

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**RADIOSENSIBILIZACE LINIE BUNĚK NEMALOBUNĚČNÉHO
KARCINOMU PLIC POMOCÍ INHIBITORU AUTOFAGIE LYS05**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Konzultanti: pplk. doc. PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Bc. Aneta Douděrová

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne.....

podpis.....

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému konzultantovi pplk. doc. PharmDr. Aleši Tichému, PhD. za umožnění realizace diplomové práce na Katedře radiobiologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany v Brně. Mé poděkování patří také Mgr. Martinu Ondrejovi za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu diplomové práce věnoval. RNDr. Miloslavu Macháčkovi, PhD děkuji za cenné rady a věcné připomínky. Děkuji také Bc. Lucii Douděrové za pomoc při gramatické kontrole práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Aneta Douděrová

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Konzultanti: pplk. doc. PharmDr. Aleš Tichý, PhD.

Název diplomové práce: Radiosensibilizace linie buněk nemalobuněčného karcinomu plic pomocí inhibitoru autofagie Lys05

Nádorová onemocnění se v dnešní době řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí v celosvětovém měřítku. Výzkum v oblasti léčby se proto zabývá vývojem nových metod, které by zlepšily zdravotní stav pacientů. Cílem této práce bylo zjistit, zda použití inhibitorů autofagie v kombinaci s ionizujícím zářením (IZ) přispívá k radiosensibilizaci buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic H1299. Vycházeli jsme z předpokladu, že autofagie je cytoprotektivní mechanismus, který zajišťuje nádorovým buňkám ochranu v nepříznivých podmínkách jako např. IZ. V práci jsme pomocí fluorescenční mikroskopie s použitím zeleného fluorescenčního barviva LysoSensor Green DND-189 studovali kvalitativní změny buněk H1299 ošetřených novým inhibitorem autofagie Lys05 i v praxi již zavedeným inhibitorem Bafilomycinem A1. Intenzitu fluorescence jsme následně kvantifikovali pomocí průtokové cytometrie. Z výsledků vyplývá, že pre-inkubace inhibitory autofagie v kombinaci s IZ vede k morfologickým změnám buněk a k akumulaci lyzozomů v buňkách projevující se zvýšením intenzity fluorescence. Závěrem lze říci, že Lys05 je látka perspektivní, jejíž účinek by mohl být využit v radiosensibilizaci buněčné linie H1299.

Klíčová slova: autofagie, radiosensibilizace, buněčná linie H1299, nemalobuněčný karcinom plic, inhibitory autofagie, Lys05, Bafilomycin A1, LysoSensor Green DND-189, fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Aneta Douděrová

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Consultants: pplk. doc. PharmDr. Aleš Tichý, PhD.

Title of diploma thesis: Radiosensitization of non-small cell lung cancer cell line using autophagy inhibitor Lys05

Nowadays, tumor diseases belong to the world's main causes of death. Research in the area of tumor treatment deals with the development of new methods that improve the health of patients. The aim of my diploma thesis was to find out if the usage of autophagy inhibitors in combination with ionizing radiation (IR) contributed to radiosensitization of non-small cell lung cancer cells H1299. It was based on an assumption that autophagy was a cytoprotective mechanism leading to a cell survival during stress conditions such as IR. In order to examine qualitative changes of H1299 cells pre-treated by the new autophagy inhibitor Lys05 or well known autophagy inhibitor Bafilomycin A1 we used fluorescence microscopy in combination with green staining by LysoSensor green DND-189. The intensity of fluorescence was quantified by flow cytometry. The results have shown that pre-treatment by autophagy inhibitors in combination with IR led to morphological changes of cells and to accumulation of lysosomes within the cells manifested by the increase of fluorescence. In conclusion, Lys05 is a promising substance, which could be used for radiosensitization of H1299 cells.

Keywords: autophagy, radiosensitization, cell line H1299, non-small cell lung cancer, inhibitors of autophagy, Lys05, Bafilomycin A1, LysoSensor Green DND-189, fluorescence microscopy, flow cytometry.

Obsah

ÚVOD.....	8
1 KARCINOM PLIC	9
1.1 Etiologie karcinomu plic	10
1.2 Nemaalobuněčný karcinom plic	10
2 AUTOFAGIE.....	12
2.1 Druhy autofagie.....	12
2.2 Proces autofagie	13
2.2.1 Indukční fáze.....	14
2.2.2 Nukleační fáze	16
2.2.3 Elongační fáze.....	18
2.2.4 Maturační fáze a degradace	19
2.3 Autofagie a buněčná smrt.....	20
2.4 Autofagie a nádorová onemocnění.....	21
2.4.1 Přirozené induktory autofagie.....	22
2.4.2 Autofagie a metastazování.....	23
2.5 Autofagie v ozářených buňkách.....	24
2.6 Inhibitory autofagie	24
2.6.1 Lys05	25
2.6.2 Bafilomycin A1.....	25
3 CÍL PRÁCE	26
PRAKTICKÁ ČÁST	27
4 MATERIÁLY A METODIKA.....	27
4.1 Přístroje	27
4.2 Spotřební materiál	27
4.3 Chemikálie	28

4.4	Biologický materiál.....	28
4.5	Příprava média	29
4.6	Rozmrazení buněk.....	29
4.7	Počítání buněk.....	30
4.8	Pasážování buněk.....	32
4.9	Fluorescenční mikroskopie	33
4.10	Průtoková cytometrie.....	37
4.11	Statistická analýza dat	41
5	VÝSLEDKY	42
5.1	Fluorescenční mikroskopie	42
5.1.1	Lys05	44
5.1.2	Bafilomycin A1.....	47
5.2	Průtoková cytometrie	51
5.2.1	Lys05	51
5.2.2	Bafilomycin A1.....	53
6	DISKUZE	55
7	ZÁVĚR	58
8	SEZNAM ZKRATEK	60
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62

ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou v dnešní době celosvětovým problémem, jemuž se věnuje velká pozornost. Se zvyšující se průměrnou délkou života a také se zdokonalováním diagnostických přístrojů roste i počet diagnostikovaných pacientů trpících nějakou formou nádorového onemocnění. Velký důraz je proto kladen na vývoj léčebných metod, které by vedly ke zlepšení zdravotního stavu pacientů postižených nádorovým onemocněním.

Současné přístupy protinádorové terapie nejsou ani zdaleka dokonalé. Často jsou zatíženy velkým množstvím nežádoucích účinků, které zhoršují celkový léčebný proces a brání úplnému uzdravení. Dalším problémem je poměrně vysoká rezistence nádorových buněk, která vede k prohlubování nežádoucích účinků. Hledání přístupů vedoucích k zdokonalení dosavadních léčebných metod je proto nevyhnutelné.

V rámci radioterapie je největším problémem postižení zdravé tkáně, která je ozářena spolu s tkání nádorovou. Vysoké dávky záření používané při léčbě rezistentních nádorů mají za následek větší zatížení okolní zdravé tkáně. Použití chemoterapeutik těsně před samotným ozářením vedoucích k radiosensibilizaci nádorových buněk se jeví jako logický přístup, jehož výsledkem by mohlo být zefektivnění terapeutické metody a taky snížení nežádoucích účinků protinádorové terapie.

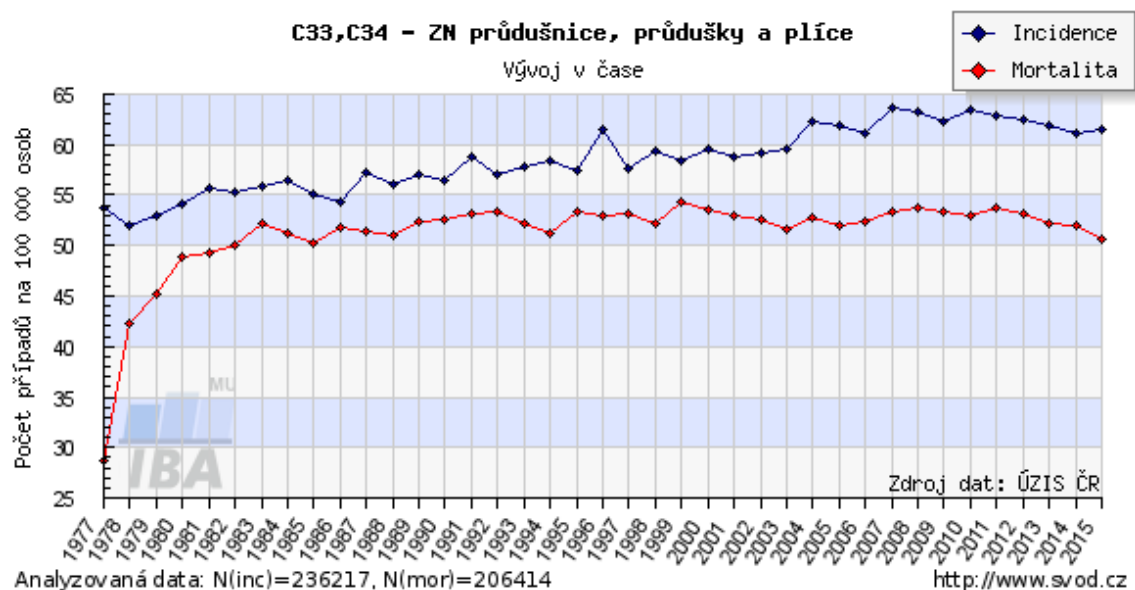
V předkládané práci se proto zabýváme účinkem dvou inhibitorů autofagie – Lys05 a Bafilomycinu A1 na nádorovou tkáň nemalobuněčného karcinomu plic v kombinaci s ionizujícím zářením a sledujeme jejich potenciálně radiosensibilizující účinek. Lys05 je přitom zcela nový, zatím komerčně nedostupný inhibitor, který byl vyvinut v University of Pennsylvania, USA, a který máme možnost otestovat díky spolupráci s týmem Dr. Mc Affeeho.

TEORETICKÁ ČÁST

1 KARCINOM PLIC

Zhoubné nádory plic a průdušek jsou v literatuře často označovány jako bronchogenní karcinomy. Jedná se většinou o heterogenní nádory, u kterých jsou maligní buňky různě diferencované nebo se liší histologicky (1).

V celosvětovém měřítku je karcinom plic nejčastějším typem zhoubného novotvaru s vysokou nádorovou letalitou (2). Podle statistik pro rok 2015 se plicní karcinom v České republice řadí na druhé místo v incidenci zhoubných nádorových onemocnění hned za kolorektálním karcinomem; je však nejčastější příčinou úmrtí v rámci onkologických diagnóz. U tohoto typu zhoubného nádoru jednoznačně převažuje výskyt u mužů (3). Vývoj hrubé incidence a mortality v čase můžeme vidět na obr. 1.



Obr. 1 Časový vývoj hrubé incidence a mortality zhoubných nádorů průdušnic, průdušek a plic v ČR - převzato z (4)

Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) zhoubných nádorů průdušnic, průdušek a plic v celé populaci ČR.

1.1 Etiologie karcinomu plic

Exogenní faktory hrají hlavní roli při vzniku rakoviny plic. Je všeobecně známo, že kouření má vliv na rozvoj karcinomu plic až v 80–90 % případů. Mezi další vnější vlivy, jejichž expozice zvyšuje riziko vzniku karcinomu plic, můžeme zařadit azbest, některé těžké kovy, organické sloučeniny jako chlorované uhlovodíky, polycyklické aromatické uhlovodíky či nitrosaminy, ionizující a UV záření, radon nebo viry.

S příčinou vzniku karcinomu plic je také spojována genetická predispozice. Podobně jako je to u dalších typů rakoviny, začíná karcinom plic deaktivací onkogensupresorových genů nebo aktivací onkogenů. Onkogensupresorové geny mají opačný účinek než onkogeny; omezují buněčnou transformaci a proliferaci. Potenciálně nebezpečné protoonkogeny se vlivem karcinogenů mění na onkogeny.

Onkogeny tedy můžeme označit jako geny, které způsobují nádorové bujení. Při karcinomu plic hraje důležitou roli onkogen *K-ras*, onkogen *Bcl-2* a další proteiny ovlivňující apoptózu.

S tímto onemocněním je také spojováno několik genetických polymorfismů. Jako příklad můžeme uvést zvýšenou aktivitu cytochromu P450, která vede k zvýšené tvorbě karcinogenů z cigaretového kouře. Snížená aktivita glutathion-S-transferasy nezbytná pro detoxikaci aromatických uhlovodíků či snížení buněčných reparačních mechanismů DNA (5).

1.2 Nemalobuněčný karcinom plic

Dle biologických vlastností můžeme karcinom plic rozdělit do dvou základních skupin: malobuněčný bronchogenní karcinom plic (SCLC – z anglického „Small Cell Lung Cancer“) a nemalobuněčný bronchogenní karcinom plic (NSCLC – z anglického „Non Small Cell Lung Cancer“).

NSCLC je charakteristický pomalejším růstem a vyskytuje se mnohem častěji oproti SCLC. Metastazuje zejména lymfatickou cestou a na počátku svého bujení má lokální charakter proliferace (1).

Hlavní léčbou NSCLC je chirurgická léčba, která dává pacientům nejvyšší pravděpodobnost na dlouhodobější přežití. Většina případů je bohužel ale diagnostikovaná až v pokročilém stádiu a v tomto případě je radikální chirurgická léčba nemožná (6).

Studie pacientů léčených během posledních let odhalily, že možnosti obvyklé chemoterapie jsou vyčerpány a je zde předpoklad, že jiné kombinace cytostatik nijak významně neprodlouží život nemocných s NSCLC. Další výzkumy se proto věnují biologicky cílené léčbě, která se zaměřuje na signální cesty a možnosti jejich ovlivnění. V literatuře bývá tato léčba někdy označovaná jako intracelulární nebo molekulární chemoterapie (7).

Mezi biologickou léčbu můžeme zařadit inhibici signální dráhy fosfoinositol-3-kinasy-Akt kinasy (PI3K-Akt), kterou budeme rozebírat v následujících kapitolách. Při onkologických onemocněních bývá tento komplex často deregulovaný. U NSCLC se vyskytuje mutace genu *PI3CA* jen vzácně, zatímco amplifikace tohoto genu nacházíme zcela běžně, a to až u 31 % případů. U 24 % případů může způsobit zvýšenou signalizaci dráhy PI3K-Akt nefunkčnost proteinu PTEN (z anglického „phosphatase and tensin homolog“), který hraje klíčovou roli v inhibici této dráhy. Aktivace signální dráhy PI3K-Akt stimuluje proliferaci a má také inhibiční účinky na apoptózu. Zvýšená aktivita serin/threoninové kinasy mTOR (z anglického „mammalian target of rapamycin“) je popisována u více jak 50 % plicních nádorů. Některé inhibitory mTOR již postoupily do klinických studií.

V dnešní době patří cílená terapie k nedílné součásti léčby pacientů s nádorovými onemocněními. Působí přímo proti nádorovým buňkám, vyznačuje se tedy proto vyšší specificitou a zároveň vykazuje nižší toxicitu. Z průběžných klinických výsledků jednoznačně vyplývá, že inhibicí některých cílových struktur najednou dochází k obrovskému přínosu v léčbě (5).

2 AUTOFAGIE

Autofagie je přirozený buněčný proces, díky němuž jsou proteiny s dlouhým poločasem rozpadu a poškozené organely degradovány pomocí lyzosomálních enzymů. Účelem tohoto intracelulárního degradačního systému není pouze jednoduchá eliminace materiálu, ale slouží také jako dynamický recyklační systém, který vytváří nové stavební kameny a energii pro udržení homeostázy (8, 9). Termín autofagie je odvozen z řeckého auto a phagos - „samotrávení“.

Autofagický proces je důležitý pro udržení fyziologických vlastností u zdravých buněk a jeho porucha přispívá k řadě onemocnění, včetně rakoviny, neurodegenerace, kardiovaskulárních poruch a infekcí způsobených mikroby. Může být aktivován jako reakce na různé podněty – nedostatek živin, kyslíku či růstových faktorů, ionizující záření (IZ), chemoterapeutika (10, 11).

Úloha autofagie v tumorigenezi je složitá a s velkou pravděpodobností závislá na postižené tkáni a na typu nádoru, jež tumorigenezi vyvolal. Nádorové buňky jsou během svého růstu vystaveny metabolickému stresu. V důsledku nedostatečné vaskularizace a tím nedostatku kyslíku, živin a růstových faktorů, bývá v hypoxických částech nádoru spuštěna autofagie. Vzhledem k schopnosti autofagie odstranit poškozené proteiny nebo organely, může také sloužit jako mechanismus přežívání ozářených buněk. Vedle své role při udržování homeostázy může autofagie přejít za velice nepříznivých podmínek do tzv. autofagické buněčné smrti (programovaná buněčná smrt typu II). Zůstává tedy nejasné, zda-li autofagie slouží jako cytoprotektivní mechanismus nebo se podílí spíše na buněčné smrti. (11–13).

2.1 Druhy autofagie

Na základě autofagického mechanismu se rozlišují tři typy autofagie: makroautofagie, mikroautofagie a autofagie zprostředkovaná chaperony. Všechny typy jsou zakončené proteolytickou degradací cytosolických složek v lyzosomu. Makroautofagie je považována za hlavní typ autofagie a byla zkoumána nejvíce ve srovnání s mikroautofagií a chaperonem zprostředkovanou autofagií (14).

Při mikroautofagii jsou malé části cytoplazmy přímo pohlcovány lyzosemem pomocí invaginace (15). Autofagie zprostředkovaná chaperony se podílí na degradaci proteinů selektivním způsobem. Tento druh autofagie nezahrnuje reorganizaci membrán, nýbrž substrátové proteiny přímo přemísťuje přes lyzozomální membránu. Chaperonový protein Hsc70 s kochaperony specificky rozpoznávají cytosolové proteiny, které obsahují pentapeptidový motiv KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) nebo jeho strukturní analogy. Transmembránový protein Lamp-2A, který je izoformou Lamp-2, působí jako receptor na lyzozomu a rozvinuté proteiny jsou dodávány do lumen lyzozomu přes multimerní translokační komplex (8, 16, 17).

U makroautofagie (dále jen autofagie) vzniká organela zvaná autofagosom. Izolovaná membrána neboli fagofor, sekvestruje malou část cytoplazmy, včetně rozpustných látek a organel, za vzniku autofagosomu. Vnější membrána autofagosomu fúzuje s lyzosemem za vzniku autolyzozomu, ve kterém je cytosolický obsah následně degradován (8).

Zatímco byla autofagie u savců studována již od 50.let, studium kvasinek nám umožnilo porozumět tomuto procesu také na molekulární úrovni. U savců bylo identifikováno 32 genů, které se podílejí na autofagii a označujeme je jako geny související s autofagií (*Atg*). Pro všechny typy autofagie je potřeba právě 16 genů (*Atg-1-10, 12-14, 16 a 18*) z výše uvedených (18). Proteiny *Atg* se mohou obecně rozdělit do 6 skupin. 1) Kinasový komplex ULK1 (ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101) pro indukci autofagie, 2) *Atg9* pro recyklaci membrány, 3) třída III komplex fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K), 4) fosfatidylinositol-3-fosfát (PI-(3)-P) zavazující *Atg1-Atg18* komplex, 5) konjugační systém *Atg12-Atg5-Atg16L* a 6) konjugace *Atg8* systému zahrnující fosfatidylethanolamin (*Atg8-PE*) pro expanzi membrány (19).

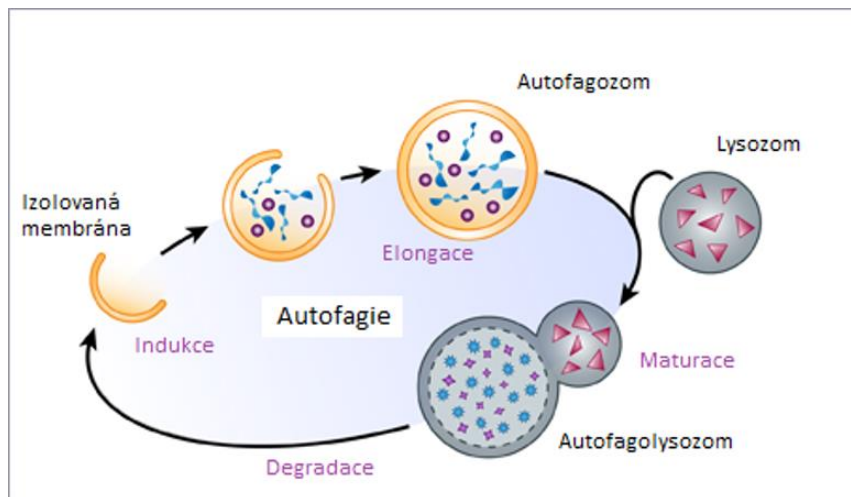
2.2 Proces autofagie

Autofagie je proces dynamický, jeho průběh můžeme rozdělit do několika následujících kroků:

- 1) Indukce
- 2) Nukleace

- 3) Elongace
- 4) Maturace
- 5) Degradace

Jak je shrnuto na obr. 2, během indukční fáze dochází ke vzniku izolované membrány zvané fagofor. V elongační fázi se vzniklý fagofor prodlužuje, obklopuje vnitrobuněčný materiál, který je určen k degradaci, následně se uzavírá a vzniká autofagosom. V maturační fázi fúzuje autofagosom s lyzozomem a dochází k degradaci autofagosomálního obsahu kyselými proteasami lyzozomu. Lyzozomální permeasy a transportéry exportují aminokyseliny a další vedlejší produkty rozkladu zpět do cytoplazmy, kde mohou být znovu použity pro výrobu makromolekul a pro metabolismus buňky (14).



Obr. 2 Fáze autofagie - převzato a upraveno dle (20)

2.2.1 Indukční fáze

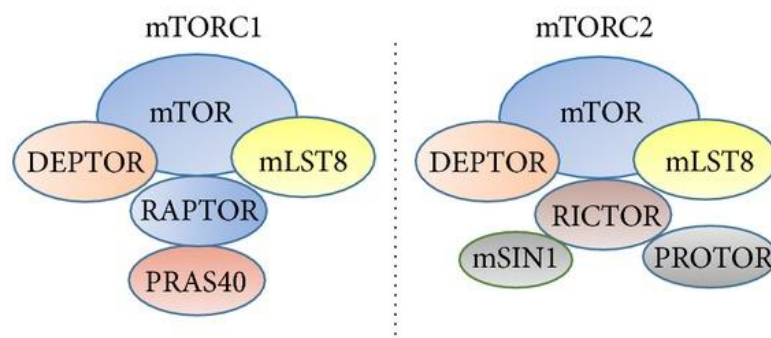
Autofagie probíhá v základní míře téměř ve všech buňkách. Může být aktivovaná na různé podněty jako je hladovění, hypoxie, oxidační stres, infekce patogenů, záření nebo protinádorová léčiva (21). Nejběžnějším spouštěčem autofagie je nedostatek živin. U kvasinek je nejsilnějším stimulantem hladovění dusíkem, u rostlinných buněk je to dusíkové nebo uhlíkové hladovění. U savců je regulace autofagie pravděpodobně velmi

komplikovaná. Celkové vyčerpání aminokyselin je jedním z nejsilnějších induktorů autofagie (22).

Pro správnou indukci autofagie je nezbytná aktivace komplexu ULK1/2. Protein mTOR, hlavní regulační prostředek indukční fáze, je atypická serin/threoninová proteinkinasa, která patří do rodiny kinas 3-kinasy (PI3K) a je katalytickým jádrem dvou odlišných multiproteinových komplexů, mTOR komplexu 1 (mTORC1) a mTOR komplexu 2 (mTORC2) (23, 24).

Komplex mTORC1 kontroluje autonomní růst buňky v reakci na dostupnost aminokyselin, kyslíku, energie, růstových faktorů či stresu a řídí progresi buněčného cyklu. Komplex mTORC2 reaguje na růstové faktory a reguluje přežití a metabolismus buněk (23, 25).

Komplex mTORC1 je tvořen mTOR kinasou a proteiny RAPTOR (z anglického „regulatory-associated protein of mTOR“), mLST8 (z anglického „target of rapamycin complex subunit LST8“), DEPTOR (z anglického „domain-containing mTOR-interacting protein“) a PRAS40 (z anglického „proline-rich AKT1 substrate 1“). RAPTOR pozitivně reguluje aktivitu proteinu mTOR, zatímco PRAS40 negativně (26, 27). Komplex mTORC2 obsahuje mTOR kinasu a proteiny RICTOR (z anglického „rapamycin-insensitive companion of mTOR“), mLST8, mSIN1 (z anglického „mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1“), PROTOR (z anglického „proline-rich protein 5“) a DEPTOR. Struktura obou komplexů je shrnuta na obr. 3.



Obr. 3 Struktura komplexů mTORC1 a mTORC2 - převzato, upraveno dle (28)

Komplexy mTORC1 a mTORC2 sestávají z proteinů mTOR, mLST8 a DEPTOR. Komplex mTORC1 obsahuje navíc proteiny PRAS40 a RAPTOR, komplex mTORC2 proteiny mSIN1, PROTOR a RICTOR.

Komplex mTORC1 se podílí jako negativní regulátor na iniciační fázi autofagie, zatímco mTORC2 se regulace autofagie neúčastní (29). Inhibice komplexu mTORC1 vede k indukci autofagie, naopak stimulace mTORC1 inhibuje tento proces (30).

Aktivita kinasového komplexu ULK1 je regulována proteinem mTOR v závislosti na okolních podmínkách. V podmínkách dostatečného přísunu živin interaguje aktivní komplex mTORC1 (komplex mTOR a regulační protein mTOR - RAPTOR) s kinasovým komplexem ULK1 (ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101) přičemž dochází k fosforylaci proteinů ULK1 a mAtg13 a následně k inhibici tvorby cílené membrány kinasového komplexu ULK1. Naopak během hladovění se inaktivovaný komplex mTORC1 disociuje z komplexu kinasy ULK1 což vede k fosforylaci komponent mAtg13 a FIP200, jejich připojení do komplexu kinasy ULK1 a k indukci autofagie (18, 31).

Rozdíl mezi autofagií u savců a kvasinek je přítomnost přechodného preautofagosomu (PAS) v kvasinkách. Proteinový komplex složený z Atg1 (serin/threonin kinasa), Atg13, Atg17, Atg29 a Atg31 je nezbytný pro tvorbu struktury PAS a funkce v počátečním kroku tvorby autofagosomu u kvasinek. Podobně existuje u savců komplex ULK1 kinasy složený z ULK1 (Atg1), mAtg13 (Atg13), FIP200 (Atg17) a Atg101. Na rozdíl od kvasinek je však komplex kinasy ULK1 u savců pravděpodobně stabilně vytvořen pro tvorbu autofagosomů bez ohledu na živinové podmínky (18, 32).

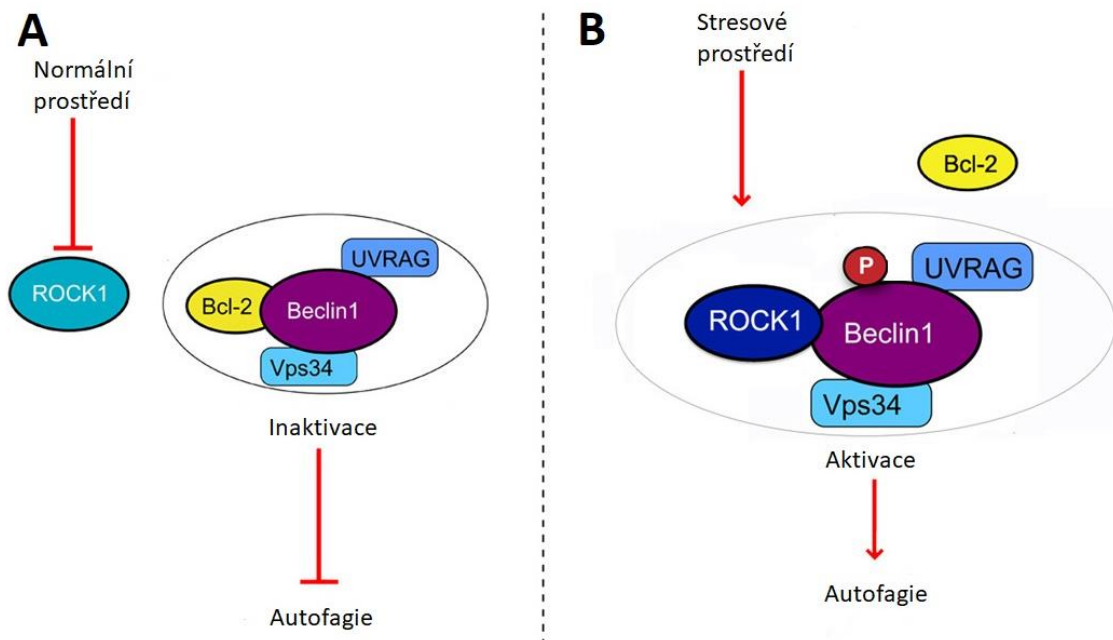
2.2.2 Nukleační fáze

Předpokládá se, že původci autofagosomální membrány mohou být různé organely, včetně mitochondrií, Golgiho komplexu a endoplazmatického retikula (33). Klíčovou roli v počátečním kroku tvorby autofagosomu u savčích buněk hraje komplex III. třídy PI3K. Třída III PI3K (Vps34) je spojena s proteiny Beclin-1 (savčí homolog Atg6 kvasinek) a p150 (savčí homolog Vps15 kvasinek) za vzniku komplexu jádra PI3K III. třídy (34).

Hlavním regulátorem nukleační fáze je protein Beclin-1, který je asociován s komplexem jádra třídy III PI3K za vytvoření fosfatidylinositol-3-fosfátu (PI-(3)-P) (35). Za normálních podmínek je antiapoptický protein Bcl-2 prostřednictvím své BH3

domény asociován s proteinem Beclin-1 a inhibuje tvorbu autofagosomů. Naopak při stresových podmínkách je Beclin-1 uvolněn z Bcl-2 díky aktivaci kinasy ROCK1 (z anglického „Rho associated, coiled-coil containing protein kinase 1“), a může tak pokračovat ve své funkci v autofagii. Bcl-2 tedy negativně reguluje autofagii prostřednictvím vazby s Beclin-1 (36, 37).

Beclin-1 interaguje se dvěma dalšími molekulami, proteinem UVRAG (z anglického „Ultraviolet irradiation resistant-associated gene protein“) a proteinem Ambra1 (z anglického „Activating molecule in Beclin-1 regulated autophagy“). Obě molekuly jsou přítomny v komplexu lidského Vps34 a předpokládá se, že jsou pozitivními regulátory autofagie (37).



Obr. 4 Aktivace komplexu třídy III PI3K - převzato a upraveno dle (36)

(A) V normálním prostředí, kdy mají buňky dostatek živin a nejsou vystaveny dalšímu stresu, potlačují aktivitu ROCK1 kinasy. Bcl-2 se tak asociuje s komplexem Beclin-1 (Vps34 a UVRAG) a tím inhibuje tvorbu autofagosomů. (B) Když je buňka vystavena stresu, stimuluje se ROCK1 kinasa. ROCK1 váže a fosforyluje Beclin-1 a narušuje tak vzájemnou interakci Beclin-Bcl-2. Dochází tak k aktivaci autofagie.

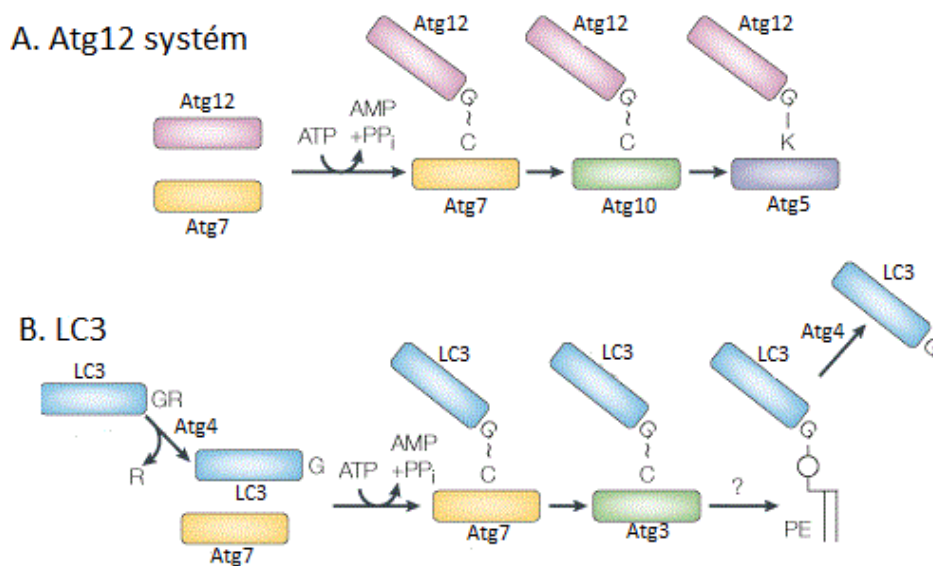
Dalším významným regulačním prvkem nukleační fáze je protein Rubicon, který se nachází ve stejném komplexu s UVRAG při spojení s Beclin-1. UVRAG může interagovat s komplexem jádra nezávisle na proteinu Rubicon, naopak u Rubicon se předpokládá, že interaguje s Beclin-1 přes UVRAG (38).

Nedávné studie odhalily další z proteinů interagující s Beclin-1, protein Barkor, který se váže na membránu složenou z PI-(3)-P. Stabilní komplex Beclin-1-Barkor umožňuje oběma proteinům synergicky podporovat a pozitivně regulovat autofagii pomocí komplexu Vps34-Vps15, zatímco exprese samotného Barkor je nedostatečná. Díky tomu, že se Barkor přednostně váže na zakřivené membrány zabudované s PI-(3)-P, je schopen dále udržovat zakřivení membrány, aby inicioval tvorbu autofagosomální membrány (18, 38, 39).

2.2.3 Elongační fáze

V průběhu elongace hrají významnou roli dva systémy – proteiny Atg12 a LC3. Pro prodloužení autofagosomální membrány je nezbytné vytvoření proteinové konjugace Atg12-Atg5 začínající aktivací proteinu Atg7. Atg7 hydrolyzuje ATP, což vede k aktivaci Atg12 a k přenesení na Atg10. Atg10 katalyzuje konjugaci Atg12 a Atg5 a následně dochází k tvorbě multimerní struktury Atg12-Atg5-Atg16L (40, 41). Tento komplex je lokalizován na izolačních membránách během jejich prodlužování, avšak je oddělen ještě před dokončením autofagosomální tvorby (42).

Protein LC3 je klíčovým prvkem pro konečný krok tvorby autofagosomů. LC3 se štěpí cysteinovou proteasou Atg4 a následně se konjuguje s membránovým lipidem fosfatidylethanolaminem (PE) pomocí Atg7 a Atg3. Ve své konjugované formě je LC3 nazýván LC3-II. Tato lipidovaná LC3-II se pak spojuje s nově se tvořícími autofagosomálními membránami a zůstává na zralých autofagosomech až do fúze s lyzosomy (18, 41). Oba systémy jsou znázorněny na obr. 5.



Obr. 5 Atg12 a LC3 systémy - převzato a upraveno dle (43)

2.2.4 Maturační fáze a degradace

V savčích buňkách zrání dospělých autofagosomů zahrnuje několik fúzních procesů s vezikuly, které pochází z časných a pozdních endosomů, stejně jako lyzosomů. Fúzí autofagosomu s endosomy vzniká struktura zvaná amfisosm. Následná fúze autofagosomů nebo amfisosmů s lyzosomy vytváří autolyzosity (40).

Beclin-1 prostřednictvím interakce s Atg14L reguluje tvorbu autofagosomů a prostřednictvím interakce s UVRAG a Rubicon reguluje jejich zrání. Proteiny z rodiny SNARE lokalizované ve vnějších a vnitřních membránách jsou základními prvky intracelulární membránové fúze. Proteiny DRAM, které jsou přítomny v membráně lyzosomů, mohou regulovat pozdní stádia autofagie a řídit tvorbu autofagosomů. (44).

Vnitřní membrána autofagosomů a buněčný materiál jsou poté degradovány kyselými lyzosomálními hydrolasami. Degradční produkty jsou uvolněny do cytosolu, kde mohou být znovu použity.

2.3 Autofagie a buněčná smrt

Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, autofagie je považovaná spíše za cytoprotektivní mechanismus. Umožňuje buňce přežít v době nepříznivých podmínek a je rozhodující pro snížení buněčného stresu, ať už se jedná o nedostatek energie, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS – z anglického „Reactive Oxygen Species“), genomickou nestabilitu, akumulaci nesprávně přeložených proteinů, poškození organel nebo mikrobiální infekci.

Programovaná buněčná smrt (PCD – z anglického „programmed cell death“) je základní biologický proces, který je vysoce evolučně konzervován. Při vývoji živočichů je PCD důležitým procesem pro odstranění zbytečných nebo přebytečných buněk během tvorby tkáňového vzoru a pro udržení tkáňové homeostázy. PCD také funguje k odstranění abnormálních nebo poškozených buněk, které jsou vystaveny genotoxickému poškození či infikovány patogeny (45).

Je však známo těsné propojení autofagie s několika cestami buněčné smrti a odhaluje aktivní příspěvek autofagie ke smrti buněk. Pokud autofagie zastupuje funkční roli v procesu smrti, označujeme ji jako "autofagická buněčná smrt". Souhra mezi autofagií a buněčnou smrtí je složitá a různorodá. V závislosti na typu buňky, prostředí a podnětu mohou mít mechanismy autofagie a buněčné smrti inhibiční, aditivní nebo dokonce synergické účinky (46).

Zvýšené autofagické markery a morfologické znaky autofagie v mnoha případech umírajících buněk původně vedly právě k předpokladu autofagické buněčné smrti. Avšak autofagie je proces aktivovaný po buněčném stresu, a tak není divu, že buňky umírající po vzniklém stresu vykazují znaky autofagie. To znamená, že většina PCD není ve fyziologických systémech doposud zprostředkována autofagií, a to ani v případě, kdy je buněčná smrt doprovázena znaky autofagie (45).

Shen a Codongo (47) navrhli tři kritéria pro definování autofagické buněčné smrti: 1) buněčná smrt nastává bez účasti apoptózy, 2) došlo k nárůstu autofagického toku, nikoliv pouze k nárůstu autofagických markerů v umírajících buňkách, 3) lze zabránit buněčné smrti potlačením autofagie prostřednictvím chemických inhibitorů a genetických prostředků.

Neexistují zatím žádné přesvědčivé důkazy, které by odhalily specifický mechanismus autofagické smrti. Je však pravděpodobné, že konstitutivní autofagie může nakonec buňku zničit. Otázkou zůstává, zda-li autofagická aktivita v umírajících buňkách je příčinou smrti nebo je ve skutečnosti pokusem o její zabránění (48).

2.4 Autofagie a nádorová onemocnění

Je známo, že autofagie je spojena s vývojem nádorů, avšak její přesná role v různých stádiích nádorových onemocnění nebyla dosud zcela objasněna.

První zmínka o autofagii jako o nádorovém supresoru vycházela z genetických studií genu *Beclin-1*. *Beclin-1* je savčí autofagický gen, který může inhibovat tumorigenezi a je exprimován ve snížených hladinách v lidském karcinomu prsu, vaječníku a prostaty (49). Studie s myšimi modely odhalily také vývoj hepatocelulárních karcinomů spojených s alelickou ztrátou *Beclin-1*. Tato zjištění naznačují, že snížená exprese autofagických proteinů může přispět k tumorigenezi (50).

Mezi nádorově supresivní funkce autofagie můžeme zařadit 1) inhibici nekrózy a zánětu, 2) ochranu před oxidačním stresem a genomovou nestabilitou 3) příspěvek ke smrti nádorových buněk, 4) modulace protinádorové imunitní odpovědi, 5) inhibici metastáz (51).

Na druhou stranu je autofagie často zmiňována pro svou tumorogenní úlohu. Mezi charakteristické rysy nádorových onemocnění řadíme nezávislost na růstových stimulačních signálech, neschopnost odpovídat na signály inhibice růstu, vznik rezistence vůči programované buněčné smrti, vznik neomezené proliferační kapacity, indukci angiogeneze, vyvinutí invazivity do okolní tkáně a schopnost metastazovat (52). Během růstu nádorů dochází ke špatné vaskularizaci a tím k nedostatku živin a kyslíku. Autofagie bývá v těchto oblastech aktivována jako jeden z mechanismů přispívajících k přežití nádorových buněk (31, 53).

2.4.1 Přirozené induktory autofagie

Hladovění se řadí k neúčinnějším induktorům autofagie. Metabolický stres v mikroprostředí nádorů vyvolaný hladověním aktivuje autofagii, která umožňuje recyklaci organel a bílkovin, a tím zajistí energii potřebnou k přežití buněk (51).

Kuma *et al.* ve své studii uvedli, že myši s deficitem esenciálního autofagního genu *Atg5*, který je nezbytný pro tvorbu autofagosomů, zemřely během jednoho dne po porodu, a to z důvodu vyčerpání živin během neonatálního hladovění. Novorozenci s deficiencí *Atg5* vykazovaly snížené koncentrace aminokyselin v plazmě a tkáních (54).

AMP-aktivovaná proteinkinasa (AMPK) hraje významnou roli při ochraně před metabolickým stresem a je aktivována na základě zvýšení poměru AMP:ATP. Exprese AMPK přispívá k toleranci hladovění v nádorových buňkách. Tuto skutečnost popsali Kato *et al.* ve své studii na rakovinných buňkách pankreatu. Ztráta tumorigenicity rakovinných buněk pankreatu transfekovaných AMPK antisense RNA u myši odhalila, že tolerance k hladovění je kritickým faktorem při progresi nádoru a může proto sloužit jako nový cíl pro léčbu nádorů (55).

Hypoxie (koncentrace kyslíku ~ 3 - 0,1 %) je silným induktorem autofagie. Prostřednictvím hypoxií indukovatelného faktoru (HIF) jsou buňky schopné rychle vyvolat odezvu buněčného přežití a tím aktivovat proces autofagie. HIF je klíčový transkripční faktor, který umožňuje rychlou adaptaci a přežití ve velkém rozsahu v podmínkách nízkých koncentrací kyslíku. Má důležitou funkci při modulaci mikroprostředí nádorů, při zjišťování dostupnosti živin a při kontrole anaerobní glykolýzy, intracelulárního pH a přežití buněk. Tento proces je zprostředkován BH3 bílkovinami Bcl-2 / E1B 19 kDa interagující protein 3 (BNIP3 / BNIP3L (NIX)). Mitochondriální asociované BNIP proteiny zprostředkovávají mitofagii, která je schopna kontrolovat produkci ROS a poškození DNA. Anoxie (koncentrace kyslíku <0,1 %) je schopna indukovat autofagickou odpověď nezávislou na HIF, generovanou prostřednictvím extrémní výživové stresové odpovědi, která zahrnuje AMPK-mTOR (56, 57).

Nedostatek růstových faktorů je dalším významným induktorem autofagie. Růstové faktory ovlivňují schopnost buněk zadržet dostatečné množství živin pro udržení

produkce ATP a pro podporu samovolné makromolekulární biosyntézy. Katabolické účinky autofagie zajistí přežití buněk nezávislých na růstovém faktoru až po dobu několika týdnů (58).

2.4.2 Autofagie a metastazování

Metastázy jsou odpovědné za většinu úmrtí souvisejících s rakovinou. Můžeme je označit za komplexní proces, který lze rozdělit do několika kroků: 1) migrace nádorových buněk z místa primárního nádoru, 2) intravazace do vaskulatury nebo lymfatického oběhu a přežití v cirkulačních systémech, 3) extravazace v sekundárním místě tkáně, 4) kolonizace cílené tkáně (59, 60).

V časném stádiu vývoje rakoviny je autofagie schopna omezit metastatickou progresi z místa primárního nádoru tím, že nepřímo inhibuje zánětlivou odpověď. Podporou přežití buněk během hypoxie a metabolického stresu snižuje autofagie nekrózu nádorových buněk a následnou makrofágovou infiltraci primárního nádoru. NK buňky a T-lymfocyty přednostně inhibují vývoj nádoru. Naopak některé imunitní buňky jako jsou makrofágy, B-buňky, granulocyty či žírné buňky, mohou upřednostňovat vývoj rakoviny (61).

Anoikis je PCD vyvolaná ztrátou buněčné adheze nebo nevhodnou adhezí buněk. Adheze na extracelulární matrici je důležitá pro správné umístění buněk k tomu, aby došlo k jejich případnému odstranění pomocí apoptózy. Přežití a metastazování nádorových buněk tedy závisí na aktivaci mechanismů odolávajících anoikis (62). Ačkoli se zpočátku předpokládalo, že autofagie podporuje smrt těchto oddělených buněk, poslední studie ukázaly, že chrání především epiteliální buňky od anoikis. Tato úloha může být obzvláště důležitá v pozdějších stádiích šíření nádoru a metastáz (61).

2.5 Autofagie v ozářených buňkách

V oblasti léčby nádorů byly identifikovány dvě primární formy autofagie. Na základě toho, jakou funkci plní autofagie v nádorových buňkách rozlišujeme: 1) cytoprotektivní formu a 2) cytotoxickou formu (63).

Ionizujícím zářením indukovaná cytoprotektivní forma autofagie poskytuje buňkám schopnost eliminovat toxické látky, jako jsou volné radikály a poškozené nebo nesprávně složené proteiny a organely. Dále také umožňuje buňkám zabránit apoptóze a tím vede ke zvýšenému přežívání nádorových buněk (64).

Řada protinádorových terapií indukuje autofagii. Zůstává však otázkou, jestli autofagie skutečně přispívá k účinnosti léčby. Vzhledem k tomu, že autofagie se běžně vyskytuje v nádorových buňkách i před jejich zánikem, není jasné, zda je pozorovaná autofagie cytotoxický děj nebo jen průvodní jev v jiné buněčné smrti (65).

2.6 Inhibitory autofagie

V posledních letech převládá názor, že jedním z možných mechanismů vzniku rezistence na protinádorové terapie může být aktivace cytoprotektivní autofagie. Toto poznání vedlo k závěru, že by potenciální inhibice autofagie mohla zvýšit účinnost protinádorové léčby. Několik studií s cílem sensibilizace nádorových buněk bylo s použitím inhibitorů autofagie úspěšně provedeno a můžeme z nich vyvodit, že radiosensitizace pomocí inhibitorů autofagie je možná, ale ne u všech typů nádorů (66).

Výsledky ve studii Lomonaco *et al.* ukazují, že indukce autofagie přispívá k radiorezistenci maligních gliomů a inhibitory autofagie mohou být použity pro zvýšení citlivosti CD133+ gliomových kmenových buněk na γ -záření (67). Rovněž bylo prokázáno, že gliomové buňky léčené autofagními inhibitory měly rozsáhlejší dvojvláknové štěpení DNA než buňky ošetřené samotným zářením (68). Chen *et al.* ve své studii zkoumali účinek inhibitoru 3-methyladeninu v ozařovaných buňkách karcinomu jícnu TE-1 a vyhodnotili, že inhibice autofagie může být použita ke zvýšení účinnosti radioterapie (69).

2.6.1 Lys05

Inhibitor Lys05 je bivalentní aminochinolinový analog hydroxychlorochinu (HCQ). Sloučenina je ve vodě rozpustná a velmi rychle se akumuluje v lyzosomech buněk. Použití Lys05 má za následek zvýšení lyzosomální hodnoty pH a inhibici autofagie. V porovnání s HCQ je Lys05 desetkrát účinnějším inhibítozem autofagie (66).

Lys05 inhibuje autofagii tím, že se akumuluje v lyzosomech a deaciduje lyzosym. McAfee *et al.* ve své studii léčby xenograftu 1205Lu (melanom) prokázali, že rozdíl ve velikosti lyzosomální inhibice, který lze dosáhnout u Lys05 ve srovnání s HCQ *in vivo*, je doložen 34-násobně vyššími koncentracemi Lys05 v lyzosomech nádorových buněk a souvisejícím zdvojnásobením akumulace autofagických vezikul (70). Inhibitor Lys05 zatím není komerčně dostupný, díky spolupráci s kolektivem Dr. McAfeeho máme ale možnost s ním pracovat.

2.6.2 Bafilomycin A1

Bafilomycin A1 (Baf) je selektivní inhibitor lyzosomální protonové pumpy – vakuolární ATPasy. Svým způsobem inhibuje translokaci H^+ , což způsobuje akumulaci H^+ v cytoplazmě léčených buněk. Zabraňuje zrání autofagických vakuolů inhibicí fúze mezi autofagosomy a lyzosomy (71–73).

Yuan *et al.* ve své studii uvedli, že Baf v nízké koncentraci (1 nM) účinně a specificky inhibuje a zabíjí dětské B-lymfocyty akutní lymfoblastické leukémie. Ve své studii dále popsali inhibici autofagie nejen v pozdním stádiu fúze autofagosomů a lyzosomů, ale také v její časné signalizaci, aktivaci mTOR a snížením tvorby komplexu Beclin 1-Vps34 (73). Mimo to je Bafilomycin A1 již zavedeným inhibítozem autofagie a je proto vhodný pro srovnání účinnosti nového inhibítozem Lys05.

3 CÍL PRÁCE

Tato studie vychází z předpokladu, že autofagie je cytoprotektivní mechanismus, jehož úkolem je zabezpečit přežití buněk v nepříznivých podmínkách jako je například IZ. Předpokládá se, že tento mechanismus je hojně využíván nádorovými buňkami během radioterapie, a proto by měla inhibice tohoto mechanismu vést k radiosensibilizaci nádorových buněk.

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda použití inhibitorů autofagie v kombinaci s IZ přispívá k eradikaci nádorových buněk a vede k jejich radiosensibilizaci.

Z výše uvedeného vyplývají dále následující konkrétní body k řešení:

- optimalizace metody vizualizace lyzosomů pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie
- studium kvalitativních změn buněk H1299 po přidání inhibitoru autofagie Lys05 a Bafilomycin A1 pomocí fluorescenční mikroskopie za použití zeleného fluorescenčního barviva LysoSensor Green DND-189
- studium kvantitativních změn buněk H1299 po přidání inhibitoru autofagie Lys05 a Bafilomycin A1 pomocí průtokové cytometrie za použití zeleného fluorescenčního barviva LysoSensor Green DND-189
- posouzení vhodnosti zvolené metody pro studium radiosensibilizace nádorových buněk pomocí modulace autofagie.

PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A METODIKA

4.1 Přístroje

Automatické pipety

Bürkerova komůrka – MEOPTA

Centrifuga – Thermo JOUAN BR4i Multifunction

CO₂ inkubátor – New Brunswick Galaxy 170R

Fluorescenční mikroskop – Olympus BX51, Kamera – DP73

Hematologické počítadlo krevního diferenciálu – Hexan

Laminární box – BioAir Safeflow 1.2

Lednice – Electrolux

Pipetor – Brand

Počítač – HP, Programy – Cellsense Entry, Image-Pro Plus 7.0

Průtokový cytometr – Beckman Coulter CyAn ADP

Světelný mikroskop – Olympus

Vodní lázeň – Clifton

Vortex – Genius 3

Zářič – Chisobalt ⁶⁰Co

4.2 Spotřební materiál

6-jamkové kultivační destičky – TPP

Buněčná škrabka – TPP

Centrifugační a mikrocentrifugační zkumavky – TPP, Eppendorf

Malá kultivační láhev s filtrem (25 cm²) – TPP

Odměrné sklo – skleněné pipety (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), kádinky, odměrné válce

Sklička a krycí sklička – Academy Science, Economy Hamburg

Střední kultivační láhev bez filtru (75 cm²) – TPP

Špičky – Eppendorf

4.3 Chemikálie

70% ethanol – Lachner

Bafilomycin A1 – Sigma-Aldrich

DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) – Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich

Fetal Bovine serum (FBS) – Gibco

Lys05 – dar od Dr. McAfeeho (University of Pennsylvania)

LysoSensor Green DND-189 – Invitrogen, Thermo Fischer

Phosphate-Buffered Saline (PBS) – Sigma-Aldrich

Penicilin-Streptomycin (PNC) – Sigma-Aldrich

Trypanová modř – Sigma-Aldrich

Trypsin (TRP; 0,25% TRP-EDTA) - Gibco

Základní RPMI médium 1640 – Gibco

4.4 Biologický materiál

Buněčná linie H1299

Zdroj: American Type Culture Collection (ATCC), katalogové číslo – CRL-5803

Původ: lidský nemalobuněčný karcinom plic (pochází z metastatického místa – lymfatická uzlina)

Charakteristika: morfologie – epiteliální, adherující vlastnosti kultury, buňky mají homozygotní částečnou delecí proteinu p53, chybí exprese proteinu p53

Kryokonzervace: mrazící médium – kompletní růstové médium doplněné 5% DMSO, skladovací teplota – kapalná fáze dusíku

Pasážování: 2x týdně (Po + Čt)

Kultivační podmínky: teplota 37 °C, atmosféra – vzduch 95 %, CO₂ 5 %

Médium: RPMI médium + 10% FBS sérum + 1% PNC

4.5 Příprava média

Kultivační médium musí splňovat pro dané buněčné linie vhodné fyzikálně-chemické podmínky. Tvoří obvykle tenkou vrstvu kapaliny nad kultivovanými buňkami, napodobuje extracelulární tekutinu a zajišťuje tím difúzi kyslíku a oxidu uhličitého. Médium obsahuje dostatečné množství živin, které buňky potřebují pro život a proliferaci až po několik dní. Mezi významné látky patří např. anorganické soli, glukosa, pufrý, bílkoviny, růstové faktory, vitamíny, mastné kyseliny atd. (74).

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- Laminární box, CO₂ inkubátor, vodní lázeň, střední kultivační láhev bez filtru, pipetor, skleněné pipety

CHEMIKÁLIE

- Základní RPMI médium, FBS, PNC, 70% ethanol, dezinfekce – naředěné SAVO

POSTUP

Ve vodní lázni při 37 °C necháme rozmrazit FBS a PNC. V laminárním boxu do střední kultivační láhve bez filtru napipetujeme 178 ml základního RPMI média (89% média), 20 ml FBS séra (10% média) a 2 ml PNC (1% média). Médium promícháme a dbáme na riziko kontaminace. Připravené základní médium skladujeme v lednici při 4 °C, FBS a PNC skladujeme v mrazáku. Použité laboratorní pomůcky dáváme do dezinfekce. Všechny předměty je nutné před vložením do laminárního boxu ostříkat 70% ethanolem, aby se zabránilo kontaminaci.

4.6 Rozmrazení buněk

Při použití hlubokomrazicího boxu (teplota kolem -80 °C) lze kultivované živé buňky uschovat po dobu několika měsíců až let. Při zamrazení je nutné dbát na riziko poškození buněk krystaly vody, proto se do kultivačního média přidává vhodné kryoprotektivum (nejčastěji DMSO). Mrznutí buněk by mělo probíhat pomalu, naopak

rozmražení co nejrychleji. Další možností uchovávání buněčné kultury je zmražení v párách kapalného dusíku (74).

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- Laminární box, vodní lázeň, centrifuga, centrifugační zkumavka, kádinka, malá kultivační láhev s filtrem, kahan

CHEMIKÁLIE

- RPMI médium, 70% ethanol, dezinfekce – naředěné SAVO

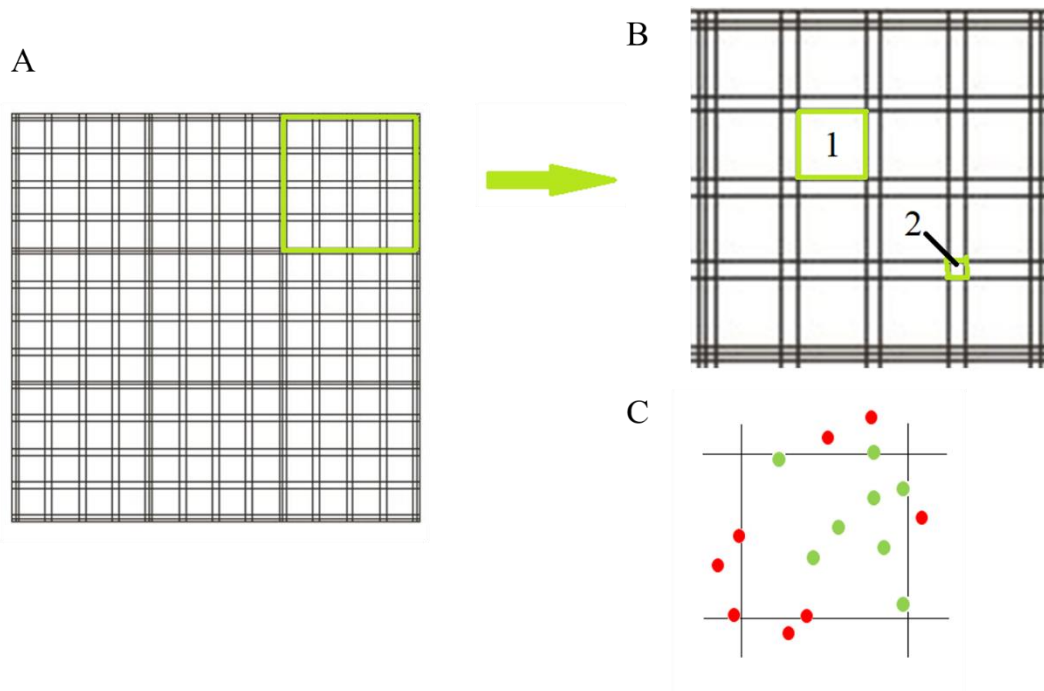
POSTUP

Ve vodní lázni si zahřejeme RPMI médium na 37 °C a vytemperujeme centrifugu na 24 °C. Vyndáme buněčnou linii, která se uchovává při -150 °C, z mrazáku a dáme do kádinky s teplou vodou. Do 15 ml centrifugační zkumavky napipetujeme 8 ml RPMI média a k tomu přidáme celý objem buněk ze zkumavky (1 ml – množství: 10^4), kterou ještě vypláchneme 1 ml média a přidáme do centrifugační zkumavky. Centrifugujeme při podmínkách – 1100 rpm, 5 min, 24 °C. Do laminárního boxu si připravíme malou kultivační láhev a řádně si ji označíme – typ buněk, pasáž, datum, jméno. Dále do ní napipetujeme 9 ml RPMI média. Po centrifugaci slijeme médium s peletou buněk v centrifugační zkumavce do odpadu a buňky resuspendujeme v 1 ml RPMI média. Suspenzi buněk přeneseme do malé kultivační láhve s filtrem, opálíme hrdlo a vložíme do inkubátoru. Použité laboratorní pomůcky dáváme do dezinfekce. Všechny předměty je nutné před vložením do laminárního boxu oštíkat 70% ethanolem, aby se zabránilo kontaminaci.

4.7 Počítání buněk

Naší buněčnou linii jsme počítali pomocí Bürkerovy komůrky. Bürkerova komůrka je speciální podložní sklíčko, které je uprostřed rozdělené na dvě stejná pole ležící o 0,1 mm níže oproti okolí. Po překrytí krycím sklíčkem tak vzniká prostor vysoký 0,1 mm, ve kterém se počítají buňky. Bürkerova komůrka bývá vybavena také dvěma pérovými úchytkami, aby krycí sklíčko pevně a přesně dosedlo na počítaný políček. Počítací plocha je rozdělena trojitými čarami na 9 velkých čtverců a dvojitými čarami

na 144 středních a 169 malých čtverců (75). Zobrazení Bürkerovy komůrky můžeme vidět na obr. 6.



Obr. 6 Bürkerova komůrka

(A) Zobrazení Bürkerovy komůrky (okraje jsou tvořené trojitými čarami, aby byl zřetelný konec mřížky). (B) Detail počítací mřížky – plocha celého pole: 1 mm^2 ; plocha čtverce č.1: $1/25 \text{ mm}^2 = 0,04 \text{ mm}^2$; plocha čtverce č.2: $1/400 \text{ mm}^2 = 0,0025 \text{ mm}^2$. (C) Pravidlo pro počítání buněk v Bürkerově komůrce – vybereme si dvě sousední strany (v tomto případě horní a pravá strana) a počítáme všechny buňky, které leží uvnitř obrazce nebo se dotýkají zvolených stran ať už zevnitř či vně (označeny zeleně). Buňky dotýkající se protilehlých stran nepočítáme (označeny červeně). Po smísení buněčné suspenze s roztokem trypanové modři – živé buňky zůstávají světlé (neobarvené), modře zbarvené buňky jsou zemřelé a nepočítáme je.

VÝPOČET

Zjištěný počet buněk / (objem počítané části komůrky x ředění vzorku)

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- Mikroskop, vortex, plastová pipeta, automatická pipeta a špičky, zkumavky, Bürkerova komůrka, krycí sklíčko, buničina, hematologické počítadlo

CHEMIKÁLIE

- Trypanová modř, 70% ethanol, dezinfekce – naředěné SAVO

POSTUP

Smícháme 50 μ l buněčné suspenze a 50 μ l trypanové modře. Pomocí vortexu důkladně promícháme. Na čistou Bürkerovu komůrku položíme krycí sklíčko tak, aby těsně přiléhalo. Promíchanou suspenzi nanese do obou počítacích mřížek (na hranu krycího sklíčka); snažíme se předejít tvorbě bublin. Takto připravenou Bürkerovu komůrku vložíme do zorného pole světelného mikroskopu a po zaostření pozorujeme při středním zvětšení (100x). Počítáme vždy čtverec po čtverci, a to směrem zleva doprava a shora dolů dle pravidel uvedených na obr. 6. Počítání si můžeme usnadnit použitím hematologického počítadla. Po ukončení počítání, oddělíme krycí sklíčko od Bürkerovy komůrky a důkladně očistíme (70% ethanol) a vytřeme do sucha.

4.8 Pasážování buněk

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- Laminární box, automatické pipety a špičky, skleněné pipety, pipetor, kádinka, malá kultivační láhev s filtrem, CO₂ inkubátor, vodní lázeň, světelný mikroskop

CHEMIKÁLIE

- RPMI médium, TRP, PBS, 70% ethanol, dezinfekce – naředěné SAVO

POSTUP

RPMI médium dáme zahřát na 37 °C do vodní lázně. TRP vyndáme z mrazáku, necháme rozmrazit a zahřát na 37 °C. Do laminárního boxu si připravíme kádinku na odpad a malou kultivační láhev s filtrem, kterou řádně popíšeme – buněčná linie, pasáž, počet buněk/objem, datum, jméno. Vyndáme kultivované buňky z inkubátoru, zkontrolujeme okometricky a také pod světelným mikroskopem. Vložíme do laminárního boxu, otevřeme kultivační láhev a slijeme celé médium pomocí skleněné pipety do odpadu, protože buňky jsou adherovány ke dnu kultivační láhve. Opláchneme pomocí PBS, zvolíme takové množství, aby pokrylo celé dno kultivační láhve (2 ml). Vložíme

do laminárního boxu již rozmražený TRP a napipetujeme 1ml do kultivační láhve s buňkami a necháme 4 minuty působit. Pokud by se buňky neodlepily ode dna, tento postup zopakujeme nebo použijeme škrabku. Vytáhneme zahřáté RPMI médium z vodní lázně a vložíme do laminárního boxu. Do kultivační láhve napipetujeme 5-násobné množství oproti TRP (5 ml) a pořádně promícháme a resuspendujeme ve špičce. Připravíme si dvě zkumavky, napipetujeme do nich 50 μ l suspenze buněk a 50 μ l trypanové modře a spočítáme buňky podle postupu z předchozí kapitoly. Do nové malé kultivační láhve s filtrem odebereme 4×10^5 buněk do celkového objemu 10 ml média. Zkontrolujeme pod světelným mikroskopem a dáme do inkubátoru. Pasážujeme 2x týdně. Použité laboratorní pomůcky dáváme do dezinfekce. Všechny předměty je nutné před vložením do laminárního boxu ostříkat 70% ethanolem, aby se zabránilo kontaminaci.

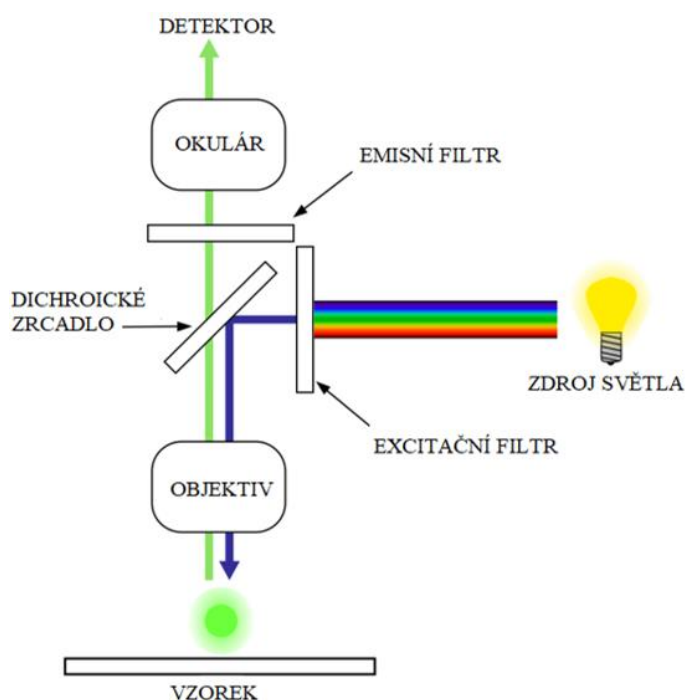
4.9 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence je fyzikální jev spočívající v tom, že některé látky (fluorofory) po excitaci světlem určité vlnové délky emitují světlo jiné vlnové délky. Emitované záření je charakterizováno větší vlnovou délkou a nižší energií oproti excitačnímu záření. Rozdíl mezi excitovanými a emitovanými vlnovými délkami se nazývá Stokesův posun. Tento posun souvisí se ztrátou části energie odlišnými nefluorescenčními procesy jako je např. uvolnění tepla. Na vlnové délce je závislá intenzita absorpce excitačního záření i fluorescenční emise (76, 77).

Využití tohoto jevu se stalo základem fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční mikroskopie je často využívána pro svoji vysokou citlivost. Stanovované fluoreskující látky mohou být detekovány při velmi nízkých koncentracích. Základní schéma fluorescenčního mikroskopu můžeme vidět na obr. 7.

Použití excitačního a emisního (bariérového) filtru nám zajistí vysoký kontrast vůči pozadí (světelný signál na temném pozadí). Excitační filtr propouští ze spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence. Emisní filtr umožňuje propouštění pouze emisní části spektra, a naopak zabraňuje průchodu excitačního světla. Při fluorescenční mikroskopii se jako zdroj světla používá převážně vysokotlaká výbojka. Tyto výbojky

bývají umístěny do lampové skříně z důvodu vysokých vnitřních tlaků plynů ve výbojce a extrémních teplot. Zabraňuje také úniku krátkovlnného UV záření, které by při intenzitě vyvolané výbojkou, mohlo poškodit oči. V poslední době se do popředí dostává konfokální mikroskopie, kde se jako zdroj záření používá laser. Závěrka (shutter) je součástí osvětlovače a její funkce je regulace průchodu světla osvětlovačem. Dichroické zrcadlo je tenkostěnné zrcadlo, které je umístěné pod úhlem 45°. Odráží světlo definovaného rozsahu vlnových délek a zabraňuje propouštění světla odlišných vlnových délek. Odráží tedy excitační záření do objektivu a propouští emisní záření z objektivu do okulárů (76).



Obr. 7 Obecné schéma fluorescenčního mikroskopu - převzato, upraveno dle (78)

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- Fluorescenční mikroskop, PC, podložní sklíčka, krycí sklíčka, 6-jamkové kultivační destičky, automatické pipety, skleněné pipety, pipetor, laminární box, CO₂ inkubátor, vodní lázeň, kádinka, jehla, velká a malá centrifugační zkumavka, zářič

CHEMIKÁLIE

- RPMI médium, PBS, DAPI, Lys05, Baf, DMSO, LysoSensor Green, 70% ethanol, dezinfekce – naředěné SAVO

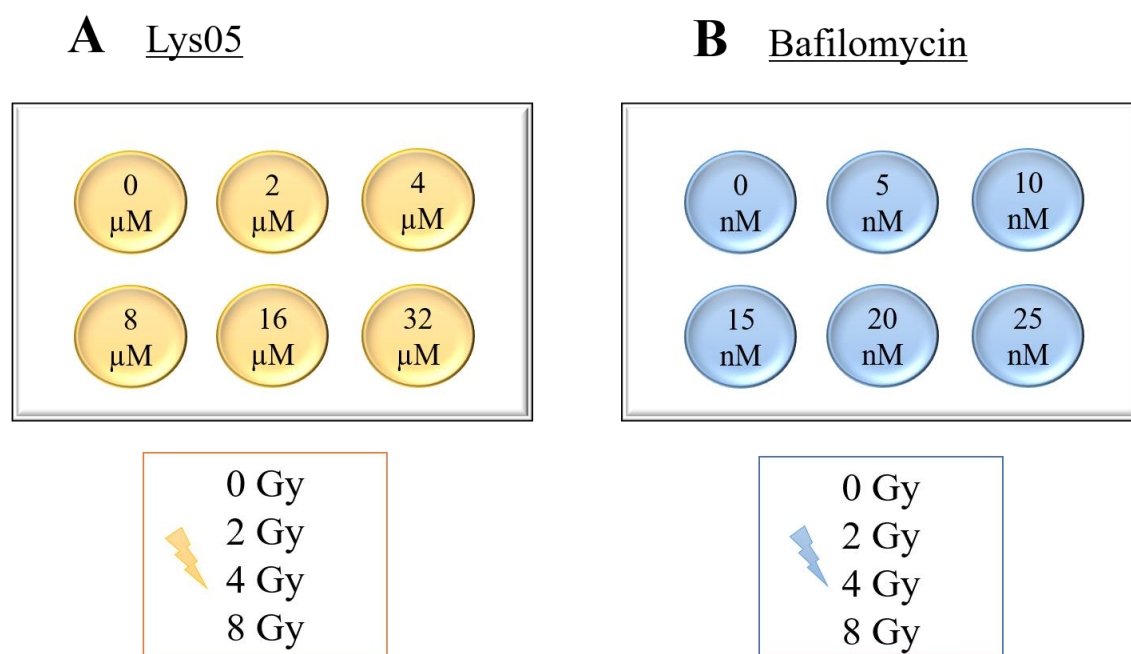
POSTUP

Pro práci s fluorescenčním mikroskopem musíme nejprve připravit buněčnou linii. Do laminárního boxu dáme osm 6-jamkových destiček a krycí sklíčka; vše před vložením ostříkáme 70% ethanolem. Do všech 6-jamkových destiček dáme krycí sklíčka a přidáme 2 ml RPMI média. Vyndáme z inkubátoru malou kultivační lahev s buněčnou linií H1299 a provedeme klasicky pasážování a počítání buněk (viz kapitola 4.7 a 4.8). Po spočítání buněk odebereme odpovídající množství buněčné suspenze tak, aby bylo v každé jamce destičky 10^5 buněk. Krouživými pohyby opatrně promícháme, uzavřeme, řádně popíšeme (buněčná line, počet buněk, datum, jméno), zkontrolujeme pod mikroskopem a vložíme do inkubátoru. Necháme kultivovat 3 dny.

Po 24 hod přidáváme do všech 6-jamkových destiček příslušné inhibitory autofagie v různých koncentracích. Inhibitor Lys05 přidáváme tak, aby byla výsledná koncentrace 0; 2; 4; 8; 16; 32 μM a pro inhibitor Baf výsledná koncentrace 0; 5; 10; 15; 20; 25 nM. Lys05 máme k dispozici jako prášek, musíme ho tedy převést do roztoku. Vypočítanou navážku rozpustíme v 1 ml PBS a dále spočítáme kolik budeme přidávat inhibitoru Lys05 do jednotlivých jamek pro různé koncentrace. Baf máme již ve formě roztoku a ředíme v 1 ml DMSO. Po vypočítání přídavek inhibitorů, napipetujeme automatickou pipetou přesné množství do každé jamky podle koncentrací, uzavřeme a krouživými pohyby opatrně promícháme. Necháme 1 hod inkubovat v inkubátoru. Poté jednotlivé destičky necháme ozářit – 0; 2; 4; 8 Gy (1 destička Lys05 a 1 destička Baf – 0 Gy, 1 destička Lys05 a 1 destička Baf – 2 Gy, 1 destička Lys05 a 1 destička Baf – 4 Gy, 1 destička Lys05 a 1 destička Baf – 8 Gy, celkem tedy 8 destiček). Po ozáření vložíme znovu do inkubátoru a necháme buňky dále kultivovat. Zjednodušený postup můžeme vidět na obr. 8.

48 hod po ozáření vyndáme destičky z inkubátoru, prohlédneme pod mikroskopem a vložíme do laminárního boxu. RPMI médium vyndáme z lednice a necháme zahřát na 37 °C ve vodní lázni. Připravíme si 1 μM roztok LysoSensoru Green, který ředíme v zahřátém RPMI médiu. Při práci s LysoSensorem je nutné mít vypnuté světlo v laminárním boxu a při jeho přípravě mít zkumavku obalenou alobalem tak, aby

byl připravovaný roztok ve tmě. Ze všech destiček slijeme médium pomocí skleněné pipety do odpadu. Do každé jamky napipetujeme 1 ml připraveného roztoku média s LysoSensorem, uzavřeme destičky, krouživými pohyby opatrně promícháme a vložíme zpět do inkubátoru, kde necháme destičky 30 minut inkubovat. Mezitím si připravíme do laminárního boxu podložní sklíčka, která si řádně označíme (inhibitor, koncentrace, dávka záření). Po 30-minutové inkubaci vložíme destičky zpět do laminárního boxu, odpipetujeme médium s LysoSensorem do odpadu a promýváme 1 ml PBS. Po promytí vyndáváme pomocí jehly jednotlivá krycí sklíčka z jamek, na kterých jsou adherované buňky. Krycí sklíčka překlápíme na připravená a popsaná podložní sklíčka. K fluorescenčnímu mikroskopu přenášíme v deskách, aby byla sklíčka ve tmě. Mikroskopujeme při zvětšení 200x bez imerzního oleje a fotografie zpracováváme pomocí programu Cellsense Entry.



Obr. 8 Koncentrace inhibitorů autofagie pro fluorescenční mikroskopii

(A) Koncentrace inhibitoru Lys05 a dávky záření: 0; 2; 4; 8 Gy

(B) Koncentrace inhibitoru Baf a dávky záření: 0; 2; 4; 8 Gy

Pokud chceme při mikroskopování zvýraznit jádra buněk, použijeme DAPI. Po promytí 1 ml PBS přidáme 100 µl DAPI do každé jamky a necháme 1 minutu inkubovat. Poté DAPI odpipetujeme do odpadu a následně znovu promyjeme 1 ml PBS. Po promytí vyndáme krycí sklíčka s adherovanými buňkami.

4.10 Průtoková cytometrie

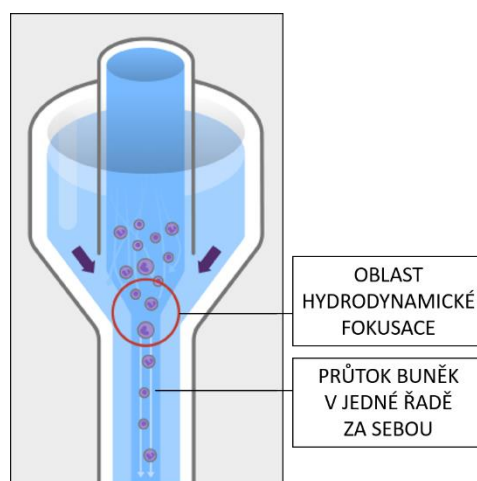
Průtoková cytometrie se uplatňuje v mnoha biomedicínských oborech. Vyznačuje se rychlostí analýzy, vysokou úrovní automatizace, výbornou reprodukovatelností a nízkou spotřebou reagensů. Umožňuje kvantitativní i kvalitativní analýzu povrchových i nitrobuněčných znaků buněk v suspenzi. Průtoková cytometrie ale není schopna poskytnout strukturální údaje ve smyslu organizace tkání, a proto je vhodnou doplňující metodou právě fluorescenční mikroskopie (79). Srovnání těchto dvou metod můžeme vidět v tab. 1.

Tab. 1 Srovnání průtokové cytometrie s klasickou mikroskopií buněčných suspenzí

	Klasická mikroskopie	Průtoková cytometrie
Počet vyšetřovaných buněk	10 ² -10 ³	10 ⁵ -10 ⁷
Reprodukovatelnost	Nízká	Vysoká
Hodnocení intenzity fluorescence	Subjektivní	Objektivní
Citlivost	Nízká až střední	Velmi vysoká
Rozměrové parametry	Málo přesné	Dobré rozlišení velikosti
Hodnocení	Kvalitativní	Kvalitativní i kvantitativní
Možnost vyšetření více znaků na jedné buňce	Obtížné	Snadné
Potřeba biologického materiálu	Vysoká	Nízká
Doba jednoho vyšetření	> 5 min	1 min
Pracnost	Vysoká	Nízká, automatizace sběru
Archivace výsledků	(digitální) fotografie	Elektronická forma
Možnost separace buněk	Není	Možná (průtokové třídiče)
Náklady na reagensie	Vyšší	Nižší
Vysvěcování fluorochromů	Významné	Většinou nepodstatné
Možnost třídění	Obtížné	U třídičů (sorterů) snadné
Náklady na vybavení	Nižší až střední	Střední až vysoké

- převzato a upraveno dle (79)

Mezi základní komponenty průtokového cytometru řadíme 1) fluidní systém, 2) optický systém a 3) počítačový systém. Vzorek ve formě suspenze je trubičkou přenášen do průtokové kyvety. Laminární proudění nosné kapaliny zajišťuje tzv. hydrodynamickou fokusaci (jednotlivé částice proudí v řadě za sebou). Oddělení částic je důležité pro snímání každé částice zvlášť (80). Znázornění hydrodynamické fokusace můžeme vidět na obr. 9.



Obr. 9 Hydrodynamická fokusace - převzato, upraveno dle (81)

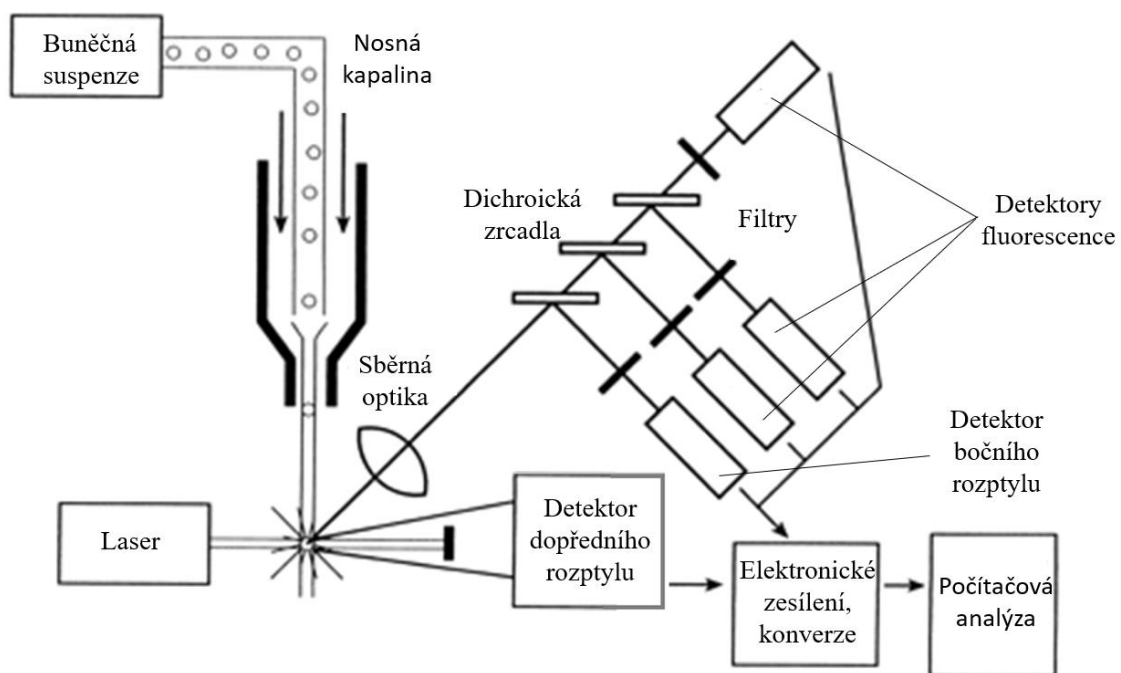
Zdrojem světla je laser (modrý – 488 nm a červený – 635 nm); existují i vícelaserové cytometry. Laserový paprsek je pomocí zaostřovací čočky zaměřen na průtokovou kyvetu a zachycuje částice, které jsou značené fluorochromem. Po dopadu laserového záření na částici dochází k jeho rozptylu. Pomocí fluorescenčního a rozptýleného světla můžeme získat přehled o velikosti, tvaru a granularitě částic. Získáme také informace o intenzitě fluorescence částic.

Signál dopředního rozptylu je zachycen diodou dopředního rozptylu, která zaznamenává signál v 20° úhlu od osy laserového paprsku. Díky její intenzitě můžeme zjistit informaci o velikosti částic. Signály fluorescence a bočního rozptylu jsou zachyceny sběrnou čočkou fluorescence. Tyto signály jsou následně spektrálně rozděleny pomocí dichroických zrcadel a filtrů.

Detektory fluorescence a bočního rozptylu bývají uspořádány do osmiúhelníku nebo trojúhelníku a jsou složeny z fotonek s násobičem, které zachycují světelný rozptyl

v 90° úhlu od laserového paprsku. Jeho intenzita nám dává přehled o vnitřní struktuře částic. Schéma průtokového cytometru je znázorněno na obr. 10.

Signály z optického systému jsou převáděny na elektrické impulsy a jsou následně zpracovávány počítačovým systémem. Výsledek je vyjádřen graficky lineární nebo logaritmickou amplifikací signálů snímaných detektory (82).



Obr. 10 Schéma průtokového cytometru - převzato, upraveno dle (82)

POMŮCKY A PŘÍSTROJE

- Průtokový cytometr, PC, zkumavky, laminární box, vodní lázeň, CO₂ inkubátor, buněčná škrabka, kádinka, skleněné pipety, automatická pipeta, pipetor, vortex

CHEMIKÁLIE

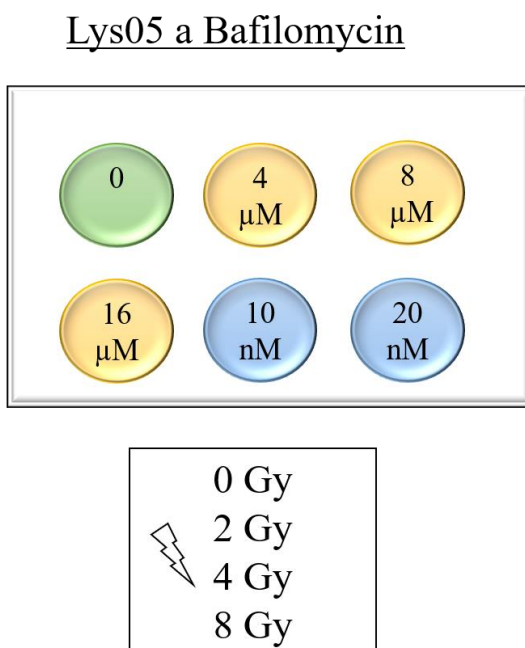
- RPMI médium, PBS, Lys05, Baf, LysoSensor Green, DMSO

POSTUP

Pro pokusy s průtokovou cytometrií musíme nejprve připravit buněčnou linii. Do laminárního boxu připravíme čtyři 6-jamkové destičky a řádně popíšeme (buněčná

linie, počet buněk, datum, jméno). Z inkubátoru vyndáme malou kultivační lahvičku s buněčnou linií H1299. Klasicky zpasážujeme a spočítáme buňky (viz kapitola 4.7 a 4.8). Po spočítání buněk napipetujeme do každé jamky všech čtyř destiček 2 ml RPMI média a doplníme suspenzí buněk tak, aby v každé jamce bylo 10^6 buněk. Destičky uzavřeme, krouživými pohyby jemně promícháme a dáme do inkubátoru kultivovat na 3 dny.

Po 24 hod přidáváme inhibitory autofagie Lys05 a Baf v příslušných koncentracích, jak můžeme vidět na obr. 11. Inhibitor Lys05 dáváme do jamek destičky ve vybraných koncentracích 4 μM , 8 μM a 16 μM . Inhibitor Baf používáme ve vybraných koncentracích 10 nM a 20 nM. Napipetujeme odpovídající množství obou inhibitorů do jamek kultivačních destiček, uzavřeme, promícháme a vložíme do inkubátoru. Inkubujeme po dobu 1 hod. Následně necháme destičky ozářit dávkami 0; 2; 4; 8 Gy (1 destička Lys05 + Baf – 0 Gy, 1 destička Lys05 + Baf – 2 Gy, 1 destička Lys05 + Baf – 4 Gy, 1 destička Lys05 + Baf – 8 Gy). Po ozáření destičky opět vložíme do inkubátoru a necháme kultivovat.



Obr. 11 Koncentrace inhibitorů autofagie pro průtokovou cytometrii

Koncentrace inhibitoru Lys05 – 4 μM , 8 μM a 16 μM (žlutá pole), koncentrace inhibitoru Baf – 10 nM a 20 nM (modrá pole), zelené pole – kontrola.

48 hod po ozáření vyndáme kultivované buňky v destičkách z inkubátoru, zkontrolujeme pod mikroskopem a vložíme do laminárního boxu. RPMI médium dáme zahřát na 37 °C do vodní lázně. Připravíme si 1 μM roztok LysoSensoru Green, který chráníme před světlem. Médium v destičkách slijeme do odpadu a napipetujeme 1 ml média s LysoSensorem do každé jamky všech destiček. Uzavřeme, promícháme, uložíme zpět do inkubátoru a necháme inkubovat 30 minut. Mezitím si připravíme do laminárního boxu 24 zkumavek, 6 zkumavek pro každou destičku, a popíšeme si je (inhibitor, koncentrace, dávka záření). Po uplynutí inkubační doby vložíme destičky zpět do laminárního boxu a odpipetujeme médium s LysoSensorem do odpadu. Přidáme 1 ml PBS a pomocí buněčné škrabky oddělíme adherované buňky ode dna jamek. Dále automatickou pipetou resuspendujeme buňky a napipetujeme 1 ml do popsané zkumavky. Takto připravenou buněčnou suspenzi ve zkumavkách měříme průtokovým cytometrem. Před vlastní analýzou zvortexujeme každou zkumavku.

4.11 Statistická analýza dat

Statistická analýza dat je nevyhnutelná pro komplexní posouzení kvantitativních dat získaných měřeními. Pro porovnání dvou souborů dat a určení, zda-li je odchylka mezi nimi statisticky významná, se používá Studentův t-test.

T-test porovnává dva průměry a sděluje nám, zda se od sebe liší a jak významné jsou rozdíly mezi nimi. Jinými slovy nás informuje o tom, jestli se tyto rozdíly nemohly stát náhodou. Hodnota p je pravděpodobnost, že se výsledky z dat vzorku vyskytly náhodně. Nízké hodnoty p nám ukazují, že se výsledky experimentu nestaly náhodou. Ve většině případů je p -hodnota 0,05 (5%) považována za platnou (83).

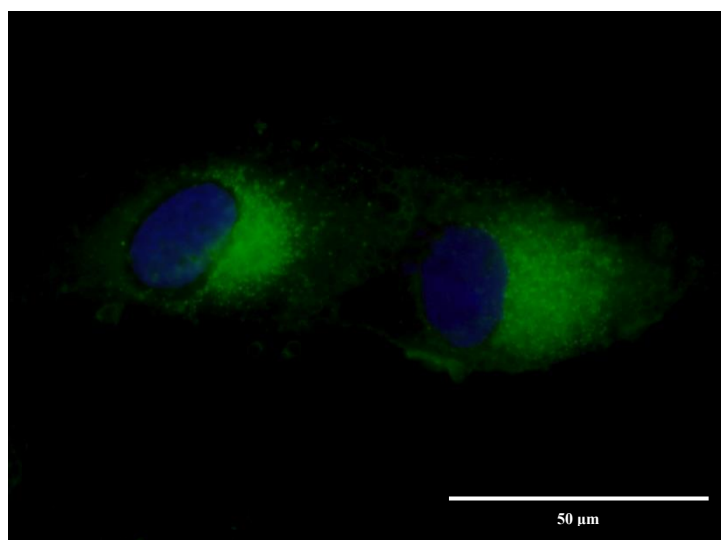
Pro statistické vyhodnocení našich dat získaných měřeními pomocí průtokové cytometrie používáme párový jednostranný t-test. Pomocí t-testu jsme vždy porovnáváme skupinu buněk ozářenou určitou dávkou IZ s neozářenou kontrolou a také skupiny buněk ošetřené inhibítorem autofagie s neošetřenými kontrolami. Jelikož očekáváme změnu intenzity fluorescence pouze v jednom směru, pro statistické vyhodnocení volíme jednostranný t-test. Jako hladiny statistické významnosti určíme 3 hodnoty: $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ a $p \leq 0,005$.

5 VÝSLEDKY

5.1 Fluorescenční mikroskopie

Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme vizualizovali lyzosity po obarvení fluorescenčním barvivem LysoSensor Green DND-189. Naším cílem bylo studovat množství a charakter lyzosomů jako i vlastnosti celých buněk. Metoda vizualizace lyzosomů pomocí fluorescenčního barviva LysoSensor nebyla dosud na katedře zavedena, proto jsme nejdřív museli tuto metodu optimalizovat.

Na obr. 12 můžeme vidět buňky H1299 s obarvenými lyzosomy a také buněčnými jádry. Pro vizualizaci jader jsme použili interkalační fluorescenční barvivo DAPI, které se používá k zviditelnění DNA. DAPI prochází buněčnou membránou a následně se váže nejsilněji do A-T oblastí DNA. Po vazbě DAPI na DNA dochází až ke dvacetinásobnému zvýšení intenzity fluorescence. Excitační maximum DAPI je 358 nm a emisní maximum 461 nm (modrá barva) (84, 85).

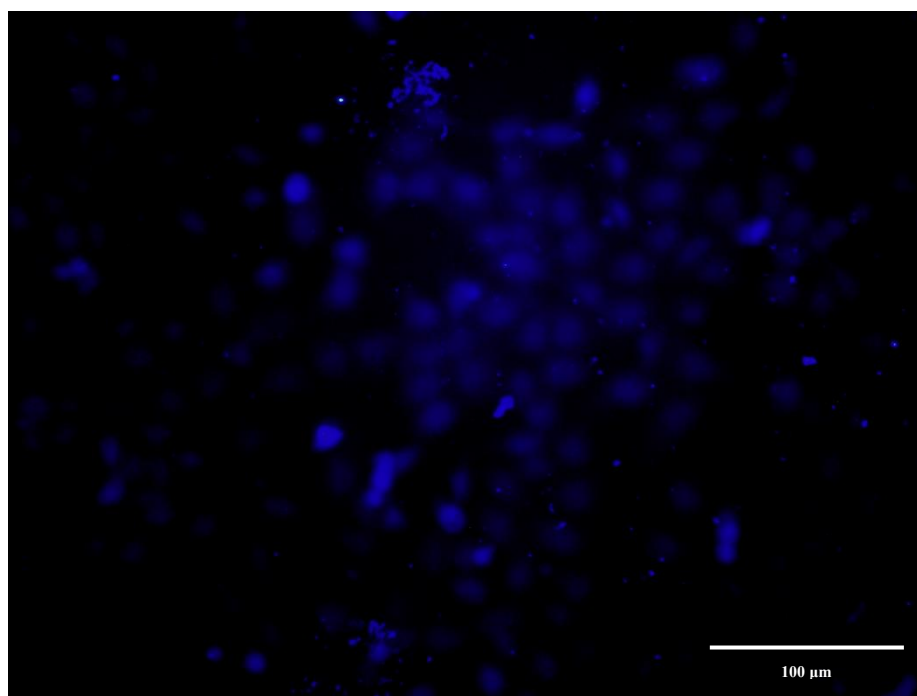


Obr. 12 Znáznornění lyzosomů pomocí LysoSensoru Green a jader pomocí DAPI

Při optimalizaci metody jsme vedle vizualizace lyzosomů použili ještě znázornění jader pomocí DAPI. Vizualizaci jader jsme prováděli z důvodu potvrzení, že struktury pozorované pod fluorescenčním mikroskopem jsou skutečně jádra zkoumaných buněk. Zvětšení 600x. Měřítka odpovídá 50 µm.

Při optimalizaci metody jsme zkoušeli buňky fixovat 4% paraformaldehydem nebo ethanolem. Dále jsme vyzkoušeli montovací médium Vectashield, které zabraňuje rychlému odbarvení fluoreskujících proteinů a fluorescenčního barviva. Jelikož je LysoSensor vitálním barvivem, nejlepších výsledků jsme proto dosáhli při práci s živými buňkami bez jakékoliv fixace. Použití DAPI vedlo také k zhoršené vizualizaci lyzosomů. Obrázky bez barvení jader jsou dostatečně průkazné a jádra jsou dostatečně rozlišitelná. V následujících pokusech jsme proto fluorescenční barvivo DAPI nepoužívali.

Pro doplňkovou vizualizaci lyzosomů jsme zkoušeli také barvu LysoSensor Yellow/Blue DND-160 v koncentracích 1 μM a 5 μM , kterou jsme nechali s buňkami inkubovat po dobu 15, 30 a 45 min. Výsledky vizualizace ale nejsou optimální ani reprodukovatelné (obr. 13). Z obrázku není jasné, zda jsou obarveny určité struktury buňky, buňka celá nebo se jedná o artefakty. Proto jsme pro finální experimenty použili jenom LysoSensor Green DND-189, pomocí kterého jsme barvili živé buňky bez jakéhokoliv dalšího barvení.



Obr. 13 Znázornění lyzosomů pomocí LysoSensoru Yellow/Blue DND-160

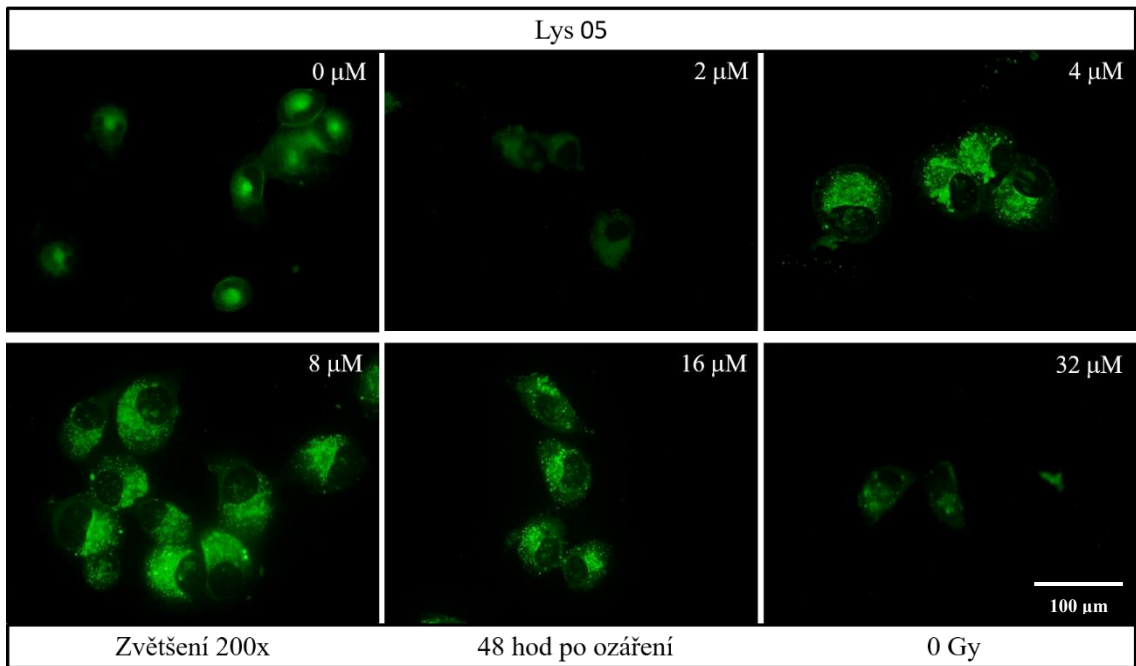
Zvětšení 200x. Měřítko odpovídá 100 μm .

5.1.1 Lys05

V našem prvním experimentu jsme porovnávali skupiny buněk ošetřené inhibitorem Lys05 v koncentracích 2-32 μM a ozářené dávkami 2-8 Gy s neošetřenými a neozařenými kontrolami. Na obr. 14-17 je zachycena vizualizace buněk H1299 pomocí fluorescenčního mikroskopu se zvětšením 200x. Buňky jsme sledovali 48 hod po ozáření.

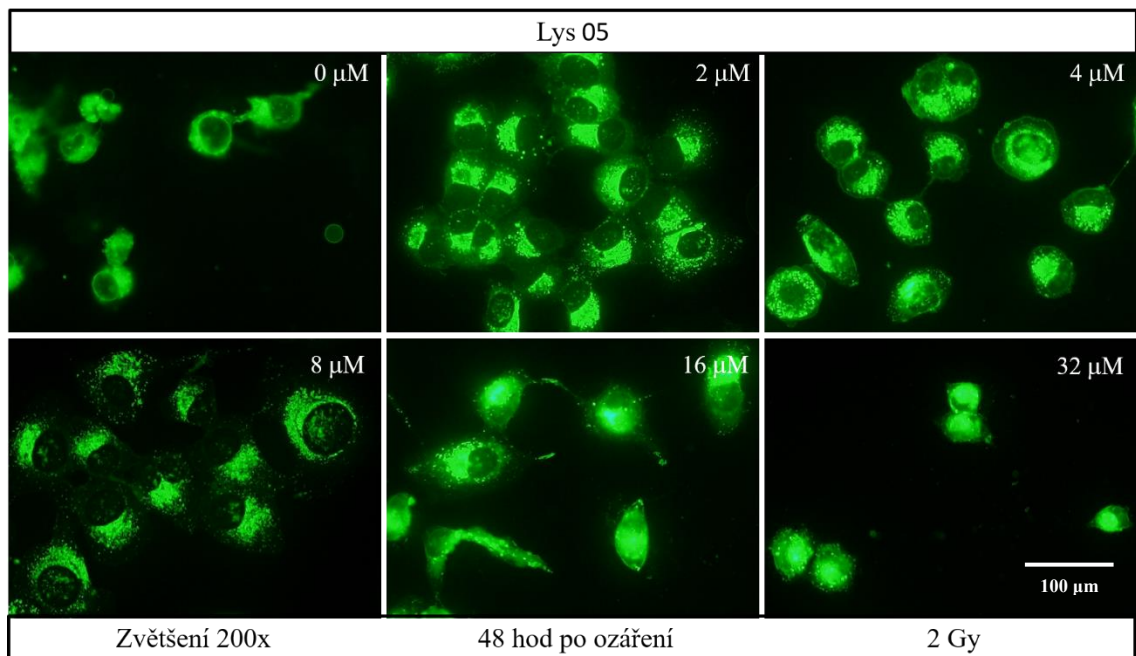
Na obr. 14-17 můžeme sledovat změny v počtu lyzosomů a také v charakteru buněk po ozáření dávkami vzestupně 0-8 Gy. Fluorescenční barvivo LysoSensor Green se zabudovává do kyselých částí buněk a intenzita sledované fluorescence, kterou emituje, koreluje se změnami pH. Proto může být toto barvivo použito ke studiu účinnosti fúze autofagosomu či lyzosomu v živých buňkách.

Z obr. 14-17 se jeví, že se zvyšující se koncentrací inhibitoru autofagie Lys05 roste intenzita fluorescence. Buňky se postupně zvětšují a zvyšuje se i granularita buněk. Na obrázcích s nejvyššími koncentracemi Lys05 (32 μM) vidíme ale nepatrné zmenšení buněk. Zvyšující se dávky záření vedly také k mírnému nárůstu intenzity fluorescence.



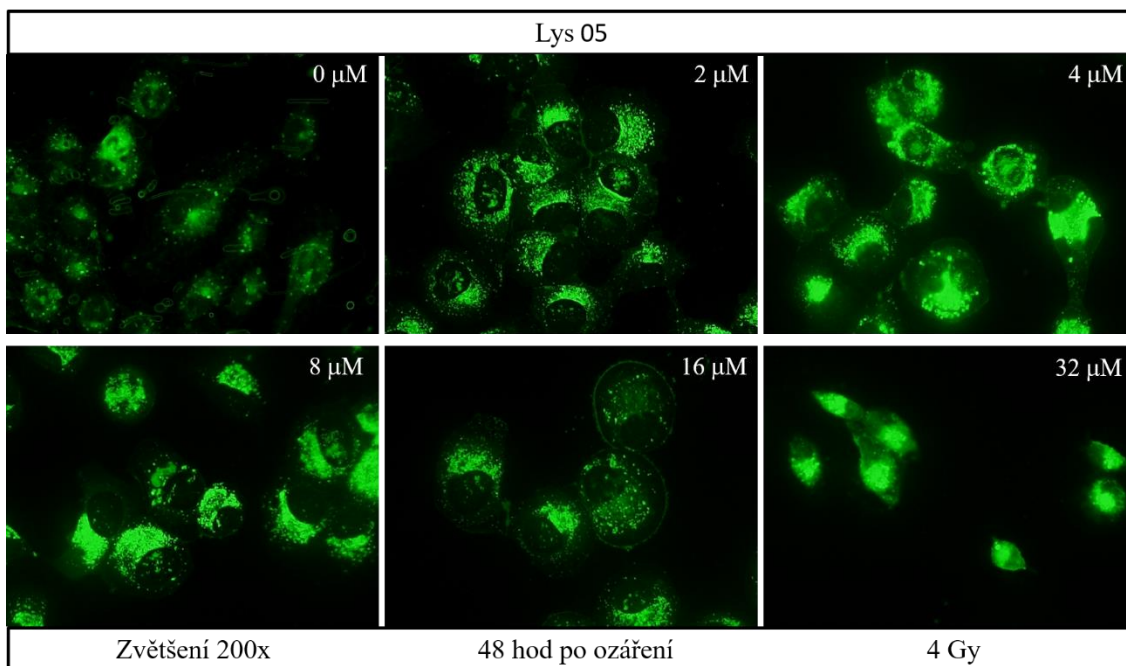
Obr. 14 Buněčná linie H1299 s inhibítorem autofagie Lys05 bez ozáření

Měřítko odpovídá 100 μm .

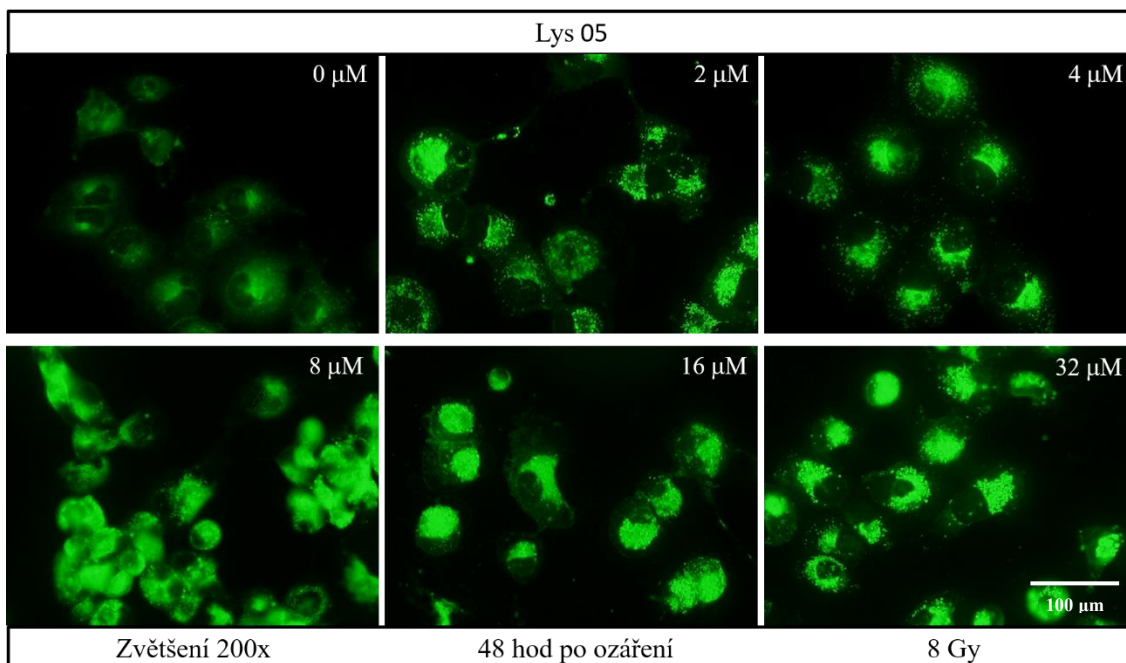


Obr. 15 Buněčná linie H1299 s inhibítorem autofagie Lys05 při ozáření dávkou 2 Gy

Měřítko odpovídá 100 μm .



Obr. 16 Buněčná linie H1299 s inhibitorem autofagie Lys05 při ozáření dávkou 4 Gy
Měřítko odpovídá 100 μm .



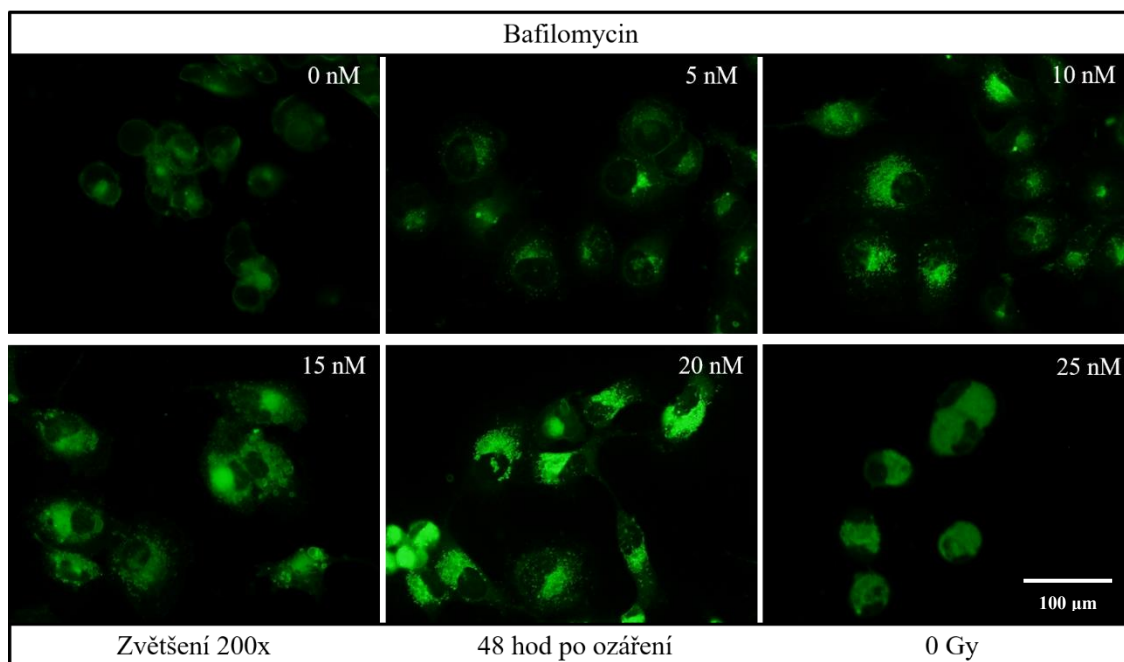
Obr. 17 Buněčná linie H1299 s inhibitorem autofagie Lys05 při ozáření dávkou 8 Gy
Měřítko odpovídá 100 μm

5.1.2 Bafilomycin A1

Ve druhém experimentu jsme porovnávali skupiny buněk ošetřené inhibitorem Baf v koncentracích 5-25 nM a ozářené dávkami 2-8 Gy s neošetřenými a neozářenými kontrolami.

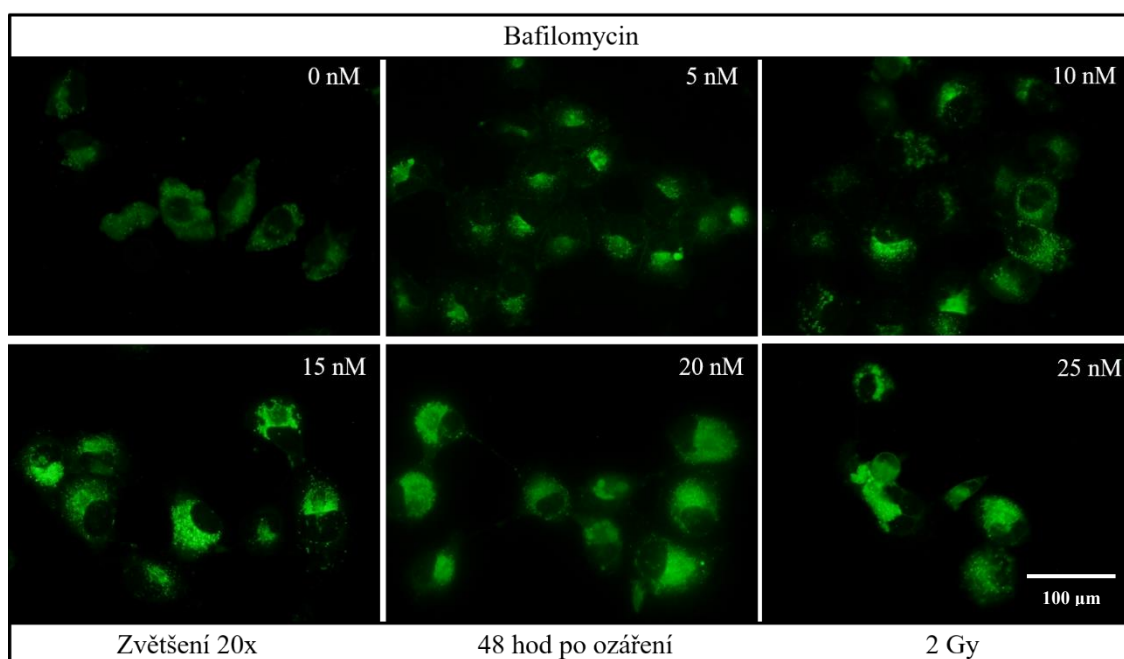
Na obr. 18-21 jsou pomocí fluorescenčního mikroskopu se zvětšením 200x zobrazeny buňky H1299 obarvené fluorescenčním barvivem LysoSensor Green. Podobně jako v prvním případě byly buňky na obr. 18-21 ozářeny vzestupně dávkami 0-8 Gy a pozorovány 48 hod po ozáření.

Z obr. 18-21 vyplývá, že podobně jako v předchozím experimentu, dochází s rostoucí koncentrací ke zvýšení intenzity fluorescence. Se zvyšující se dávkou záření dochází také k nárůstu intenzity fluorescence, ale ne tak velkému jako v předešlém experimentu. Výsledek experimentu 2 (Baf) koreluje s výsledkem experimentu 1 (Lys05).



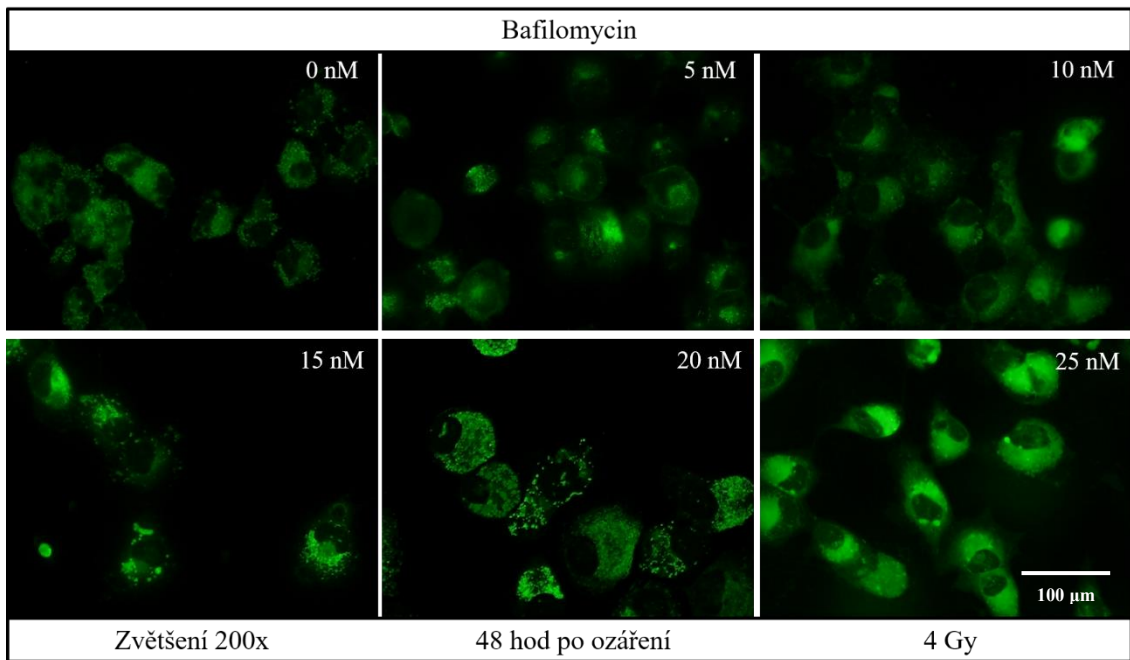
Obr. 18 Buněčná linie H1299 s inhibitorem autofagie Baf bez ozáření

Měřítko odpovídá 100 μm .

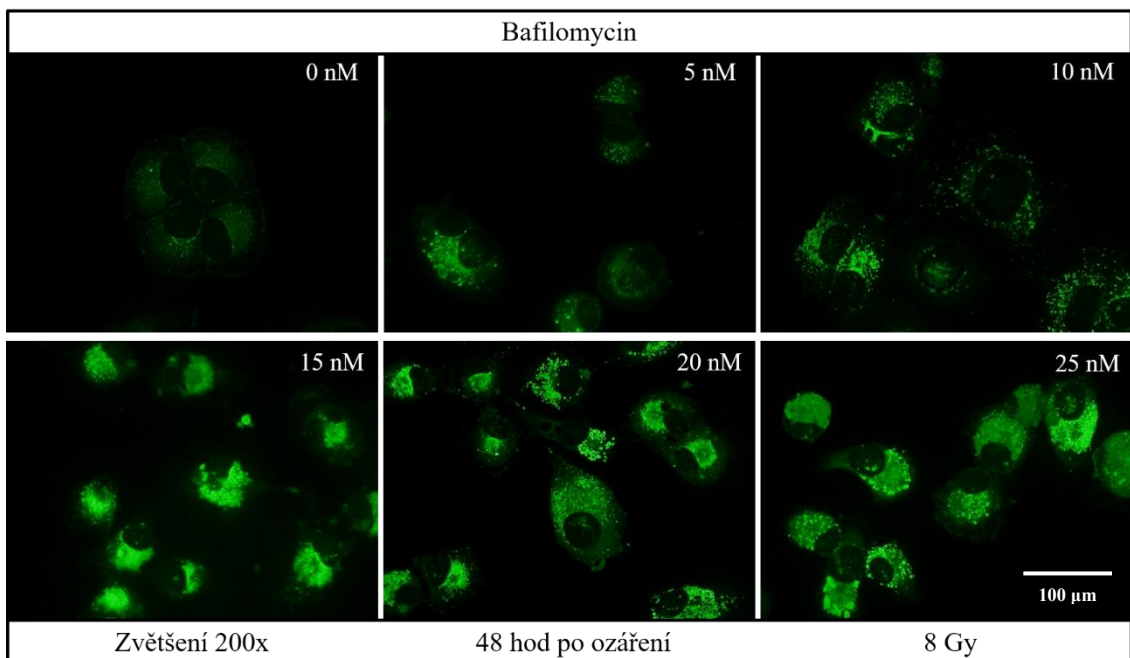


Obr. 19 Buněčná linie H1299 s inhibitorem autofagie Baf při ozáření dávkou 2 Gy

Měřítko odpovídá 100 μm .

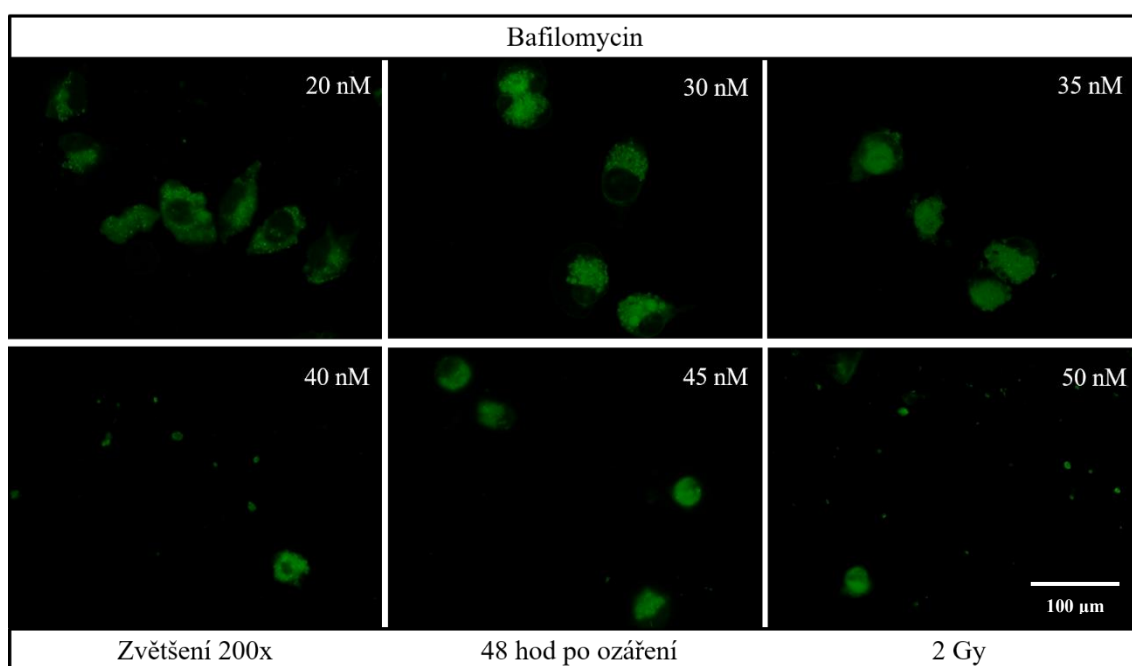


Obr. 20 Buněčná linie H1299 s inhibitorem autofagie Baf při ozáření dávkou 4 Gy
Měřítko odpovídá 100 µm.



Obr. 21 Buněčná linie H1299 s inhibitorem autofagie Baf při ozáření dávkou 8 Gy
Měřítko odpovídá 100 µm.

Na základě studií (86, 87), ve kterých autoři používali inhibitor autofagie Baf ve vyšších koncentracích, jsme také testovali koncentrace 30, 35, 40, 45 a 50 nM. Vyšší koncentrace tohoto inhibitoru byly pro buněčnou linii H1299 ve většině případů cytotoxické. Jak můžeme vidět na obr. 22, s vyššími koncentracemi jsou buňky menší, mají pomalejší růst, nemnoží se, tudíž v zorném poli mikroskopu nalezneme daleko méně buněk. Se stoupajícími koncentracemi buňky praskají a jejich buněčný obsah se vylévá do okolí. Pro naše pokusy s buněčnou linií H1299 jsou tedy vyšší koncentrace Baf nevhodné.



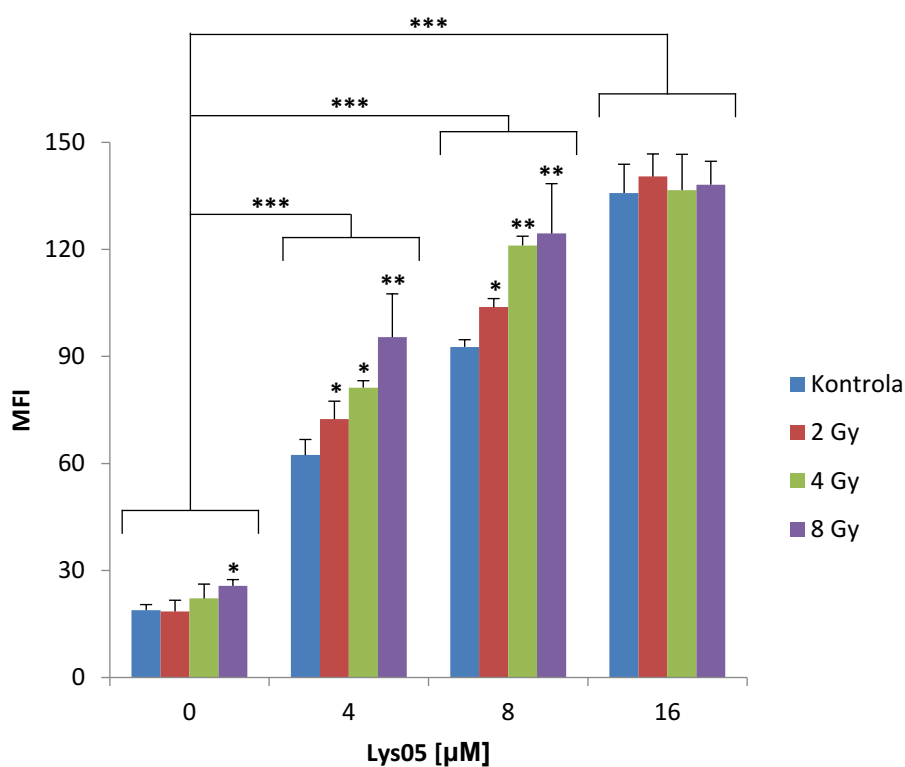
Obr. 22 Buněčná linie H1299 s inhibitorem autofagie Baf při ozáření dávkou 2 Gy – vyšší koncentrace

Měřítko odpovídá 100 μm.

5.2 Průtoková cytometrie

5.2.1 Lys05

Pomocí průtokové cytometrie jsme kvantifikovali intenzity fluorescence v buněčné linii H1299. Použili jsme podobný model jako v metodě fluorescenční mikroskopie, přičemž jsme si zvolili reprezentativní koncentrace inhibitoru 4–16 μM a dávky záření 2-8 Gy. Podobně jako u fluorescenční mikroskopie jsme buňky analyzovali 48 hod po ozáření.

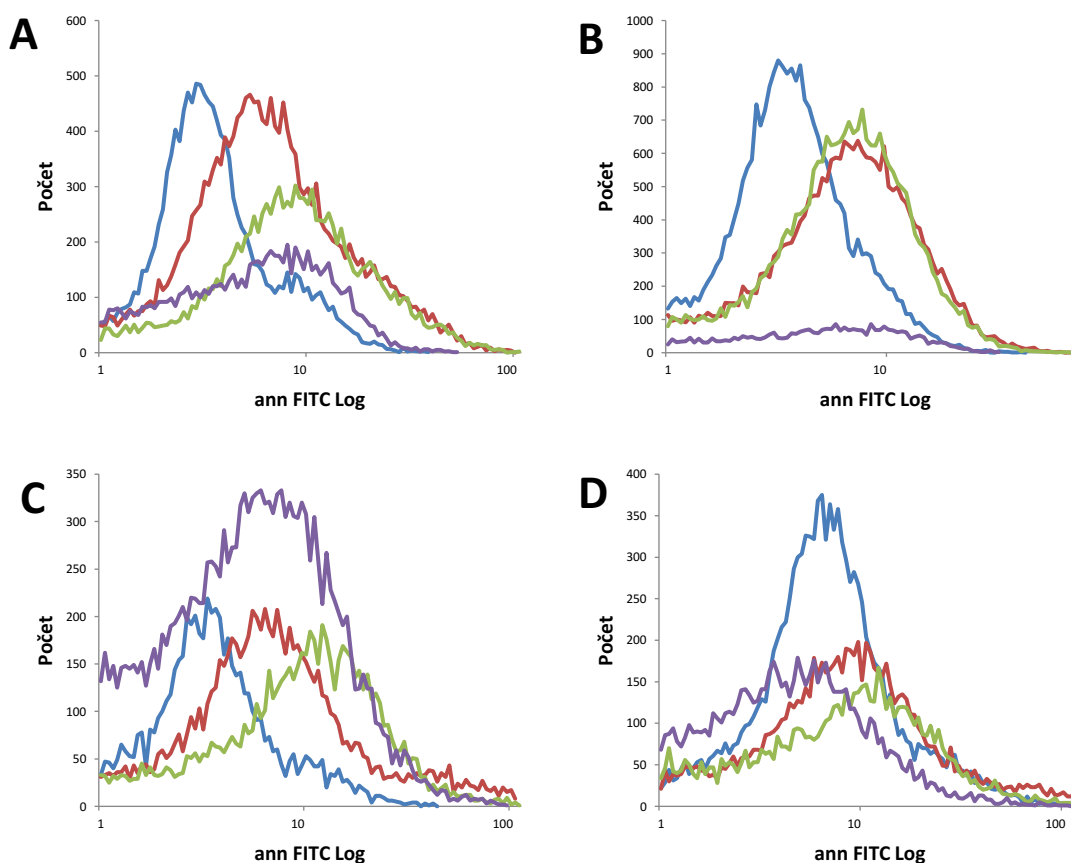


Obr. 23 Hodnoty intenzity fluorescence buněčné linie H1299 s inhibitorem autofagie Lys05

Graf vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na koncentraci inhibitoru Lys05. MFI – medián intenzity fluorescence; dávky záření: 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy a 8 Gy; koncentrace Lys05: 0 μM (kontrola), 4 μM , 8 μM , 16 μM ; Signifikantní změna v porovnání s kontrolou: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$.

Z výsledků analýzy (obr. 23) vyplývá, že se zvyšující se koncentrací Lys05 dochází k velmi významnému nárůstu intenzity fluorescence. Pozorovaný byl také signifikantní nárůst intenzity fluorescence v závislosti na zvyšující se dávce záření, který ale nebyl tak markantní. Tato analýza nám potvrdila předpoklady získané metodou fluorescenční mikroskopie.

Obr. 24 vyobrazuje histogramy závislostí intenzity fluorescence na počtu buněk v jednom vybraném měření. Na tomto grafu je vidět posun intenzit fluorescence k vyšším hodnotám v závislosti na zvyšující se koncentraci inhibitoru Lys05. Průtoková cytometrie je zatížena přesným rozdělením buněk na jednotlivé elementy, a jelikož jsou buňky H1299 adherentním typem buněk, ne ve všech případech se povedlo buňky dostatečně oddělit, což pak způsobilo výkyvy v počtu buněk ve sledovaném kvadrantu.



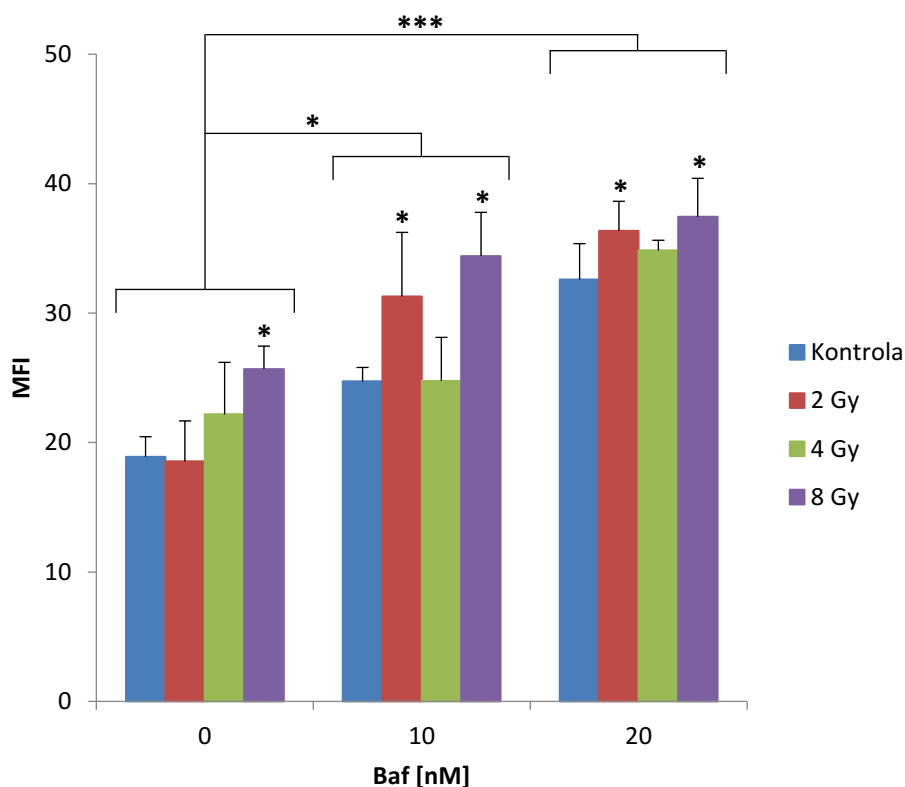
Obr. 24 Histogramy – inhibitor autofagie Lys05

Histogramy ukazují závislost intenzity fluorescence na počtu buněk. Osa X – intenzita fluorescence (logaritmická stupnice), osa Y – počet buněk; FITC – fluorescein izothiokyanát (emituje při 530 nm); Dávky záření: **(A)** 0 Gy (kontrola), **(B)** 2 Gy, **(C)** 4 Gy, **(D)** 8 Gy; koncentrace inhibitoru Lys05: modrá barva – 0 μM , červená barva – 4 μM , zelená barva – 8 μM , fialová barva – 16 μM .

5.2.2 Bafilomycin A1

Průtokovou cytometrii jsme použili i pro kvantifikaci změn intenzity fluorescence u linie buněk H1299 ošetřených inhibitorem Bafilomycin A1. V této metodě jsme jako vhodné zvolili koncentrace inhibitoru 10 nM a 20 nM, a dávky záření, podobně jako v předchozí analýze 2-8 Gy. Buňky jsme analyzovali 48 hod po ozáření.

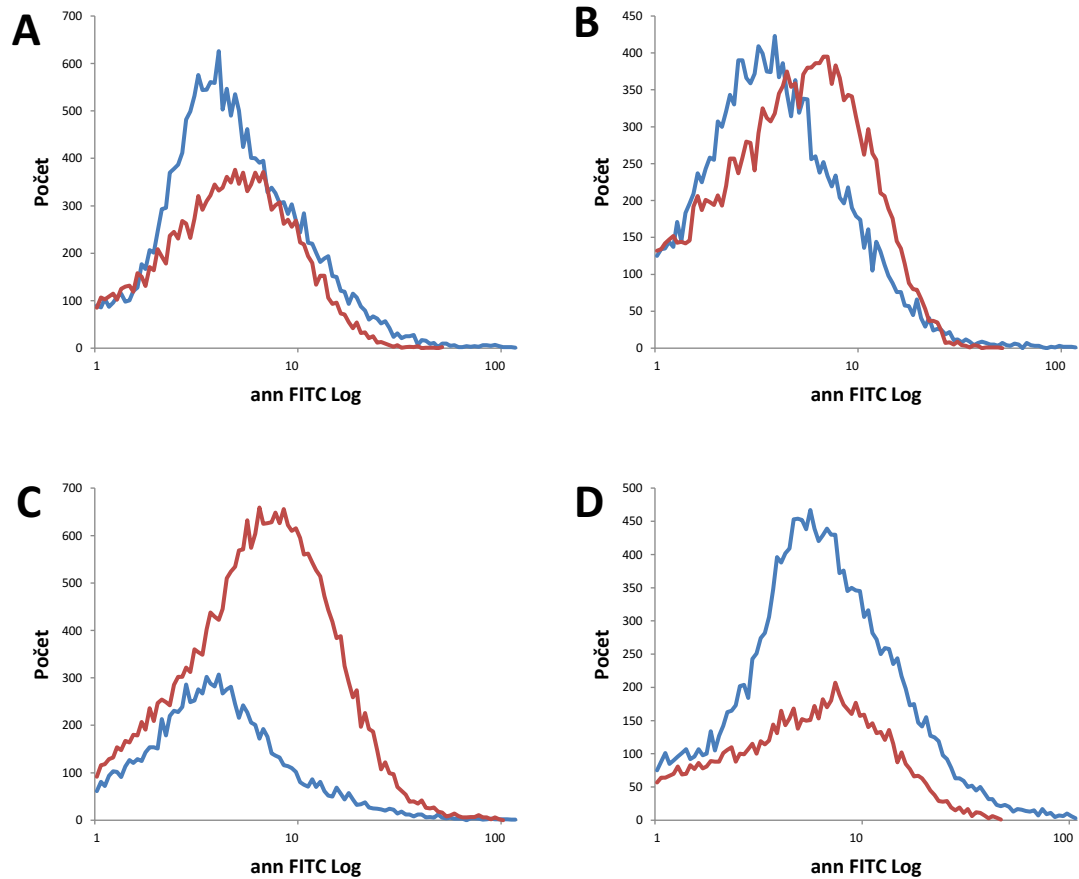
Na obr. 25 můžeme vidět, podobně jako u inhibitoru Lys05, závislost intenzity fluorescence na zvyšující se koncentraci inhibitoru a dávce záření. Tato závislost není však tak markantní jako v případě Lys05.



Obr. 25 Hodnoty intenzity fluorescence buněčné linie H1299 s inhibitorem autofagie Baf

Graf vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na koncentraci inhibitoru Baf. MFI – medián intenzity fluorescence; dávky záření: 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy a 8 Gy; koncentrace Baf: 0 nM (kontrola), 10 nM, a 20 nM; Signifikantní změna v porovnání s kontrolou: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$.

Obr. 26 vyobrazuje histogramy závislosti intenzity fluorescence na počtu buněk v jednom vybraném měření. Na tomto grafu je vidět posun intenzit fluorescence k vyšším hodnotám v závislosti na zvyšující se koncentraci inhibitoru Baf.



Obr. 26 Histogramy – inhibitor autofagie Baf

Histogramy ukazují závislost intenzity fluorescence na počtu buněk. Osa X – intenzita fluorescence (logaritmická stupnice), osa Y – počet buněk; FITC – fluorescein izothiokyanát (emituje při 530 nm); Dávky záření: **(A)** 0 Gy (kontrola), **(B)** 2 Gy, **(C)** 4 Gy, **(D)** 8 Gy; koncentrace inhibitoru Baf: modrá barva – 10 nM, červená barva – 20 nM.

6 DISKUZE

Nemalobuněčný bronchogenní karcinom plic se řadí mezi nejčastější plicní nádory. Je charakteristický pro svůj pomalý růst a pro svou malou citlivost k chemoterapii i radioterapii. Odhaduje se, že pouhých 10 % nemocných trpících tímto typem nádoru má naději na pětileté přežití. NSCLC byl až do roku 1980 vzhledem ke své biologické povaze považován za léčitelný pouze v případě, že byla možná chirurgická operace. Nové výzkumy však prokazují, že i pokročilé formy NSCLC reagují na chemoterapii či radioterapii. V současnosti se léčba pacientů zaměřuje na prodloužení délky života, zvýšení jeho kvality a eliminaci nežádoucích příznaků doprovázející nádorové onemocnění (88).

Tato práce vychází z předpokladu, že autofagie je cytoprotektivní mechanismus, jenž zajišťuje přežití v nepříznivých podmínkách prostřednictvím lyzosomální recyklace intracelulárních živin, která je navržena tak, aby umožnila poskytnout čas pro vývoj adaptivních změn v genové expresi a metabolické aktivitě. Může tak odstraněním organel podpořit rezistenci vůči chemoterapii či radiačně indukované apoptóze (89).

Inhibice cytoprotektivní autofagie se jeví jako logický postup k sensibilizaci nádorových buněk a k zvýšení účinnosti léčby. K inhibici autofagie jsme použili dva inhibitory – Lys05 a Bafilomycin A1. Mechanismem účinku obou inhibitorů je inhibice fúze autofagosomu s lyzosomem. Jak Lys05, tak i Baf se hromadí v lyzosomech a neutralizují jejich obsah, což vede k inhibici fúze.

Po ozáření dochází v buňkách ke vzniku metabolického stresu, přičemž jsou spuštěny cytoprotektivní mechanismy buněk a dochází k aktivaci autofagie. Přidáním Lys05 či Baf k ozařovaným buňkám dochází k inhibici autofagie a tedy kumulaci autofagosomů a lyzosomů v cytoplazmě buňky.

K vizualizaci lyzosomů jsme použili zelené fluorescenční barvivo LysoSensor Green DND-189. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme studovali charakteristiku nádorových buněk, přítomnost a množství nahromaděných lyzosomů po přidání inhibitorů autofagie a také jsme odhadovali míru intenzity fluorescence. Intenzitu fluorescence jsme následně kvantifikovali pomocí průtokové cytometrie.

Výsledky získané pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie ukazují, že zejména se zvyšujícími se koncentracemi inhibitorů Lys05 a Baf dochází k velmi významnému nárůstu intenzity fluorescence. Signifikantní nárůst intenzity fluorescence byl pozorován také se zvyšující se dávkou záření.

Výsledky potvrzující nárůst intenzity fluorescence jsou však překvapující. Jelikož je fluorescenční barvivo LysoSensor Green používáno k měření pH kyselých organel, jako jsou právě lyzosomy, předpokládá se, že se barvivo stává více fluoreskujícím právě v kyselém prostředí. Inhibitory autofagie, se kterými pracujeme, by ale měly vést k neutralizaci pH lyzosomů, a tudíž ke snížení intenzity fluorescence. Snižování intenzity fluorescence za použití inhibitorů autofagie z rodiny chlorochinů (CQ) a Baf je popsáno v mnoha studiích (viz níže).

Zhou *et al.* ve své studii pracoval s buněčnou kulturou MEF ošetřenou EBSS, PP242 (1 μ M) nebo Torin1 (1 μ M) s přidavkem Baf (50nM) nebo CQ (50 μ M). Jejich výsledky ukázaly, že přidavek inhibitorů Baf nebo CQ snižuje intenzitu fluorescence lyzosomů obarvených pomocí LysoSensoru (90).

Zhang *et al.* prováděl výzkum *in vivo* na myších (CD38^{-/-}) s předpokladem, že delece genu CD38 vede k vadnému autofagickému procesu v myocytech v koronárních artériích (CAM). Pro pozorování lyzosomální alkalizace byly CAM inkubovány CQ (100 μ M), kdy autoři předpokládali, že bude alkalizovat lyzosom, a tím se sníží intenzita fluorescence. Buňky byly barvené fluorescenčním barvivem LysoSensorem Green DND-189 (1 μ M) a následně analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie. CD38^{-/-} CAM vykazovaly podobnou intenzitu zelené fluorescence jako pro CD38^{+/+} CAM. Z toho plyne, že nedostatek CD38 nezhoršuje lyzosomální okyselení. Naproti tomu CQ snižoval intenzitu fluorescence (91).

Další případ snížení fluorescence CQ ukazuje studie Li *et al.*, kde buněčná linie BT549 léčená 50 μ M CQ a obarvená LysoSensorem Green DND-189, vykazovala sníženou intenzitu fluorescence (92).

V naší práci jsme ovšem pozorovali opačný efekt, a to zvyšování intenzity fluorescence. Tento jev byl pozorován i v aktuální studii z roku 2017, kde Lu *et al.* charakterizoval buněčný dopad různých lyzosomotropních sloučenin, včetně chlorochinonu (CQ). Bylo sledováno zvyšování pH lyzosomů u těchto sloučenin

a předpokládalo se, že jsou mechanismem pro lyzozomální dysfunkci. Při experimentu použili zelenou fluorescenční barvu LysoSensor. Buněčná linie ARPE-19 byla po dobu 4 hod a 24 hod vystavena výše uvedeným sloučeninám. Již po 4 hod CQ značně zvyšoval intenzitu fluorescence. Zvýšená fluorescence byla však nejlépe viditelná po 24 hod, a to v rozmezí od 2,6 až do 9,3násobku ve srovnání s kontrolami pro všechny testované sloučeniny. Autoři zvýšenou intenzitu fluorescence pravděpodobně přičítají zvýšenému počtu lyzozomů (93).

Podobné výsledky zaznamenali i Chikte *et al.* ve své studii, ve které pracovali se dvěma buněčnými liniemi Jurkat T-lymfocyty a K562 (erythromyeloidní leukemie). Buňky byly ošetřeny CQ v koncentracích 25, 50 a 75 μM a obarveny fluorescenčním barvivem LysoTracker Green. Byla měřena intenzita fluorescence pomocí průtokového cytometru a výsledky ověřeny fluorescenční mikroskopií. I zde byl zaznamenán významný nárůst fluorescence oproti kontrole (94).

Domníváme se, podobně jako autoři z předchozích studií, že zvýšení intenzity fluorescence bude pravděpodobně způsobené hromaděním lyzozomů v cytoplazmě buněk. Předpokládáme, že v primární fázi po pre-inkubaci inhibitory autofagie a následném ozáření dochází k aktivaci autofagie a její pozdější inhibice vede k nahromadění obrovského množství lyzozomů a k výraznému zvýšení intenzity fluorescence. Z výsledků fluorescenční mikroskopie i průtokové cytometrie je patrné, že se stoupajícími koncentracemi jednotlivých inhibitorů a se zvyšujícími se dávkami záření roste intenzita fluorescence v buňkách.

Výzkumný tým na Katedře radiobiologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, se látkou Lys05 zabývá již dlouhodobě. Tato studie je pouze dílčím článkem a doplňuje tak celou řadu metodologických přístupů jako xCelligence, TEM, imunodetekce či fosfoproteomika.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo zjistit, zda použití inhibitorů autofagie v kombinaci s IZ vede k radiosensibilizaci buněčné linie H1299. Díky spolupráci se zahraničním pracovištěm pod vedením Dr. McAfee, jsme měli jedinečnou možnost pracovat s novým inhibitorem autofagie Lys05. Z výsledků získaných z fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie můžeme usuzovat, že pre-inkubace buněk inhibitory autofagie těsně před ozáření vede k zvýšení počtu lyzosomů v buňce a také k celkovým morfologickým změnám buněk. Domníváme se, že toto zmnožení lyzosomů je pravděpodobně způsobeno schopností inhibitorů inhibovat autofagii v pozdní fázi – fúze autofagosomu a lyzosomu. Ze zjištěného můžeme vyvodit závěr, že inhibicí autofagie nádorových buněk H1299 lze přispět k jejich radiosensibilizaci. Na základě cílů stanovených na začátku diplomové práce můžeme dále vyvodit následující závěry:

- povedlo se nám optimalizovat metodu pro vizualizaci lyzosomů pomocí fluorescenční mikroskopie za použití zeleného fluorescenčního barviva LysoSensor Green DND-189 a také metodu kvantifikace změn intenzity fluorescence pomocí průtokové cytometrie
- zjistili jsme, že pre-inkubací buněk s inhibitory autofagie dochází k morfologickým změnám, akumulaci lyzosomů a kvantitativnímu zvýšení intenzity fluorescence
- fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie jsou sice moderními metodami pro studium buněčné biologie, ovšem v oblasti radiosensibilizace nádorových buněk pomocí modulace autofagie, je vhodné tyto metody korelovat a doplnit dalšími doplňkovými metodami jako jsou elektronová mikroskopie, imunodetekční techniky, studium genomu či proteomu a další
- Lys05 je perspektivní látkou na poli inhibice autofagického procesu, který může najít uplatnění při radiosenzibilizaci nádorových buněk.

Cytoprotektivní autofagie je považována za jeden z mechanismů vedoucích ke vzniku rezistence v rozvinutých nádorech. Inhibice tohoto mechanismu se jeví jako potenciální cíl pro sensibilizaci buněk. V této diplomové práci jsme studiem inhibitorů autofagie částečně odpověděli na některé otázky spojené se sensibilizací buněk. Výsledky diplomové práce sice nejsou jednoznačné, musíme také brát v úvahu fakt, že u různých typů nádorových buněk může být míra aktivity autofagie odlišná. Další studium je proto v tomto ohledu nezbytné.

8 SEZNAM ZKRATEK

Ambra1	Activating molecule in Beclin-1 regulated autophagy
AMP	Adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná protein kinasa
Atg	Geny související s autofagií (Autophagy-related genes)
ATP	Adenosintrifosfát
Baf	Bafilomycin A1
Barkor	Beclin 1-associated autophagy-related key regulator
Bcl-2	Genová rodina Bcl-2 genů (B-cell lymphoma 2)
Beclin-1	Coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein
CAM	Myocyty v koronárních artériích
CQ	Chlorochin
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DEPTOR	Domain-containing mTOR-interacting protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DRAM	DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1
FBS	Fetální bovinní sérum
FIP200	FAK-family interacting protein of 200 kDa
HCQ	Hydroxychlorochin
HIF	Hypoxií indukovaný faktor
IZ	Ionizující záření
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
mLST8	Target of rapamycin complex subunit LST8
mSIN1	Mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
NK buňky	Natural killer cell
NSCLC	Nemalobuněčný karcinom plic (Non Small Cell Lung Cancer)
PAS	Preautofagosom
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate-Buffered Saline)

PCD	Programovaná buněčná smrt (Programmed cell death)
PE	Fosfatidiletanolamin
PI3K	Fosfoinositol-3-kinasa
(PI-(3)-P)	Fosfatidylinositol-3-fosfát
PNC	Penicilin
PRAS40	Proline-rich AKT1 substrate 1
PROTOR	Proline-rich protein 5
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonukleová kyselina
ROCK1	Rho associated, coiled-coil containing protein kinase 1
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
Rubicon	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein
SCLC	Malobuněčný karcinom plic (Small Cell Lung Cancer)
TRP	Trypsin
ULK1	Serin/threonin proteinkinasa ULK1
UVRAG	Ultraviolet irradiation resistant-associated gene protein
Vps34	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. KOLEK, Vítězslav, Viktor KAŠÁK a Martina VAŠÁKOVÁ. *Pneumologie*. Praha: Maxdorf, c2011. Jessenius. ISBN 978-80-7345-255-1.
2. KLEIN, Jiří. *Chirurgie karcinomu plic*. Praha: Grada Publising, 2006. ISBN 80-247-1384-5.
3. ÚZIS. Novotvary 2015. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2015>
4. DUŠEK, Ladislav, Jan MUŽÍK, Miroslav KUBÁSEK, Jana KOPTÍKOVÁ, Jan ŽALOUDEK a Rostislav VYZULA. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita. 2005 [cit. 2018-01-09]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>. ISSN 1802-8861
5. SKŘIČKOVÁ, Jana a Vítězslav KOLEK. *Základy moderní pneumoonkologie*. Praha: Maxdorf, c2012. Jessenius. ISBN 978-80-7345-298-8.
6. KOLEK, Vítězslav. *Doporučené postupy v pneumologii*. Praha: Maxdorf, 2013. ISBN 978-80-7345-359-6.
7. SKŘIČKOVÁ, Jana, Lenka BABIČKOVÁ, Marcela TOMÍŠKOVÁ a Bohdan KADLEC. Biologická léčba nemalobuněčného karcinomu plic. *Interní medicína pro praxi*. 2011, **13**(7), 292–295. ISSN 1803-5256.
8. MIZUSHIMA, Noboru a Masaaki KOMATSU. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* [online]. 2011, **147**(4), 728–741. ISSN 0092-8674. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cell.2011.10.026](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026)
9. HALE, Amber N., Dan J. LEDBETTER, Thomas R. GAWRILUK a III EDMUND B. RUCKER. Autophagy. *Autophagy* [online]. 2013, **9**(7), 951–972. ISSN 1554-8627. Dostupné z: [doi:10.4161/auto.24273](https://doi.org/10.4161/auto.24273)
10. HE, Congcong a Daniel J. KLIONSKY. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual review of genetics* [online]. 2009, **43**, 67–93. ISSN 0066-4197. Dostupné z: [doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910](https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910)

11. ONDREJ, Martin, Lucie CECHAKOVA, Kamila DURISOVA, Jaroslav PEJCHAL a Ales TICHY. To live or let die: Unclear task of autophagy in the radiosensitization battle. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* [online]. 2016, **119**(2), 265–275. ISSN 1879-0887. Dostupné z: doi:10.1016/j.radonc.2016.02.028
12. LOZY, Fred a Vassiliki KARANTZA. Autophagy and cancer cell metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2012, **23**(4), Cancer Cell Metabolism & Notch Signaling, 395–401. ISSN 1084-9521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.005
13. BURSCH, W. The autophagosomal–lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2001, **8**(6), 569–581. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4400852
14. GLICK, Danielle, Sandra BARTH a Kay F. MACLEOD. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology* [online]. 2010, **221**(1), 3–12. ISSN 1096-9896. Dostupné z: doi:10.1002/path.2697
15. LI, Wen-wen, Jian LI a Jin-ku BAO. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2012, **69**(7), 1125–1136. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-011-0865-5
16. ORENSTEIN, Samantha J. a Ana Maria CUERVO. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2010, **21**(7), The Molecular Machinery of Autophagy and its Role in Physiology and Disease and MicroRNAs in Animal Development, 719–726. ISSN 1084-9521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2010.02.005
17. BEJARANO, Eloy a Ana Maria CUERVO. Chaperone-Mediated Autophagy. *Proceedings of the American Thoracic Society* [online]. 2010, **7**(1), 29–39. ISSN 1546-3222. Dostupné z: doi:10.1513/pats.200909-102JS
18. PYO, Jong-Ok, Jihoon NAH a Yong-Keun JUNG. Molecules and their functions in autophagy. *Experimental & Molecular Medicine* [online]. 2012, **44**(2), 73–80. ISSN 1226-3613. Dostupné z: doi:10.3858/emm.2012.44.2.029

19. MIZUSHIMA, Noboru. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2010, **22**(2), 132–139. ISSN 1879-0410. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2009.12.004
20. WILSON, Amy. Autophagy. *Nexcelom Bioscience* [online]. 23. srpen 2012 [cit. 2017-11-07]. Dostupné z: <http://www.nexcelom.com/Nexcelom-Blog/autophagy/>
21. YANG, Zhifen a Daniel J. KLIONSKY. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* [online]. 2010, **22**(2), 124–131. ISSN 0955-0674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014
22. MIZUSHIMA, Noboru. Autophagy: process and function. *Genes & Development* [online]. 2007, **21**(22), 2861–2873. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1599207
23. LAPLANTE, Mathieu a David M. SABATINI. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* [online]. 2012, **149**(2), 274–293. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2012.03.017
24. SOLIMAN, Ghada A. The Role of Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) Complexes Signaling in the Immune Responses. *Nutrients* [online]. 2013, **5**(6), 2231–2257. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu5062231
25. SPARKS, CA a DA GUERTIN. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene* [online]. 2010, **29**(26), 3733–3744. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2010.139
26. ZONCU, Roberto, Alejo EFEYAN a David M. SABATINI. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2011, **12**(1), 21–35. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3025
27. GUERTIN, David A. a David M. SABATINI. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* [online]. 2007, **12**(1), 9–22. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2007.05.008
28. WANG, Zhuo, Wei JIN, Hongchuan JIN a Xian WANG. mTOR in Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma: Function and Treatment. *BioMed Research International* [online]. 2014. vol **2014**. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/735672

29. SARBASSOV, Dos D, Siraj M ALI a David M SABATINI. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2005, **17**(6), Cell division, growth and death / Cell differentiation, 596–603. ISSN 0955-0674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009
30. CODOGNO, P. a A. J. MEIJER. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2005, **12 Suppl 2**, 1509–1518. ISSN 1350-9047. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4401751
31. ROSENFELDT, Mathias T. a Kevin M. RYAN. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* [online]. 2011, **32**(7), 955–963. ISSN 0143-3334. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/bgr031
32. MERCER, Carol A., Alagammai KALIAPPAN a Patrick B. DENNIS. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*. 2009, **5**(5), 649–662. ISSN 1554-8635.
33. HE, Congcong a Daniel J. KLIONSKY. Analyzing autophagy in zebrafish. *Autophagy* [online]. 2010, **6**(5), 642–644. ISSN 1554-8635. Dostupné z: doi:10.4161/auto.6.5.12092
34. MARIÑO, G. a C. LÓPEZ-OTÍN. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* [online]. 2004, **601**(12), 1439–1454. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-004-4012-4
35. ZHONG, Yun, Qing Jun WANG, Xianting LI, Ying YAN, Jonathan M. BACKER, Brian T. CHAIT, Nathaniel HEINTZ a Zhenyu YUE. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Nature cell biology* [online]. 2009, **11**(4), 468–476. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1854
36. GURKAR, Aditi U., Kiki CHU, Lakshmi RAJ, Richard BOULEY, Seung-Hwan LEE, Young-Bum KIM, Sandra E. DUNN, Anna MANDINOVA a Sam W. LEE. Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1 mediated autophagy during metabolic stress. *Nature communications* [online]. 2013, **4**, 2189. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms3189

37. ITAKURA, Eisuke, Chieko KISHI, Kinji INOUE a Noboru MIZUSHIMA. Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2008, **19**(12), 5360–5372. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.E08-01-0080
38. FUNDERBURK., Sarah F., Qing Jun WANG a Zhenyu YUE. Beclin 1-VPS34 complex – At the Crossroads of Autophagy and Beyond. *Trends in cell biology* [online]. 2010, **20**(6), 355–362. ISSN 0962-8924. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2010.03.002
39. FAN, Weiliang, Ashley NASSIRI a Qing ZHONG. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2011, **108**(19), 7769–7774. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1016472108
40. YANG, Zhifen a Daniel J. KLIONSKY. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Current topics in microbiology and immunology* [online]. 2009, **335**, 1–32. ISSN 0070-217X. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-00302-8_1
41. SOU, Yu-shin, Satoshi WAGURI, Jun-ichi IWATA, Takashi UENO, Tsutomu FUJIMURA, Taichi HARA, Naoki SAWADA, Akane YAMADA, Noboru MIZUSHIMA, Yasuo UCHIYAMA, Eiki KOMINAMI, Keiji TANAKA a Masaaki KOMATSU. The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2008, **19**(11), 4762–4775. ISSN 1059-1524, 1939-4586. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.E08-03-0309
42. MIZUSHIMA, Noboru, Akiko KUMA, Yoshinori KOBAYASHI, Akitsugu YAMAMOTO, Masami MATSUBAE, Toshifumi TAKAO, Tohru NATSUME, Yoshinori OHSUMI a Tamotsu YOSHIMORI. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science* [online]. 2003, **116**(9), 1679–1688. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.00381
43. OHSUMI, Yoshinori. Ubiquitin and proteasomes: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2001, **2**(3), 35056522. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/35056522

44. MEHRPOUR, Maryam, Audrey ESCLATINE, Isabelle BEAU a Patrice CODOGNO. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research* [online]. 2010, **20**(7), 748–762. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2010.82
45. DENTON, D, S NICOLSON a S KUMAR. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2012, **19**(1), 87–95. ISSN 1350-9047. Dostupné z: doi:10.1038/cdd.2011.146
46. WIRAWAN, Ellen, Tom Vanden BERGHE, Saskia LIPPENS, Patrizia AGOSTINIS a Peter VANDENABEELE. Autophagy: for better or for worse. *Cell Research* [online]. 2012, **22**(1), 43–61. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2011.152
47. SHEN, Han-Ming a Patrice CODOGNO. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*. 2011, **7**(5), 457–465. ISSN 1554-8635.
48. SHIMIZU, S. a Y. TSUJIMOTO. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2005, **12**(S2), 1528. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4401777
49. LIANG, X. H., S. JACKSON, M. SEAMAN, K. BROWN, B. KEMPKES, H. HIBSHOOSH a B. LEVINE. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* [online]. 1999, **402**(6762), 672–676. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/45257
50. QU, Xueping, Jie YU, Govind BHAGAT, Norihiko FURUYA, Hanina HIBSHOOSH, Andrea TROXEL, Jeffrey ROSEN, Eeva-Liisa ESKELINEN, Noboru MIZUSHIMA, Yoshinori OHSUMI, Giorgio CATTORETTI a Beth LEVINE. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *beclin 1* autophagy gene. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2003, **112**(12), 1809–1820. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI20039
51. JANJI, Bassam, Elodie VIRY, Joanna BAGINSKA, Kris Van MOER a Guy BERCHEM. Role of Autophagy in Cancer and Tumor Progression. In: *Autophagy - A Double-Edged Sword* [online]. Rijeka: InTech, 2013 [cit. 2018-02-03], s. CH.9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/autophagy-a-double-edged-sword-cell-survival-or-death-/role-of-autophagy-in-cancer-and-tumor-progression>

52. HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, **144**(5), 646–674. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
53. SOUNNI, Nor Eddine a Agnès NOEL. Targeting the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Clinical Chemistry* [online]. 2013, **59**(1), 85–93. ISSN 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2012.185363
54. KUMA, Akiko, Masahiko HATANO, Makoto MATSUI, Akitsugu YAMAMOTO, Haruaki NAKAYA, Tamotsu YOSHIMORI, Yoshinori OHSUMI, Takeshi TOKUHISA a Noboru MIZUSHIMA. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* [online]. 2004, **432**(7020), 1032–1036. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature03029
55. KATO, Kazuyoshi, Tsutomu OGURA, Atsuhiko KISHIMOTO, Yuji MINEGISHI, Nobuyuki NAKAJIMA, Masaru MIYAZAKI a Hiroyasu ESUMI. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene* [online]. 2002, **21**(39), 6082. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1205737
56. MAZURE, Nathalie M a Jacques POUYSSÉGUR. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2010, **22**(2), Cell regulation, 177–180. ISSN 0955-0674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2009.11.015
57. DAYAN, Frédéric, Danièle ROUX, M. Christiane BRAHIMI-HORN, Jacques POUYSSEGUR a Nathalie M. MAZURE. The Oxygen Sensor Factor-Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor-1 Controls Expression of Distinct Genes through the Bifunctional Transcriptional Character of Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Cancer Research* [online]. 2006, **66**(7), 3688–3698. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4564
58. LUM, Julian J., Daniel E. BAUER, Mei KONG, Marian H. HARRIS, Chi LI, Tullia LINDSTEN a Craig B. THOMPSON. Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell* [online]. 2005, **120**(2), 237–248. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2004.11.046
59. CHAMBERS, Ann F., Alan C. GROOM a Ian C. MACDONALD. *Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.*

Nat Rev Cancer 2: 563-572 [online]. 2002. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc865

60. SU, Zhenyi, Zuozhang YANG, Yongqing XU, Yongbin CHEN a Qiang YU. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer* [online]. 2015, **14**, 48. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-015-0321-5

61. KENIFIC, Candia, Andrew THORBURN a Jayanta DEBNATH. Autophagy and Metastasis: Another double-edged sword. *Current opinion in cell biology* [online]. 2010, **22**(2), 241–245. ISSN 0955-0674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2009.10.008

62. CHIARUGI, Paola a Elisa GIANNONI. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2008, **76**(11), Special Issue: Apoptosis World 2008, 1352–1364. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2008.07.023

63. GEWIRTZ, David A. Cytoprotective and nonprotective autophagy in cancer therapy. *Autophagy* [online]. 2013, **9**(9), 1263–1265. ISSN 1554-8627. Dostupné z: doi:10.4161/auto.25233

64. GEWIRTZ, David A. When cytoprotective autophagy isn't... and even when it is. *Autophagy* [online]. 2014, **10**(3), 391–392. ISSN 1554-8627. Dostupné z: doi:10.4161/auto.27719

65. APEL, Anja, Ingrid HERR, Heinz SCHWARZ, H. Peter RODEMANN a Andreas MAYER. Blocked Autophagy Sensitizes Resistant Carcinoma Cells to Radiation Therapy. *Cancer Research* [online]. 2008, **68**(5), 1485–1494. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0562

66. PASQUIER, Benoit. Autophagy inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2016, **73**(5), 985–1001. ISSN 420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-015-2104-y

67. LOMONACO, S.L., S. FINNISS, C. XIANG, A. DECARVALHO, F. UMANSKY, S.N. KALKANIS, T. MIKKELSEN a C. BRODIE. The induction of autophagy by γ -radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *International Journal of Cancer* [online]. 2009, **125**(3), 717–722. ISSN: 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.24402

68. ITO, H., S. DAIDO, T. KANZAWA, S. KONDO a Y. KONDO. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *International journal of oncology*. 2005, **26**(5), 1401–1410. ISSN 1791-2423.
69. CHEN, Y. S., H. X. SONG, Y. LU, X. LI, T. CHEN, Y. ZHANG, J. X. XUE, H. LIU, B. KAN, G. YANG a T. FU. Autophagy inhibition contributes to radiation sensitization of esophageal squamous carcinoma cells. *Diseases of the Esophagus* [online]. 2011, **24**(6), 437–443. ISSN 1120-8694. Dostupné z: doi:10.1111/j.1442-2050.2010.01156.x
70. MCAFEE, Quentin, Zihui ZHANG, Arabinda SAMANTA, Samuel M. LEVI, Xiao-Hong MA, Shengfu PIAO, John P. LYNCH, Takeshi UEHARA, Antonia R. SEPULVEDA, Lisa E. DAVIS, Jeffrey D. WINKLER a Ravi K. AMARAVADI. Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, **109**(21), 8253–8258. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1118193109
71. HE, Gang, Yan WANG, Xueli PANG a Bo ZHANG. Inhibition of autophagy induced by TSA sensitizes colon cancer cell to radiation. *Tumor Biology* [online]. 2014, **35**(2), 1003–1011. ISSN 1423-0380. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-013-1134-z
72. KANZAWA, T., I. M. GERMANO, T. KOMATA, H. ITO, Y. KONDO a S. KONDO. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2004, **11**(4), 448–457. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4401359
73. YUAN, Na, Lin SONG, Suping ZHANG, Weiwei LIN, Yan CAO, Fei XU, Yixuan FANG, Zhen WANG, Han ZHANG, Xin LI, Zhijian WANG, Jinyang CAI, Jian WANG, Yi ZHANG, Xinliang MAO, Wenli ZHAO, Shaoyan HU, Suning CHEN a Jianrong WANG. Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* [online]. 2015, **100**(3), 345–356. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2014.113324
74. VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury* [online]. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze. [cit. 2018-03-14] Dostupné

z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>

75. PECKA, Miroslav a Milan BLÁHA. *Praktická hematologie: Laboratorní metody*. Český Těšín: Infinity art, 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.

76. SOUKUP, Aleš. Fluorescenční mikroskopie. *Botanická mikrotechnika* [online]. 2004 [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>

77. LICHTMAN, Jeff W. a José-Angel CONCHELLO. Fluorescence microscopy. *Nature Methods* [online]. 2005, 2(12), 910–919. ISSN 1548-7105. Dostupné z: [doi:10.1038/nmeth817](https://doi.org/10.1038/nmeth817)

78. MÜHLPFORDT, Henry. *English: structure of a fluorescence microscope* [online]. [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters_2008-09-28.svg

79. ŠINKOROVÁ, Zuzana a Lenka ZÁRYBNICKÁ. UPLATNĚNÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE VE VOJENSKÉ MEDICÍNĚ A RADIOBIOLOGII. *VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY*. 2008, 77, 6. ISSN 0372-7025.

80. MARINOV, Iuri. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton 2008. ISBN 978-80-7387-143-7.

81. THERMOFISCHER. How a Flow Cytometer Works. *ThermoFisher SCIENTIFIC* [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>

82. BROWN, Michael a Carl WITTEWER. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*. 2000, 46(8), 1221–1229. ISSN 1530-8561.

83. STEPHANIE GLEN. T Test (Student's T-Test): Definition and Examples. *Statistics How To* [online]. [cit. 2018-05-04]. Dostupné z: <http://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/t-test/>

84. OMELOM, Sidney, John GEORGIU a Wouter HABRAKEN. A cautionary (spectral) tail: red-shifted fluorescence by DAPI-DAPI interactions. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2016, **44**(1), 46–49. ISSN 1470-8752. Dostupné z: doi:10.1042/BST20150231
85. CHAZOTTE, Brad. Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2011, **2011**(1), pdb.prot5556. ISSN 1559-6095.
86. ZOU, Zhengzhi, Zhongyu YUAN, Qionxia ZHANG, Zijie LONG, Jinna CHEN, Zhiping TANG, Yuliang ZHU, Shupeng CHEN, Jie XU, Min YAN, Jing WANG a Quentin LIU. Aurora kinase A inhibition-induced autophagy triggers drug resistance in breast cancer cells. *Autophagy* [online]. 2012, **8**(12), 1798–1810. ISSN 1554-8627. Dostupné z: doi:10.4161/auto.22110
87. SHIMIZU SATOSHI, TAKEHARA TETSUO, HIKITA HAYATO, KODAMA TAKAHIRO, TSUNEMATSU HINAKO, MIYAGI TAKUYA, HOSUI ATSUSHI, ISHIDA HISASHI, TATSUMI TOMOHIDE, KANTO TATSUYA, HIRAMATSU NAOKI, FUJITA NAONOBU, YOSHIMORI TAMOTSU a HAYASHI NORIO. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* [online]. 2011, **131**(3), 548–557. ISSN 0020-7136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.26374
88. SKŘIČKOVÁ, Jana, Ondřej VENCLÍČEK, Bohdan KADLEC, Marcela TOMÍŠKOVÁ, Lenka JAKUBÍKOVÁ a Jana ŠPELDOVÁ. Novinky v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic. *Remedia*. nedatováno, **2013**(Supplementum), 9–15. ISSN 2336-3541.
89. OGIER-DENIS, Eric a Patrice CODOGNO. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2003, **1603**(2), 113–128. ISSN 0006-3002.
90. ZHOU, Jing, Shi-Hao TAN, Valérie NICOLAS, Chantal BAUVY, Nai-Di YANG, Jianbin ZHANG, Yuan XUE, Patrice CODOGNO a Han-Ming SHEN. Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Research* [online]. 2013, **23**(4), 508–523. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2013.11

91. ZHANG, Yang, Ming XU, Min XIA, Xiang LI, Krishna M. BOINI, Mi WANG, Erich GULBINS, Paul H. RATZ a Pin-Lan LI. Defective autophagosome trafficking contributes to impaired autophagic flux in coronary arterial myocytes lacking CD38 gene. *Cardiovascular Research* [online]. 2014, **102**(1), 68–78. ISSN 0008-6363. Dostupné z: doi:10.1093/cvr/cvu011
92. LI, Yang, Qing ZHANG, Ruiyang TIAN, Qi WANG, Jean J. ZHAO, J. Dirk IGLEHART, Zhigang Charles WANG a Andrea L. RICHARDSON. Lysosomal transmembrane protein LAPTM4B promotes autophagy and tolerance to metabolic stress in cancer cells. *Cancer Research* [online]. 2011, **71**(24), 7481–7489. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0940
93. LU, Shuyan, Tae SUNG, Nianwei LIN, Robert T. ABRAHAM a Bart A. JESSEN. Lysosomal adaptation: How cells respond to lysosomotropic compounds. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(3). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0173771
94. CHIKTE, Shaheen, Neelam PANCHAL a Gary WARNES. Use of LysoTracker dyes: A flow cytometric study of autophagy. *Cytometry Part A* [online]. 2013, **85**(2), 169–178. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22312