů na aktivitu Na⁺/K⁺-ATPasy

U vybraných extraktů ze screeningových testů byl studován jejich vliv na ATPasovou aktivitu Na⁺/K⁺-ATPasy pomocí Baginského testu. Jednalo se o extrakt vodný, ethylethanoátový a heptanový. Protože jsem se potýkal během přípravy roztoků heptanového extraktu se zhoršenou rozpustností ve směsi tvořené 80 % TRIS a 20 % methanolu, rozhodl jsem se heptanový extrakt rozpustit v dimethylsulfoxidu (DMSO). Koncentrace DMSO v testovacích jamkách nedosahovala takové míry, aby pumpu inhibovalo samotné rozpouštědlo.

2.4.2.1 Baginského test ATPasové aktivity

Metoda měření ATPasové aktivity probíhala dle Baginského testu popsaného v publikaci Kubala et al., *Frontiers in Physiology*, in press. Princip testu popisují v teoretické části mé práce v článku 1.4.

2.4.2.2 Vyhodnocení aktivity Na⁺/K⁺-ATPasy

Změřené hodnoty relativní aktivity ouabain-senzitivní Na⁺/K⁺-ATPasy jsou shrnuty v tab. 17 a 18. Všechny extrakty inhibovaly do určité míry ATPasovou aktivitu Na⁺/K⁺-ATPasy. Zajímavé je, že při testování 3krát nižší koncentrace vodného extraktu došlo k dalšímu poklesu ATPasové aktivity asi o 1/4. To odporuje úvaze, že při ubrání inhibitoru by aktivita pumpy měla být větší. Avšak při podrobnějším prozkoumání směrodatných odchylek a uvážení mezních hodnot můžeme dostat pokles o pouhých 4 %, navíc byl test s koncentrací vodného extraktu 166 µg/ml proveden pouze v jedné sérii čtyř měření na rozdíl od tří sérií čtyř měření v případě koncentrace 500 µg/ml, takže by měl být správně srovnán průměr ze stejného počtu sérií a je nutné provést více měření. Další testy by poté měly jednoznačně výsledky zpřesnit, anebo stanovit, zda se nemůže jednat o chybu. Podstatnější informací je, že všechny extrakty prokazatelně snižují aktivitu enzymu, a můžeme tedy stanovit hypotézu, že za některé z biologických účinků těchto levandulových extraktů může být zodpovědný inhibiční účinek na Na⁺/K⁺-ATPasu. Vzhledem k tomu, že je v literatuře popsán vliv levandulových extraktů na neurony a mozkovou činnost, pro které je činnost Na⁺/K⁺-ATPasy esenciální, jedná se o velice podnětnou oblast dalšího bádání.

Extrakt [500 µg/ml]	Aktivita [%]	Průměrná aktivita [%]
Voda	71,56 ± 11,73	69,64 ± 10,65
	70,03 ± 12,38	
	67,32 ± 8,14	
Ethylethanoát	49,32 ± 6,25	49,29 ± 6,16
	46,31 ± 6,02	
	52,25 ± 4,44	
Heptan	49,83 ± 9,27	49,75 ± 7,04
	48,39 ± 7,44	
	51,02 ± 5,45	

Tab. 18: Aktivita Na⁺/K⁺-ATPasy inhibované vodným, ethylethanoátovým a heptanovým extraktem v koncentraci 500 µg/ml

Extrakt [166,7 µg/ml]	Aktivita [%]
Horkovodný	51,02 ± 5,45

Tab. 19: Aktivita Na⁺/K⁺-ATPasy inhibované vodným extraktem v koncentraci 166,7 µg/ml

3 DISKUZE

V této části uvádím několik poznatků, které vzešly během praktické části mé práce, a je nutné, abych se na ně v průběhu dalšího výzkumu zaměřil.

Screeningové testy zahrnovaly biologické triplikáty (tzn., tři zástupce extraktu získaného za dané koncentrace drogy), u kterých bylo možné efektivně porovnávat účinek, avšak zjištěné hodnoty IC_{50} na nádorové linii HeLa měly i v rámci triplikátu poměrně velký rozptyl. Za účelem omezit zjištěné rozdíly byla provedena druhá extrakce, již za optimalizovaných podmínek a pouze za použití rozpouštědel poskytujících aktivní extrakty. Na tomto místě by bylo pro validnější výsledky dobré opět připravit extrakt v biologickém triplikátu. V rámci časových možností a značné nákladnosti takových testů s neodhadnutelným výsledkem tak nebylo učiněno a rozhodl jsem se nejprve otestovat jeden daný extrakt a v případě prokázání významné aktivity bych provedl extrakci a testování jeho biologického triplikátu.

Rozpustnost heptanového extraktu ve směsi tvořené z 80 % TRIS a 20 % methanolem byla velice nízká, proto nelze považovat uvedenou testovanou koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ za relevantní a bylo by žádoucí testy opakovat za použití DMSO jako rozpouštědla. Rozpustnost heptanového extraktu v DMSO byla potvrzena v průběhu přípravy roztoku extraktu pro Baginského test.

Pokud by se v navazujících testech inhibice Na^+/K^+ -ATPasy, které se chystám provést s optimalizovanými vodnými a methanolovými extrakty květů tří kultivarů *L. angustifolia* – 'Beta', 'Krajová' a 'Bílá', prokázala jejich významnější účinnost, rád bych provedl frakcionaci aktivních extraktů s účelem najít jejich nejúčinnější složky.

4 ZÁVĚR

Práce přináší hned několik zásadních poznatků na poli výzkumu levandulových extraktů. Je možné si všimnout jejího rozdělení do dvou rovin – screeningové testy zahrnující hledání optimální koncentrace extrahované drogy, kterou byl květ *L. angustifolia* 'Bílá', a následné testy s novými extrakty připravenými ve větším poměru při nalezené optimální koncentraci a to pro případ tří kultivarů *L. angustifolia* – 'Beta', 'Krajová' a 'Bílá', abych mohl výsledky vzájemně porovnat. Druhé kolo extrakce bylo provedeno za účelem snížení variability ve složení extraktů, která stála nejspíš za vyššími rozdíly v hodnotách IC_{50} v rámci triplikátu vybraného screeningového extraktu měřených na nádorové linii HeLa.

Nenašel jsem studii, která by se zabývala podrobně designem extrakce, vždy byl uveden pouze užitý postup bez srovnání jeho provedení za různých podmínek, autoři se tedy nezabývali tím, zda se jedná o jeho ideální variantu. Ve své práci mě právě tato otázka zajímala, a proto jsem se zaměřil na to, jak ovlivní různá koncentrace drogy tvořené květem *L. angustifolia* 'Bílá' extrahované celkem v pěti rozpouštědlech výslednou výtěžnost daného extrakčního postupu, a také na to, zda se ideální koncentrace, při které proběhne extrakce s nejvyšší výtěžností, bude u jednotlivých rozpouštědel lišit. Zároveň se následovnou druhou extrakcí ozkoušela přesnost odhadované výtěžnosti daného extrakčního postupu vypočítané na základě screeningových testů.

U extraktů připravených právě za této optimální koncentrace drogy byly dále v rámci screeningových testů zjištěny hodnotách IC_{50} na nádorové linii HeLa. Veškerá měření buněčné viability probíhala fluorimetrickou esejí s Calceinem AM. Na základě měřitelné toxicity jsem vyselekoval extrakt vodný a methanolový, na který jsem se v práci dál zaměřil. Provedl jsem extrakci v režimu nejvyšší výtěžnosti, tentokrát celkem tří kultivarů *L. angustifolia* – 'Beta', 'Krajová' a 'Bílá'. Následně byla testy cytotoxicity na nádorové linii MCF7 vyjádřené v hodnotách IC_{50} zjištěna aktivita jednotlivých extraktů.

Z těchto testů vyšly jako nejvíce účinné oba extrakty kultivaru 'Krajová' a methanolový extrakt kultivaru 'Bílá', proto u nich byla zjišťována také toxicita na nenádorové kontrole, fibroblastech BJ lidské pokožky. Druhou nádorovou linií vedle linie MCF7 byla v této fázi testování zařazená melanomová linie G-361. Za kultivar poskytující nejúčinnější extrakty vyplynul z provedených testů kultivar 'Krajová', který

však byl z linií MCF7, G-361 a BJ nejtoxičtější právě pro zdravé buňky, fibroblasty BJ, což není příznivé z hlediska dalšího potenciálního praktického využití tohoto extraktu jako cytostaticky působící přírodní látky.

Vodný, ethylethanoátový a heptanový extrakt získaný v rámci screeningové části mé práce byly zkoumány v ohledu jejich inhibičního účinku na Na^+/K^+ -ATPasu, který byl stanovován jako míra ATPasové aktivity Baginského testem. Každý extrakt snižoval aktivitu enzymu. Nejsem obeznámen se studií, která by se zabývala vlivem levandulových extraktů na Na^+/K^+ -ATPasu a domnívám se tedy, že se jedná o vůbec první výsledky na tomto poli, které se navíc jeví velmi nadějně z hlediska další možné návaznosti výzkumu.

Obecně lze shrnout, že vodné a methanolové extrakty kultivarů *L. angustifolia* – 'Beta', 'Krajová' a 'Bílá' ve většině případů v rámci provedených testů vykazují cytotoxický účinek, avšak hodnota IC_{50} na nádorových liniích je z hlediska možné návaznosti výzkumu příliš vysoká a ve srovnání s tím byla navíc změřena vyšší míra toxicity na nenádorové kontrole. Zajímavějším cílem dalšího studia se jeví spíše inhibiční účinek extraktů *L. angustifolia* na ATPasovou aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy, čímž by bylo možné přispět k vysvětlení některých pozorovaných biologických účinků levandulových extraktů, které by mohly souviset s činností tohoto enzymu. Dalšímu výzkumu cytotoxicity a inhibičního vlivu se hodlám zcela jistě věnovat.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A DALŠÍCH ZDROJŮ INFORMACÍ

Literární zdroje:

- [13] C. SKOU, Jens. The Identification of the Sodium-Potassium Pump. *Nobel Lecture*. Nobel Media, 1997, 179–194.
- [17] GELETIČOVÁ, Jaroslava. *Sledování elektrostatického potenciálu na povrchu biomolekul*. Olomouc, 2013. Diplomová práce. Univerzita Palackého. Vedoucí práce Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph. D.
- [22] HEGER, Tomáš. *Vzájemné porovnání GC-MS rozborů silic tří odrůd levandule (Lavandula angustifolia Mill.) a jejich antiproliferačních účinků*. Olomouc, 2015. Středoškolská odborná činnost. Slovanské gymnázium. Vedoucí práce Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
- [19] KAPLAN, Jack H. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual review of biochemistry*. 2002, **71**, 511–535. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218.
- [21] KATZ, Adriana, Yael LIFSHITZ, Elizabeta BAB-DINITZ, Einat KAPRI-PARDES, Rivka GOLDSHLEGER, Daniel M. TAL a Steven J. D. KARLISH. Selectivity of Digitalis Glycosides for Isoforms of Human Na,K-ATPase. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 2010, **285**(25), 19582–19592. DOI: 10.1074/jbc.M110.119248.
- [18] KUBALA, Martin, Lenka GRÝCOVA, Zdenek LANSKY, Petr SKLENOVSKY, Marika JANOVSKA, Michal OTYEPKA a Jan TEISINGER. Changes in Electrostatic Surface Potential of Na⁺/K⁺-ATPase Cytoplasmic Headpiece Induced by Cytoplasmic Ligand(s) Binding. *Biophysical Journal*. 2009, **97**(6), 1756–1764. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.07.002.

[14] JANOVSká, Marika. *Interaction of small organic molecules with the sodium pump*. Olomouc, 2010. Disertační práce. Univerzita Palackého. Vedoucí práce RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

[4] SEIFERT, Bohumil, Blanka POSPÍŠILOVá, Eva JIRSOVá a Doubravka KOŠŤáLOVá. KLINICKÉ HODNOCENÍ LÉKŮ – I. ČÁST. *InfoLISTY*. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2015, (01), 1–3.

[16] SHINODA, T., H. OGAWA, F. CORNELIUS a C. TOYOSHIMA. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature*. 2009, **459**(7245), 446–450. DOI: 10.1038/nature07939.

[1] ŠEJDA, Jan, Zdeněk ŠMERHOVSKÝ a Dana GÖPFERTOvÁ. *Výkladový slovník epidemiologické terminologie*. 1. vydání. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1068-4.

[15] Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012, **32**(7), 1222–1232. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.35.

[8] VEERESHAM, Ciddi. Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2012, **3**(4), 200–201. DOI: 10.4103/2231-4040.104709.

Internetové zdroje:

[11] Dielectric Constant. *LSU Macromolecular Studies Group* [online]. Louisiana: Louisiana State University, 2015 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Dielectric%20Constant%20.htm>

[12] 2.6.5 Dielectric properties of materials. *Kaye and Laby* [online]. Teddington: National Physical Laboratory, 2016 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: http://www.kayelaby.npl.co.uk/general_physics/2_6/2_6_5.html

- [9] Encyklopedie SÚKL: Jak se schvalují tradiční rostlinné léky a co všechno do této skupiny spadá? *O léčích* [online]. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2016 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://www.olecich.cz/encyklopedie/jak-se-schvaluji-tradicni-rostlinne-lecive-pripravky-a-co>
- [20] Glykosidy: Kardioaktivní glykosidy. *Přírodní látky* [online]. Nový Bydžov, 2001 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://naturstuff.sweb.cz/chemdir/glykofarm.html>
- [5] Kolik stojí vývoj nového léku? *Moje medicína: Průvodce světem medicíny* [online]. 2016 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <https://www.mojemedicina.cz/pro-lekare/leciva/ekvivalence-a-identita/kolik-stoji-vyvoj-noveho-leku/>
- [2] Learn About Clinical Studies. *ClinicalTrials.gov* [online]. USA: National Library of Medicine, 2015 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn#wrapper>
- [7] Lecithin Side Effects. *Drugs* [online]. 2016 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/sfx/lecithin-side-effects.html>
- [3] Od myšlenky k vynálezu: Vývoj nového léku. *Moje medicína: Průvodce světem medicíny* [online]. 2016 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <https://www.mojemedicina.cz/pro-pacienty/lecba/od-myslenky-k-vynalezu-vyvoj-noveho-leku/>
- [6] Vancomycin Side Effects. *Drugs* [online]. 2016 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/sfx/vancomycin-side-effects.html>
- [10] WEIR, William a Kathleen MEGAN. Investigation Finds UConn Professor Fabricated Research: Work Focused On Health Benefits Of Resveratrol, An Antioxidant In Red Wine. *The Hartford Courant* [online]. Hartford, 2012, , 1–3 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: http://articles.courant.com/2012-01-12/health/hc-uconn-researcher-fabrications-0112-20120111_1_investigation-health-benefits-university-of-connecticut-researcher