

# Účinek extraktu *Macleaya cordata* (Willd) R.Br. na expresi markerů zánětu a oxidačního stresu v gingiválních fibroblastech

(Původní práce – experimentální studie)

## Effect of *Macleaya Cordata* (Willd )R.Br. Extract on Expression of Inflammatory Markers and Oxidative Stress in Gingival Fibroblasts

(Original Article – Experimental Study)

Chytilová K.<sup>1</sup>, Galandáková A.<sup>2</sup>, Pazdera J.<sup>1</sup>, Rajnochová Svobodová A.<sup>2</sup>, Šimánek V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, LF UP a FN, Olomouc

<sup>2</sup>Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP, Olomouc

### SOUHRN

**Úvod:** *Macleaya cordata* (Willd.) obsahuje kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Alkaloidový extrakt *M. cordata* (MCE) je znám pro své antimikrobiální a protizánětlivé účinky a je užíván jako aktivní složka v přípravcích ústní hygieny.

**Cíl práce:** Práce se zabývá ověřením účinku MCE na zánětlivou reakci a oxidační stres vyvolaný v lidských gingiválních fibroblastech působením bakteriálního lipopolysacharidu (LPS).

**Materiál a metodika:** Účinek MCE (0,01–10 µg/ml) na viabilitu lidských gingiválních fibroblastů byl hodnocen stanovením inkorporace neutrální červeně do buněk. Netoxické koncentrace extraktu (0,25 a 0,5 µg/ml) byly použity pro studium vlivu MCE na hladinu redukováného glutathionu (GSH), produkci reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS), expresi cyklooxygenázy-2 (COX-2) a interleukinu-6 (IL-6) v buňkách vystavených působení LPS.

**Výsledky:** Působením obsahových složek MCE došlo u gingiválních fibroblastů vystavených LPS ke zvýšení intracelulárního GSH, snížení produkce ROS a k redukci exprese IL-6 a COX-2.

**Závěr:** Alkaloidový extrakt *M. cordata* potlačil zánětlivou reakci a oxidační stres v lidských gingiválních fibroblastech a může být prakticky využit při ošetření parodontitid a alveolitid.

**Klíčová slova:** *Macleaya cordata* – protizánětlivý účinek – antioxidační účinek – reaktivní kyslíkové sloučeniny – glutathion – lipopolysacharid – interleukin-6 – cyklooxygenáza-2

### SUMMARY

**Introduction:** *Macleaya cordata* (Willd.) contains quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine. The alkaloid extract of *M. cordata* (MCE) is known for its antimicrobial and anti-inflammatory activities and thus is used as an active component in dental care products.

**Aim of work:** The study examined the effects of MCE on lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in human gingival fibroblasts.

**Material and Methods:** The effect of MCE (0.01–10 µg/ml) on human gingival fibroblasts viability was evaluated using neutral red incorporation in the cells. Non-toxic concentrations of the extract (0.25 and 0.5 µg/ml) were used for evaluation of MCE effects on GSH level (GSH), reactive oxygen species (ROS) generation, cyclooxygenase-2 (COX-2) and interleukine-6 (IL-6) expression in cells treated with lipopolysaccharide (LPS).

**Results:** MCE components induced the increase in intracellular GSH, decrease in ROS generation and reduction of the IL-6 and COX-6 expression in LPS-treated human gingival fibroblasts.

**Conclusion:** The alkaloid extract of *M. cordata* suppresses the inflammation and oxidative stress in human gingival fibroblasts and it could be practically used in the treatment of periodontitis and alveolitis.

**Key words:** *Macleaya cordata* – anti-inflammatory effect – anti-oxidative effect – reactive oxygen species – glutathione – lipopolysaccharide – interleukine-6 – cyclooxygenase-2

Čes. Stomat., roč. 112, 2012, č. 2, s. 47-56.

(Seznam použitých zkratek je uveden na konci článku.)

## ÚVOD

*Macleaya cordata* (Willd), (Okecek srdčitý) patří do čeledi makovitých (Papaveraceae). Rostlina obsahuje biologicky aktivní látky zejména kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA) [12]. *M. cordata* je po dlouhou dobu využívána pro své protizánětlivé a antimikrobiální vlastnosti v tradiční čínské medicíně. Její alkaloidový extrakt, sanguiritrin, je na Ukrajině a v evropské části Ruska používán jako antiseptikum u lidských a zvířecích kožních onemocněních. Extrakt z *M. cordata* (MCE) je aktivní složkou Sangrovitu®, který se ve státech EU používá jako aditivum do krmiv pro hospodářská zvířata. Hlavní alkaloidy obsažené v *M. cordata*, sanguinarin (SG) a chelerythrin (CHE), plní funkci fytoalexinů, tedy sekundárních metabolitů chránících rostlinu před působením patogenních mikroorganismů. U těchto alkaloidů byla prokázána inhibiční aktivita vůči širokému spektru gram-pozitivních a gram-negativních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* a *Candida albicans*), která je srovnatelná s gentamycinem. Vedle antimikrobiálního byl popsán také protizánětlivý účinek [5, 13, 25]. V klinických studiích bylo popsáno, že po aplikaci MCE dochází ke zmírnění zánětu gingivy [24]. Přestože jsou SG a CHE využívány v přípravcích ústní hygieny (Santoin), je stále diskutována jejich biobezpečnost. Jedna z prací poukazuje na skutečnost, že tyto alkaloidy by mohly být příčinou leukoplakie [6]. Studie prováděné *in vivo*, zaměřené na sledování genotoxicity a mutagenicity či onkogenetické studie naproti tomu tyto nežádoucí účinky nepotvrdily [15, 21].

Lidské gingivální fibroblasty jsou nejdůležitější buňky, které se podílí na tvorbě periodontální tkáně. Při vzniku gingivitidy, parodontitidy a alveolitidy dochází k produkci celé řady chemických mediátorů např. prostaglandinu E<sub>2</sub> a zánětlivých cytokinů [1, 8]. V *in vitro* studiích se běžně jako modelový systém pro studium onemocnění periodontia používají primární lidské gingivální fibroblasty, u nichž se k vyvolání zánětlivé reakce a stimulace tvorby mediátorů zánětu využívá intoxikace lipopolysacharidem (LPS) izolovaným z bakteriální stěny *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli* nebo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [2, 11]. Inkubace gingiválních fibroblastů s LPS vede ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů (interleukinu-1β (IL-1β), interleukinu-6 (IL-6), interleukinu-8, tumor nekrotizujícího faktoru- (TNF-α)) a reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) [16, 23]. Prozánětlivé cytokiny (IL-1β a TNF-α) silně indukují expresi cyklooxygenázy-2 (COX-2), jejíž hladina je za normálních okolností velmi nízká. Prozánětlivé cytokiny pronikají při zánětlivé reakci v určitém množství do sliny pasivní filtrací a mohou tak ovlivňovat i vzdálenější část tkáně [7]. Při zvýšené produkci ROS tyto reaktivní sloučeniny atakují okolní molekuly včetně nenasycených mastných kyselin přítomných v biomembránách. Při jejich oxidaci vzniká řada dalších produktů jako je 4-hydroxynonenal, malondialdehyd a hydroxyalkény a je narušena integrita membrán. Pokud je lipidová peroxidace v rovnováze s tkáňovým glutathionem (GSH) a jeho peroxidázou, k poškození membrán nedochází. Při parodontitidě se však produkty lipidové peroxidace hromadí a naopak klesá hladina antioxidantů včetně GSH, což může vést k destrukci postižené tkáně [10].

GSH je jedním z nejvýznamnějších buněčných antioxidantů. Je kofaktorem důležitých

oxidoreduktáz a podílí se mimo jiné na odstraňování peroxidu vodíku a detoxikaci volných radikálů, čímž působí jako ochrana buněk před oxidačním stresem [10]. Z tohoto důvodu byla hladina intracelulárního GSH vybrána jako marker pro posouzení schopnosti MCE snížit oxidační poškození gingiválních fibroblastů, vyvolané působením LPS.

Tato práce se zaměřila na studium schopností alkaloidového extraktu *M. cordata* potlačit změny vyvolané v lidských gingiválních fibroblastech působením bakteriálního LPS. Experimenty sledovaly účinky na vybrané parametry oxidačního poškození a markery zánětu.

## MATERIÁL A METODIKA

### Materiál

Pro stanovení IL-6 byl použit specifický imunologický kit firmy R&D Systems (USA). Western blotting luminol reagent Solution A a Solution B, primární králičí protilátka pro detekci COX-2, primární koží protilátka pro detekci aktinu (I-19), sekundární koží a králičí protilátky konjugované s křenovou peroxidázou byly zakoupeny od firmy Santa Cruz Biotechnology (USA). Dihydrofluorescein acetát dodala firma Fluka Chemie (SRN) a 5,5'-dithio-bis(benzoovou kyselinu) firma Serva (SRN).

Dále byl použit proteázový inhibitor Complete™ (Roche Diagnostic GmbH, SRN). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), L-glutamin, stabilizovaný roztok penicilinu se streptomycinem, sterilní dimethylsulfoxid (DMSO), roztok trypsin-EDTA, roztok trypanové modři a neutrální červeně (NČ) a další chemikálie, které dodala firma Sigma-Aldrich (USA).

### Extrakt *M. cordata*

MCE (identifikační číslo 051044, obsahující 59,6 % KBA z toho 44,9 % SG a 14,7 % CHE) byl získán od firmy Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH, Eltville (SRN).

Zásobní roztoky MCE (0,02–2 mg/ml) byly připraveny v DMSO a před aplikací na buňky byly naředěny v bezsérovém DMEM tak, aby výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,5 % (v/v).

### Buněčný model

Lidské gingivální fibroblasty byly izolovány ze zdravé gingivální tkáně získané od pacientů při chirurgických zákrocích, prováděných na Klinice ústní, čelistní a obličejové chirurgie, FN Olomouc. Odběry a zpracování byly prováděny se souhlasem etické komise FN a LF UP Olomouc. Všichni pacienti byli před odběrem tkáně poučeni o smyslu a cílech studie a podepsali informovaný souhlas. Izolace a kultivace lidských gingiválních fibroblastů se uskutečnila na Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc a je podrobně popsána v práci Zdařilové a spol. [26].

Do experimentů byly buňky vysety na 6- nebo 96jamkové kultivační desky a po dosažení 95% monovrstvy byly použity pro jednotlivá stanovení.

### Stanovení životnosti buněk

Buňky na 96jamkové kultivační desce byly inkubovány s MCE (0,1; 0,25; 0,5; 1; 5 a 10 µg/ml; DMSO) v bezsérovém DMEM. Kontrolní buňky byly kultivovány v bezsérovém DMEM, obsahujícím DMSO (0,5%, v/v). Po 24hodinové inkubaci (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub>) bylo médium s látkami odstraněno a byl aplikován roztok neutrální červeně (100 µl/jamka). Po čtyřech hodinách byl roztok neutrální červeně odstraněn, buňky byly opláchnuty roztokem formaldehydu (0,5%, v/v) s CaCl<sub>2</sub> (0,125%, v/v) a následně lyzovány v 100 µl roztoku kyseliny octové (1%, v/v) v methanolu (50%, v/v). Po pěti minutách byla změřena absorbance při 540 nm (Sunrise, Tecan, Švýcarsko).

## Vliv MCE na účinky vyvolané LPS v gingiválních fibroblastech

Buňky byly 24 hodin preinkubovány s LPS (1 nebo 10  $\mu\text{g/ml}$ ; sterilní voda), poté opláchnuty fosfátovým pufrém (PBS). Následně byl aplikován MCE (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; DMSO) v bezsérovém DMEM. Kontrolní buňky byly preinkubovány se sterilní vodou (místo LPS) a následně byl na buňky aplikován MCE (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; DMSO) nebo čisté DMSO (0,5%, v/v) v bezsérovém DMEM. Po čtyřhodinové inkubaci bylo odebráno médium pro stanovení IL-6. Buňky byly opláchnuty roztokem PBS a zpracovány pro stanovení hladiny GSH, produkce ROS a exprese COX-2.

### Stanovení hladiny GSH

Po odstranění média a opláchnutí PBS byly buňky seškrabány do 1%  $\text{HClO}_4$  a homogenizovány ultrazvukem. Část vzorku byla odebrána pro stanovení proteinu dle Bradfordové [3]. Zbytek buněčné suspenze byl centrifugován (10 min, 13 000 rpm, 4 °C). Supernatant byl použit pro stanovení hladiny GSH, které je založeno na reakci GSH s 2,2 dinitro-5,5 dithiobenzoovou kyselinou za vzniku žlutého chromoforu, který je měřen spektrofotometricky při 412 nm [19].

### Stanovení hladiny ROS

Ke sledování produkce ROS v buňkách byla použita pre-flourescenční sonda dihydrofluorescein acetát [17]. Po odstranění média byly buňky opláchnuty PBS a byl k nim aplikován dihydrofluorescein acetát (5  $\mu\text{mol/l}$ , 30 min) v bezsérovém médiu. Poté byly buňky opláchnuty PBS, seškrabány do 1 ml PBS a homogenizovány ultrazvukem. Buněčný lyzát byl centrifugován (10 min, 13 000 rpm, 4 °C) a fluorescence supernatantu byla měřena při 500/525 nm (INFINITE M200, Tecan, Švýcarsko). Koncentrace proteinu byla stanovena podle Bradfordové [3].

### Stanovení hladiny IL-6

Koncentrace IL-6 byla stanovena použitím specifického imunologického kitu (Quantikine®, R&D Systeme, USA). Test byl proveden podle protokolu dodaného výrobcem. Médium bylo naředěno (1:2) a aplikováno na 96jamkovou kultivační desku pokrytou specifickou monoklonální protilátkou. Po inkubaci (2 hod., pokojová teplota) bylo médium odstraněno a jamky opláchnuty promývacím pufrém (3krát). Následně byl aplikován roztok enzymaticky značené sekundární protilátky (2 hod., pokojová teplota). Poté byl roztok odstraněn, jamky opláchnuty promývacím pufrém (3krát) a byl přidán roztok substrátu. Po inkubaci (30 min., pokojová teplota, tma) byla reakce ukončena zastavovacím roztokem a změřena absorbance vzniklého produktu při 450 nm (Sunrise, Tecan, Švýcarsko).

### Stanovení exprese COX-2

Buňky byly opláchnuty roztokem PBS a seškrabány do vychlazeného lyzačního pufru. Po inkubaci (15 min, 4 °C) byl lyzát centrifugován (14 000 rpm, 10 min, 4 °C) a byla stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové [3]. Proteiny byly separovány s využitím elektroforézy na 10% SDS-polyacrylamidovém gelu a přeneseny na polyvinylidendifluoridovou membránu. Po přenosu byla membrána blokována (5% odtučněné mléko, Tris pufr (100 mmol/l; pH 7,5) s přídatkem 0,05% Tween-20 (TBS/T), 2 hod., pokojová teplota) a poté inkubována v primární protilátce proti COX-2 nebo aktinu (I-19) (5% odtučněné mléko v TBS/T, přes noc, 4 °C). Následně byla membrána promyta TBS/T a inkubována se sekundární králičí nebo kozí protilátkou značenou křenovou peroxidázou (5% odtučněné mléko v TBS/T, 2 hod., pokojová teplota). Expresse COX-2 a aktinu byla detekována chemiluminiscenčně (Western blotting luminol reagent) a zaznamenána na fotografický film.

## Statistická analýza

Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SMODCH (směrodatná odchylka) ze tří nezávislých experimentů provedených v tripletech v každém pokusu. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův t-test. Signifikance byla stanovena na hladině  $p < 0,01$  (#) resp.  $p < 0,05$  (\*).

## VÝSLEDKY

### Životnost buněk

Buňky byly inkubovány s MCE v koncentračním rozmezí 0,1–10  $\mu\text{g/ml}$  po 24 hodin. Z výsledků (graf 1) vyplývá, že koncentrace 0,1, 0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  výrazně neovlivňovaly životnost buněk (do 90 %) ve srovnání s kontrolními buňkami (DMSO). V koncentracích 1–10  $\mu\text{g/ml}$  MCE signifikantně ( $p < 0,01$ ) snížil viabilitu fibroblastů (25 % kontroly).

Pro studium protizánětlivých a antioxidačních vlastností MCE byly na základě inkorporace neutrální červeně do buněk vybrány koncentrace 0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

### Vliv MCE na LPS vyvolané oxidační poškození

Inkubací buněk se samotným MCE (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 4 hod.) nedošlo k ovlivnění bazální hladiny intracelulárního GSH (graf 2A). Naproti tomu u buněk inkubovaných s LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ , 24 hod.) došlo k výraznému snížení hladiny GSH (graf 2B). Po aplikaci MCE (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 4 hod.) na buňky preinkubované s LPS došlo ke zpětnému zvýšení intracelulárního GSH (graf 2B) u obou testovaných koncentrací MCE. Nicméně protekce byla signifikantní ( $p < 0,05$ ) pouze u nižší koncentrace MCE (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ).

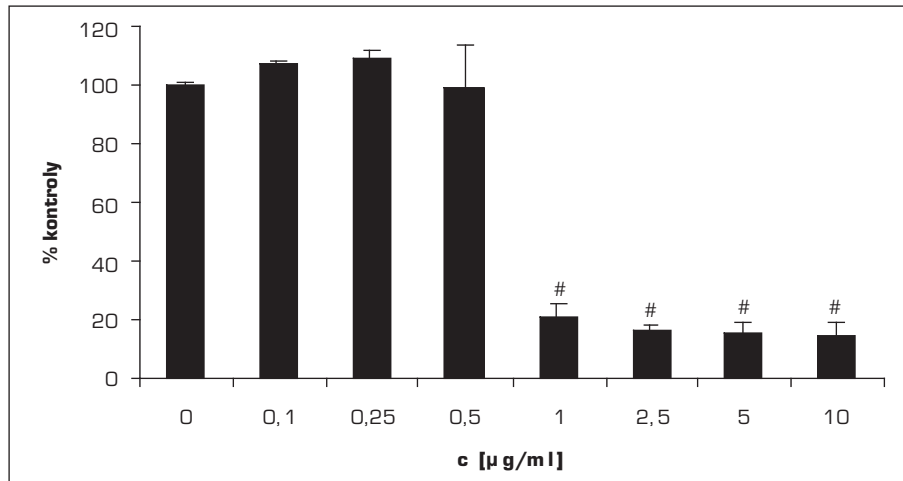
Dřívější studie rovněž prokázaly, že LPS stimuluje produkci ROS [11]. Pro potvrzení schopnosti MCE snížit oxidační poškození buněk, vyvolané působením LPS, byla hodnocena hladina ROS v lidských gingiválních fibroblastech. Jak je patrné z grafu 3A, MCE v použitých koncentracích (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 4 hod.) neovlivnil hladinu ROS. U buněk vystavených účinkům LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ , 24 hod.) došlo k výraznému zvýšení produkce ROS (graf 3B). Aplikace MCE (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 4 hod.) k buňkám preinkubovaným s LPS měla za následek redukci tvorby ROS v závislosti na koncentraci MCE (graf 3B).

### Vliv MCE na zánětlivé markery stimulované LPS v lidských gingiválních fibroblastech

IL-6 je známý prozánětlivý protein, který je zapojený do mnoha dějů imunitního systému. Je produkován gingiválními fibroblasty při odpovědi na zánětlivé stimuly [16]. Z grafu 4A je patrné, že MCE (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 4 hod.) nesignifikantně zvýšil bazální hladinu IL-6 v gingiválních fibroblastech. Inkubace buněk s LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ , 24 hod.) vedla k šestinásobnému zvýšení hladiny IL-6 v porovnání s hladinou tohoto proteinu v kontrolních buňkách (graf 4B). Po aplikaci MCE (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 4 hod.) na buňky stimulované LPS bylo pozorováno signifikantní ( $p < 0,05$ ) snížení hladiny IL-6 (graf 4B). Zvýšení hladiny IL-6 nezáviselo na koncentraci MCE.

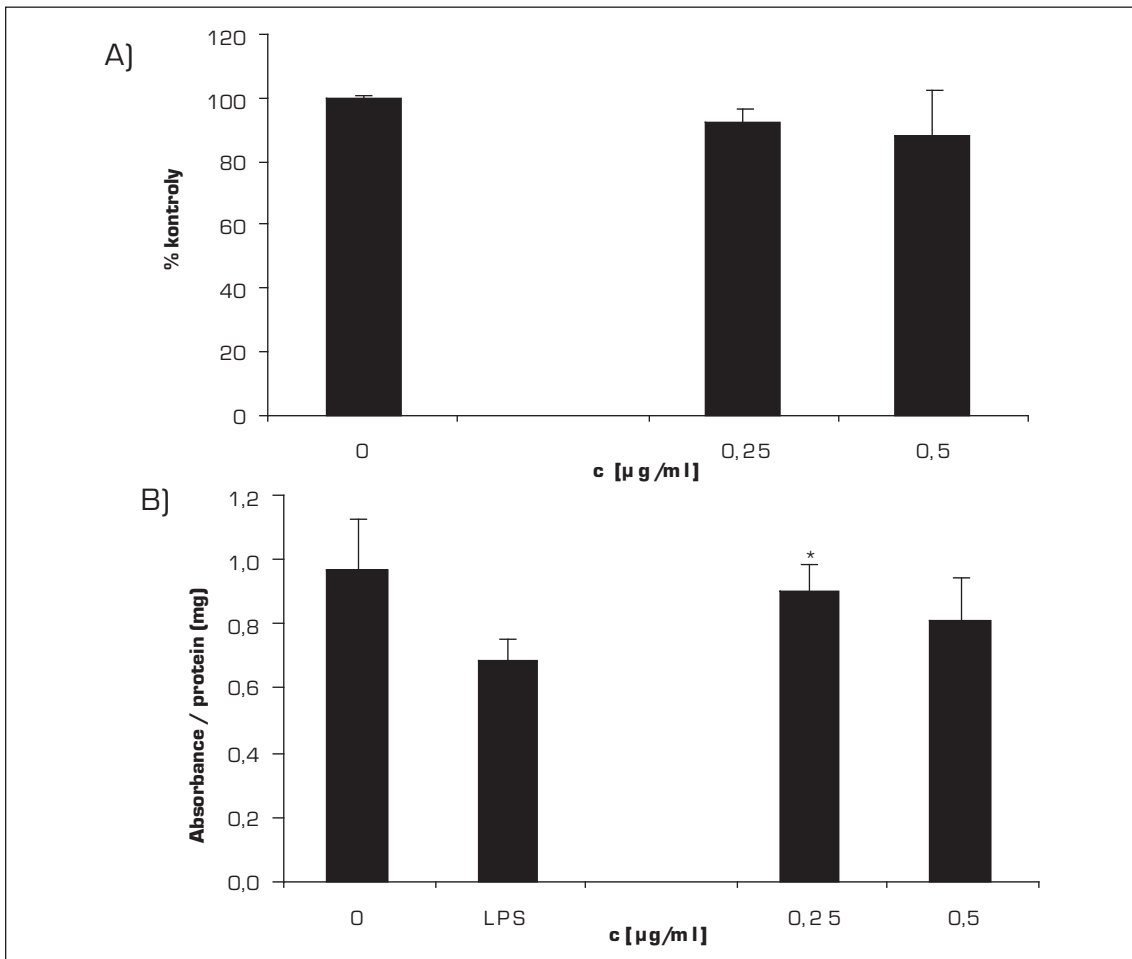
COX-2 se fyziologicky v tkáních sice nevyskytuje, ale jeho tvorba je indukována působením zánětlivých faktorů. Enzym následně katalyzuje tvorbu prostaglandinů, které se podílí na rozvoji zánětu. LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ , 24 hod.) výrazně stimuluje expresi COX-2 (obr. 1, sloupec 1) v porovnání s kontrolními buňkami, které účinkům LPS nebyly vystaveny (sloupec 2). Po aplikaci MCE (0,25 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 4 hod.) na buňky preinkubované s LPS došlo k výraznému poklesu exprese COX-2, a to v obou testovaných koncentracích MCE (sloupec 3 a 4).

ČESKÁ  
STOMATOLOGIE  
roč. 112  
2012, č. 2  
s. 47-56



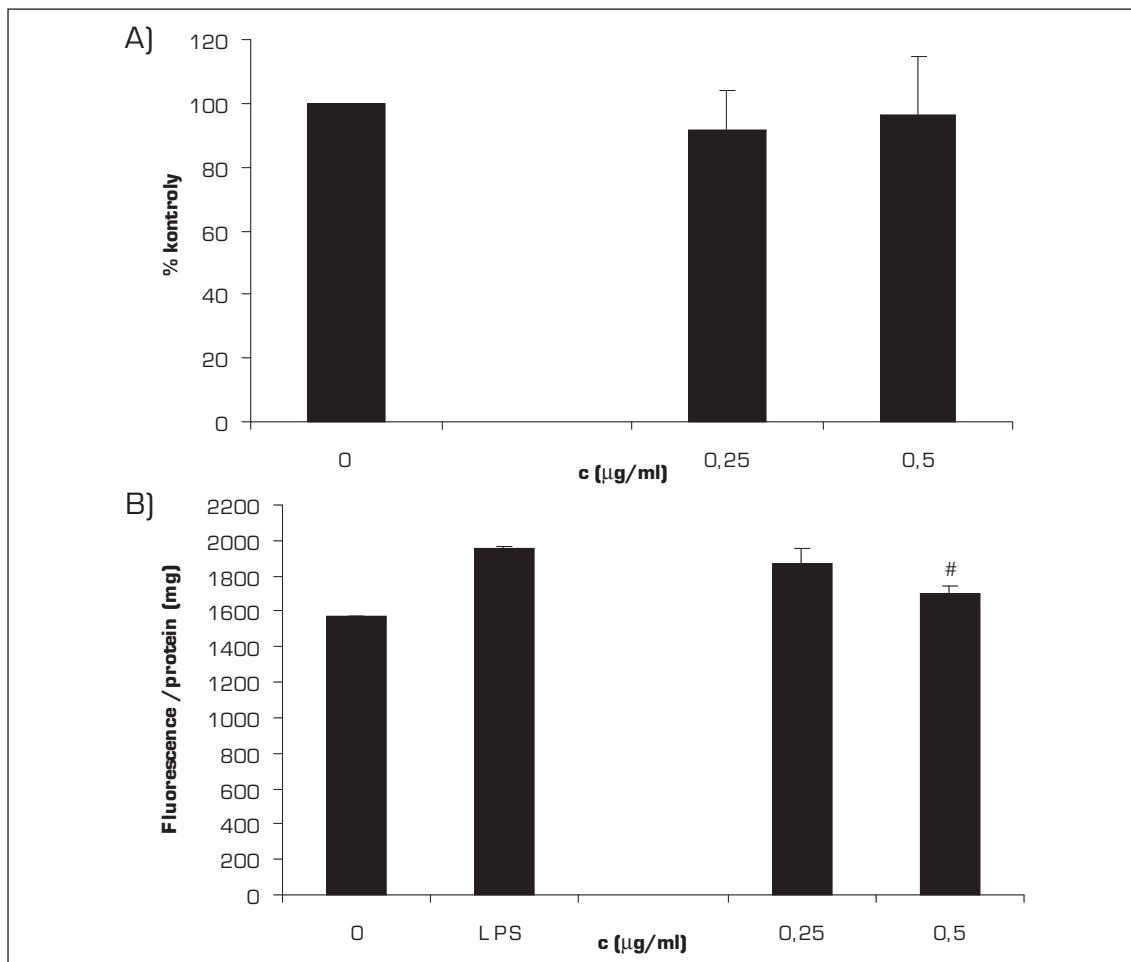
**Graf 1** Vliv MCE na viabilitu gingiválních fibroblastů

Buňky byly inkubovány s MCE (0,1-10 µg/ml) v bezsérovém médiu po dobu 24 hodin. Kontrolní buňky byly inkubovány s DMSO (0,5%; v/v). Data jsou vyjádřena jako průměr ± SMODCH. # hodnota je statisticky odlišná ( $p < 0,01$ ) od kontroly.



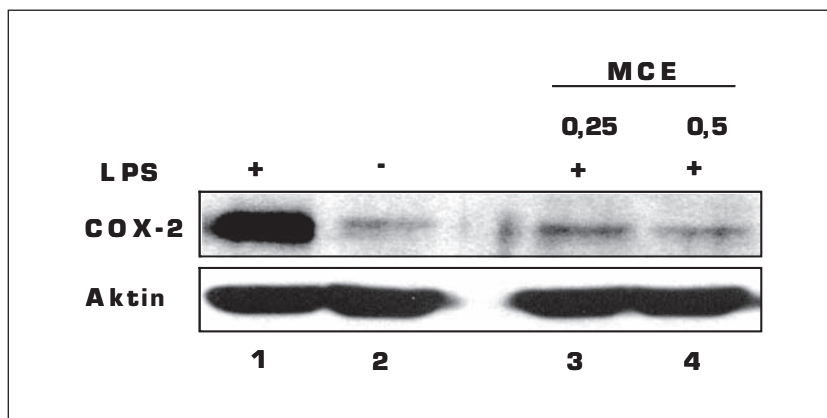
**Graf 2** Vliv MCE na hladinu GSH v lidských gingiválních fibroblastech po preinkubaci buněk s LPS

Gingivální fibroblasty byly (A) inkubovány s MCE (0,25 a 0,5 µg/ml) po dobu 4 hodin nebo (B) preinkubovány s LPS (1 µg/ml) po dobu 24 hodin a poté byl aplikován MCE (0,25 a 0,5 µg/ml, 4 hod.). Kontrolní buňky byly inkubovány s DMSO (0,5%; v/v). Data jsou vyjádřena jako průměr ± SMODCH. \*  $p < 0,05$  je statisticky odlišná od buněk inkubovaných s LPS.



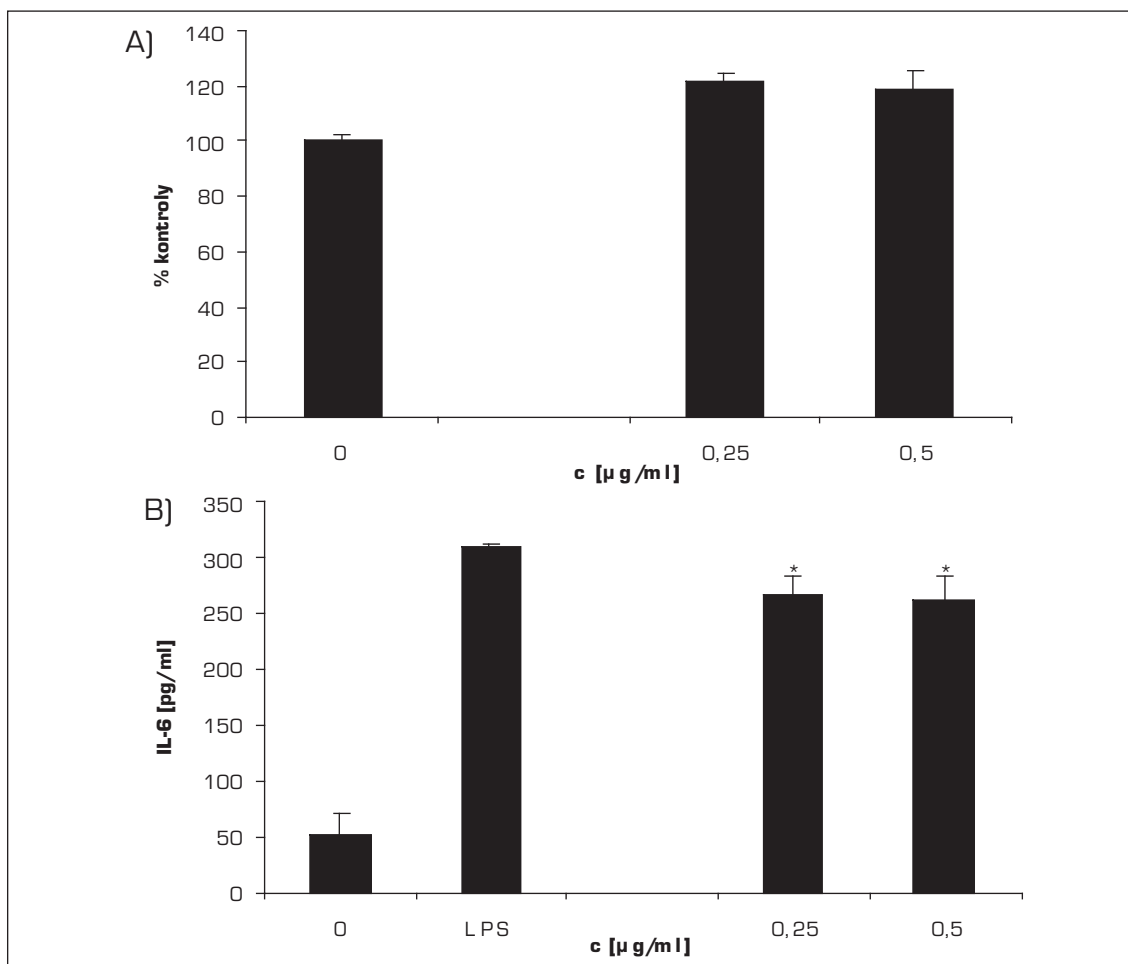
**Graf 3** Vliv MCE na produkci ROS v lidských gingiválních fibroblastech stimulovanou LPS

Gingivální fibroblasty byly **(A)** inkubovány s MCE (0,25 a 0,5 µg/ml) po dobu 4 hodin nebo **(B)** preinkubovány s LPS (1 µg/ml) po dobu 24 hodin a poté byl aplikován MCE (0,25 a 0,5 µg/ml, 4 hod.). Kontrolní buňky byly inkubovány s DMSO (0,5%; v/v). Data jsou vyjádřena jako průměr ± SMODCH. # hodnota je statisticky odlišná ( $p < 0,01$ ) od buněk inkubovaných s LPS.



**Obr. 1** Vliv MCE na expresi COX-2 stimulovanou LPS v gingiválních fibroblastech

Gingivální fibroblasty byly preinkubovány s LPS (10 µg/ml) po dobu 24 hod. a poté inkubovány s MCE (0,25 a 0,5 µg/ml, 4 hod.). Kontrolní buňky byly inkubovány s DMSO (0,5%; v/v). Data jsou reprezentativním výsledkem ze tří nezávislých experimentů.



**Graf 4** Vliv MCE na expresi IL-6 v lidských gingiválních fibroblastech stimulovanou LPS

Gingivální fibroblasty byly **(A)** inkubovány s MCE (0,25 a 0,5 µg/ml) po dobu 4 hodin nebo **(B)** pre-inkubovány s LPS (10 µg/ml) po dobu 24 hodin a poté byl aplikován MCE (0,25 a 0,5 µg/ml, 4 hod.). Kontrolní buňky byly inkubovány s DMSO (0,5%; v/v). Data jsou vyjádřena jako průměr ± SMODCH. \* hodnota je statisticky odlišná ( $p < 0,05$ ) od buněk inkubovaných s LPS.

## DISKUSE

Zánětlivá onemocnění parodontu, zejména gingivitidy, jsou velmi rozšířená a postihují značnou část populace na celém světě. Průběh a rozsah zánětlivého onemocnění gingivy závisí na kvantitě plaku, virulenci mikroorganismů a imunitním systému pacienta. V posledních letech se ukázalo, že prevence gingivitidy a parodontitidy je úspěšná, jestliže se provádí důkladně a trvale. Nicméně mechanické odstraňování plaku není vždy stoprocentně účinné. Z tohoto důvodu je již dlouhou dobu cílem vyvinout přípravek, který by inhiboval tvorbu plaku. Za tímto účelem byla studována antimikrobiální a protizánětlivá aktivita mnoha čistých látek/směsí.

V současné době jsou při léčbě těžkých zánětů, kdy po počáteční terapii nedojde ke zlepšení stavu, podávána nesteroidní antiflogistika. Řada studií prokázala, že jejich podávání zabraňuje tvorbě plaku a tedy i zánětu gingivy. Naproti tomu bylo zjištěno, že tyto nesteroidní léky mají řadu nežádoucích vedlejších účinků (např. způsobují dysfunkci gastrointestinálního traktu), které limitují jejich dlouhodobé používání [18]. *In vitro* a *in vivo* studie ukazují, že některé skupiny přírodních látek mají schopnost potlačovat tvorbu mikrobiálního plaku a mohou být použity k prevenci vzniku parodontálních onemocnění [2]. Mezi tyto látky patří i SG. U extraktu z *M. cordata* jsme studovali schop-



nost potlačit oxidační poškození a zánětlivou reakci vyvolanou působením bakteriálního LPS na lidské gingivální fibroblasty. Výsledky potvrdily, že MCE obnovuje hladinu redukováného GSH a snižuje produkci ROS vyvolanou působením bakteriálního LPS. Aplikace MCE potlačuje expresi IL-6 a inducibilní formy COX-2.

Parodontální onemocnění jsou spojena se zvýšenou produkcí reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) [4, 23]. ROS, vznikající působením aktivovaných neutrofilů, mají dvojitý účinek. Snižují zánětlivé působení patogenních mikroorganismů a naproti tomu jejich zvýšená koncentrace působí oxidační poškození tkáňových lipidů, proteinů a DNA. Gingivální fibroblasty jsou vybaveny enzymatickým a neenzymatickým systémem, který slouží k obraně buněk před oxidačním poškozením. Nejvýznamnějším intracelulárním antioxidantem podílejícím se na udržení redoxního stavu buněk je GSH. U buněk preinkubovaných s LPS jsme po aplikaci MCE (0,25 µg/ml) zaznamenali zpětné zvýšení hladiny intracelulárního GSH. Rovněž došlo k statisticky významnému snížení produkce ROS (0,5 µg/ml MCE). Výsledky korelují s výsledky Slunské a spol. [20], kteří prokázali snížení generování ROS účinkem SG. Byly publikovány také práce, které poukazují na pro-oxidační účinky SG [14]. Tyto studie však byly provedeny na nádorových buněčných liniích s SG v několikanásobně vyšší koncentraci (1,8 µg/ml) než byla koncentrace SG (0,25 µg/ml) v námi testovaném extraktu.

Dalším průvodním jevem parodontálního onemocnění je zánětlivá reakce postižené tkáně, na které se výrazně podílí gingivální fibroblasty. Regulace produkce prozánětlivých molekul představuje další nadějnou strategii v léčbě/regulaci onemocnění parodontu [22]. Řada klinických studií se zabývala studiem protizánětlivé aktivity extraktu ze *S. canadensis* s obsahem SG nebo zubních past a ústních vod obsahujících tuto složku [9, 24]. Přestože SG a extraktům obsahujícím tento alkaloid je připisována protizánětlivá aktivita, dosud neexistuje žádná studie, která by se podrobněji zabývala přímo mechanismem jeho působení na markery zánětu. Jeho protizánětlivý účinek je spojován s jeho antimikrobiální aktivitou. Naše experimenty prokázaly, že MCE v obou testovaných koncentracích (0,25 a 0,5 µg/ml) signifikantně snižoval produkci IL-6. Tento cytokin je hojně produkován v zanícené tkáni a stimuluje gingivální fibroblasty k produkci kolagenolytických enzymů, což má za následek destrukci postižené tkáně [22]. MCE rovněž výrazně inhiboval expresi COX-2, stimulovanou v gingiválních fibroblastech bakteriálním LPS.

## ZÁVĚR

Výsledky *in vitro* studie ukázaly, že MCE potlačoval účinky stimulované působením LPS v lidských gingiválních fibroblastech snížením produkce ROS, obnovením tvorby intracelulárního GSH a snižoval expresi IL-6 a COX-2. Výsledky potvrdily, že potlačením zánětlivé reakce a oxidačního stresu, může být MCE prospěšný pro prevenci a léčbu zánětlivých onemocnění ústní sliznice. Protizánětlivé účinky MCE jsme ověřili při léčbě zánětů zubního lůžka po extrakci dolních třetích molárů. Výsledky klinické části studie budou předmětem dalšího sdělení.

### Seznam zkratk:

|                 |   |
|-----------------|---|
| COX-2:          | cyklooxygenáza-2                            |
| DMEM:           | Dulbeccoem modifikované Eaglovo médium      |
| DMSO:           | dimethylsulfoxid                            |
| GSH:            | gluthathion                                 |
| CHE:            | chelerythrin                                |
| IL-1:           | interleukin-1                               |
| IL-6:           | interleukin-6                               |
| KBA:            | kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy |
| LPS:            | lipopolysacharid                            |
| MCE:            | extrakt z <i>Macleaya cordata</i>           |
| NČ:             | neutrální červen                            |
| ROS:            | reaktivní kyslíkové sloučeniny              |
| SG:             | sanguinarin                                 |
| SMODCH:         | směrodatná odchylka                         |
| TNF- $\alpha$ : | tumor nekrotizující faktor- $\alpha$        |

## LITERATURA

- Ara, T., Kurata, K., Hirai, K., Uchihashi, T., Uematsu, T., Imamura, Y., Furusawa, K., Kurihara, S., Wang, P. L.:** Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, roč. 44, 2009, č. 1, s. 21–27.
- Ara, T., Honjo, K., Rujánami, Y., Hattori, T., Imamura, Y., Wang, P. L.:** Preventive effects of a kampo medicine, orento on inflammatory responses in lipopolysaccharide treated human gingival fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.*, roč. 33, 2010, č. 4, s. 611–616.
- Bradford, M. M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, roč. 72, 1976, s. 248–254.
- Canakçi, C. F., Cilek, Y., Canakçi, V.:** Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry Mosc.*, roč. 70, 2005, č. 6, s. 619–628.
- Černá, H., Fiala, B., Lenfeld, J., Maršálek, E., Preininger, V., Šimánek, V.:** Isoquinoline alkaloids in local periodontal disease therapy (preliminary notice). *Acta Univ. Palacki Olomouc Fac. Med.*, roč. 107, 1984, 159–162.
- Damm, D. D., Curran, A., White, D. K., Drummond, J. F.:** Leukoplakia of the maxillary vestibule – an association with Viadent? *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, roč. 87, 1999, č. 1, s. 61–66.
- Dušková, J., Broukal, Z.:** Slinné markery pro onemocnění parodontu a dalších orgánů. *Čes. Stomat.*, roč. 109, 2009, č. 3, s. 43–47.
- Graves, D.:** Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J. Periodontol.*, roč. 79, 2008, č. 8 Suppl., s. 1585–1591.
- Hannah, J. J., Johnson, J. D., Kuftinec, M. M.:** Long-term clinical evaluation of toothpaste and oral rinse containing sanguinaria extract in controlling plaque, gingival inflammation, and sulcular bleeding during orthodontic treatment. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.*, roč. 96, 1989, č. 3, s. 199–207.
- Holeček, V., Mašek, V., Hecová, H., Zicha, A., Netolický, J.:** Volné radikály a antioxidanty. *Čes. Stomat.*, roč. 108, 2008, č. 1, s. 20–23.
- Kim do, Y., Jun, J. H., Lee, H. L., Woo, K. M., Ryoo, H. M., Kim, G. S., Baek, J. H., Han, S. B.:** N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch. Pharm. Res.*, roč. 30, 2007, č. 10, s. 1283–1292.
- Kosina, P., Gregorová, J., Gruz, J., Vacek, J., Kolář, M., Vogel, M., Roos, W., Neumann, K., Šimánek, V., Ulrichová, J.:** Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia.*, roč. 81, 2010, č. 8, 1006–1012.
- Lenfeld, J., Kroutil, M., Maršálek, E., Slavík, J., Preininger, V., Šimánek, V.:** Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Med.*, roč. 43, 1981, č. 2, 161–165.
- Malíková, J., Zdařilová, A., Hlobilková, A.:** Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacki Olomouc Czech Repub.*, roč. 150, 2006, č. 1, 5–12.
- Munro, I. C., Delzell, E. S., Nestmann, E. R., Lunch, B. S.:** Viadent usage and oral leukoplakia: a spurious association. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, roč. 30, 1999, č. 3, s. 182–196.
- Okada, H., Murakami, S.:** Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, roč. 9, 1998, s. 248–266.
- Royall, J. A., Ischiropoulos, H.:** Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, roč. 302, 1993, s. 348–355.
- Salvi, G. E., Lang, N. P.:** Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 32, 2005, č. 6 Suppl., s. 108–129.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H.:** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, roč. 26, 1968, s. 192–205.
- Slunská, Z., Gelnarová, E., Hammerová, J., Táborská, E., Slaninová, I.:** Effect of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinoline and chelilutine on normal and cancer cells. *Toxicol. In Vitro.*, roč. 24, 2010, č. 3, s. 697–706.
- Stiborová, M., Vostálová, J., Zdařilová, A., Ulrichová, J., Hudeček, J., Tschirner, K., Šimánek, V.:** *Macelaya cordata* extrakt and Sangrovit genotoxicity. Assessment in vivo. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacki Olomouc Czech Repub.*, roč. 152, 2008, č. 1, s. 35–39.
- Takashiba, S., Naruishi, K., Murayama, Y.:** Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J. Periodontol.*, roč. 74, 2003, č. 1, s. 103–110.
- Waddington, R. J., Moseley, R., Embery, G.:** Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis.*, roč. 6, 2000, č. 3, s. 138–151.
- Walterová, D., Ulrichová, J., Válka, I., Vičar, J., Vavrečková, C., Táborská, E., Harjader, R. J., Meyer, D. L., Černá, H., Šimánek, V.:** Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine: biological activities and dental care applications. *Acta Univ. Palacki Olomouc Fac. Med.*, roč. 139, 1995, 7–16.
- Zdařilová, A., Malíková, J., Dvořák, Z., Ulrichová, J., Šimánek, V.:** Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky in vitro a in vivo. *Chem. listy*, roč. 100, 2006, s. 30–41.
- Zdařilová, A., Rajnochová Svobodová, A., Chytilová, K., Šimánek, V., Ulrichová, J.:** Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts. *Food Chem. Toxicol.*, roč. 48, 2010, č. 6, s. 1555–1561.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem MŠMT (MSM 6198959216).

MUDr. Karin Chytilová

Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie LF UP a FNO

I. P. Pavlova 6

775 20 Olomouc

e-mail: karin.chytilova@seznam.cz