

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**PROTINÁDOROVÁ AKTIVITA SEMISYNTETICKÝCH
DERIVÁTŮ PRENYLFLAVONOIDŮ V BUNĚČNÉ LINII
SW480**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martin Ambrož, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Kateřina Blahová

„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.“

Chtěla bych poděkovat doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za cenné rady a ochotu, a PharmDr. Martinu Ambrožovi, Ph.D., za pomoc s experimentální částí. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům katedry biochemických věd, kteří byli vždy ochotní mi pomoci.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Kateřina Blahová

Školitel: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martin Ambrož, Ph.D.

Název diplomové práce: Protinádorová aktivita semisyntetických derivátů prenylflavonoidů v buněčné linii SW480

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny mortality v rozvinutých zemích. V České republice je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním kolorektální karcinom. Vzhledem ke vzniku rezistence na klasická cytostatika probíhá hledání nových léčebných strategií. Prenylflavonoidy patří mezi přírodní látky vykazující protinádorový účinek, často jsou zkoumány xanthohumol a prenylované deriváty naringeninu. V této diplomové práci byl testován protinádorový účinek naringeninu a pěti jeho prenylovaných semisyntetických derivátů v buněčné linii SW480, odvozené z kolorektálního karcinomu. Buněčná viabilita byla měřena pomocí testu s neutrální červení po 72 hodinách inkubace. U látek s výraznou protinádorovou aktivitou byla stanovena hodnota IC_{50} , a pomocí průtokové cytometrie byl sledován vliv látek na buněčný cyklus. Výraznější antiproliferační účinek byl nalezen u čtyř látek (deriváty A, B, C a E), hodnoty IC_{50} těchto látek se pohybovaly v rozmezí 40,41 - 83,67 μ M. Nejvyšší antiproliferační účinek měl derivát C, který představoval směs izomerů látek A a B. Buněčný cyklus nebyl studovanými látkami ovlivněn.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kateřina Blahová

Supervisor: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Advisor: PharmDr. Martin Ambrož, Ph.D.

Title of diploma thesis: Anticancer activity of semisynthetic prenylflavonoids in SW480 cell line

Cancer belongs to the leading causes of mortality in developed countries. Colorectal carcinoma is the second most common cancer in the Czech Republic. Due to the development of resistance to classical chemotherapeutics, a search for new treatment strategies is ongoing. Prenylflavonoids belong to the natural compounds, which express anticancer effect, with xanthohumol and prenylated derivatives of naringenin belonging to the often-studied compounds. In this diploma thesis, anticancer properties of naringenin and its five semisynthetic prenylated derivatives were tested in the cell line SW480, which is derived from colorectal carcinoma. Cell viability was monitored by the neutral red uptake test after 72 h treatment. For compounds with marked anticancer activity, the value of IC_{50} was determined and the effect of those compounds on the cell cycle was determined by flow cytometry. Substantial antiproliferative effect was found in four compounds (derivatives A, B, C, and E), values of IC_{50} for these compounds were in the range of 40.41 - 83,67 μ M. The highest antiproliferative effect was found in derivative C, which was a mixture of isomers of compounds A and B. The cell cycle was not influenced by studied compounds.

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	10
2.1	Nádorová onemocnění	10
2.1.1	Vznik a charakteristické rysy nádorových buněk	11
2.2	Kolorektální karcinom	14
2.2.1	Rizikové faktory	15
2.2.2	Prevence	16
2.2.3	Symptomy	18
2.2.4	Diagnostika	19
2.2.5	Stádia onemocnění	20
2.2.6	Možnosti léčby	22
2.3	Nádorová linie SW480	25
2.4	Prenylflavonoidy	26
2.4.1	Struktura	27
2.4.2	Biologické účinky	29
2.4.3	Protinádorová aktivita	31
3	Cíl práce	33
4	Experimentální část	34
4.1	Biologický materiál a chemikálie	34
4.1.1	Testované látky	34
4.2	Pomůcky a přístroje	37
4.2.1	Pomůcky	37
4.2.2	Přístroje	37

4.3	Metody	38
4.3.1	Kultivační médium	38
4.3.2	Rozmrazování buněk.....	38
4.3.3	Pasáž buněk.....	38
4.3.4	Počítání buněk	39
4.3.5	Nasazování a ovlivňování buněk	40
4.3.6	Test cytotoxicity – NRU.....	41
4.3.7	Příprava vzorků pro sledování buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie.....	42
4.3.8	Statistická analýza	42
5	Výsledky	43
5.1	Stanovení IC ₅₀ doxorubicinu.....	43
5.2	Stanovení cytotoxicity látek.....	44
5.2.1	Derivát A	45
5.2.2	Derivát B	47
5.2.3	Derivát C.....	49
5.2.4	Derivát D	51
5.2.5	Derivát E.....	52
5.2.6	Derivát F – naringenin.....	54
5.2.7	Derivát G	55
5.2.8	Derivát H	56
5.3	Vliv na buněčný cyklus	57
5.3.1	DMSO.....	57
5.3.2	Derivát A	58

5.3.3	Derivát B.....	59
5.3.4	Derivát C.....	59
5.3.5	Derivát E.....	60
6	Diskuze.....	62
7	Závěr.....	65
8	Seznam zkratek.....	66
9	Použitá literatura	68

1 Úvod

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí, v ČR jsou na druhém místě. Kolorektální karcinom patří mezi nejrozšířenější nádorová onemocnění, a jeho incidence stoupá. Při léčbě kolorektálního karcinomu je nejčastější metodou léčby chirurgické odstranění nádoru, dále se využívá chemoterapie, radioterapie a cílená biologická léčba, postup léčby je určen podle stádia a lokalizace nádoru. Kvůli častým nežádoucím účinkům a možné rezistenci nádorových buněk k léčbě je stále snaha najít nové možnosti léčby.

Mezi látky vykazující cytotoxický účinek vůči nádorovým buňkám patří prenylované deriváty flavonoidů – prenylflavonoidy. Prenylflavonoidy jsou sekundární metabolity některých druhů rostlin, kromě protinádorového účinku působí i antioxidantně, antibakteriálně a protizánětlivě. Prenylací stoupá biologická aktivita těchto látek. Mezi nejčastěji zkoumané prenylflavonoidy patří xanthohumol a látky odvozené od flavanonu naringeninu, které se ve velkých koncentracích vyskytují v chmelu.

V této diplomové práci byl testován protinádorový účinek semisyntetických prenylovaných derivátů naringeninu v buněčné linii SW480, odvozené od kolorektálního karcinomu.

2 Teoretická část

2.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí. V roce 2017 byla podle údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) incidence nádorových onemocnění (kromě nemelanomových kožních novotvarů) 556,2 na 100 000 obyvatel, na nádorová onemocnění zemřelo v tomto roce 27 183 osob (256,7 na 100 000 obyvatel), což je 24,4 % všech úmrtí. Mezi nejčastější nádorová onemocnění patří zhoubné nádory tlustého střeva a konečníku, prostaty, prsu a nádory průdušek, průdušnice a plic. Pro některá častá nádorová onemocnění jsou zavedeny screeningové programy, v ČR je to rakovina tlustého střeva a konečníku, rakovina prsu a rakovina děložního čípku (ÚZIS 2020).

Incidence většiny nádorových onemocnění v ČR stoupá, obecně je incidence nádorů o něco vyšší u mužů než u žen. Mortalita však stagnuje nebo mírně klesá, protože je ovlivněna pokroky v léčbě a včasností záchytu nádoru. Záchyt nádoru ve dřívějším stádiu zvyšuje naději na úplné vyléčení a dlouhodobé přežití, včasná diagnostika nádorů v ČR je ovšem stále nedostatečná. S klesající mortalitou a rostoucí incidencí roste prevalence nádorů. V roce 2017 byla prevalence nádorových onemocnění v populaci 5 452 osob na 100 000 obyvatel, prevalence je mírně vyšší u žen (ÚZIS 2020).

2.1.1 Vznik a charakteristické rysy nádorových buněk

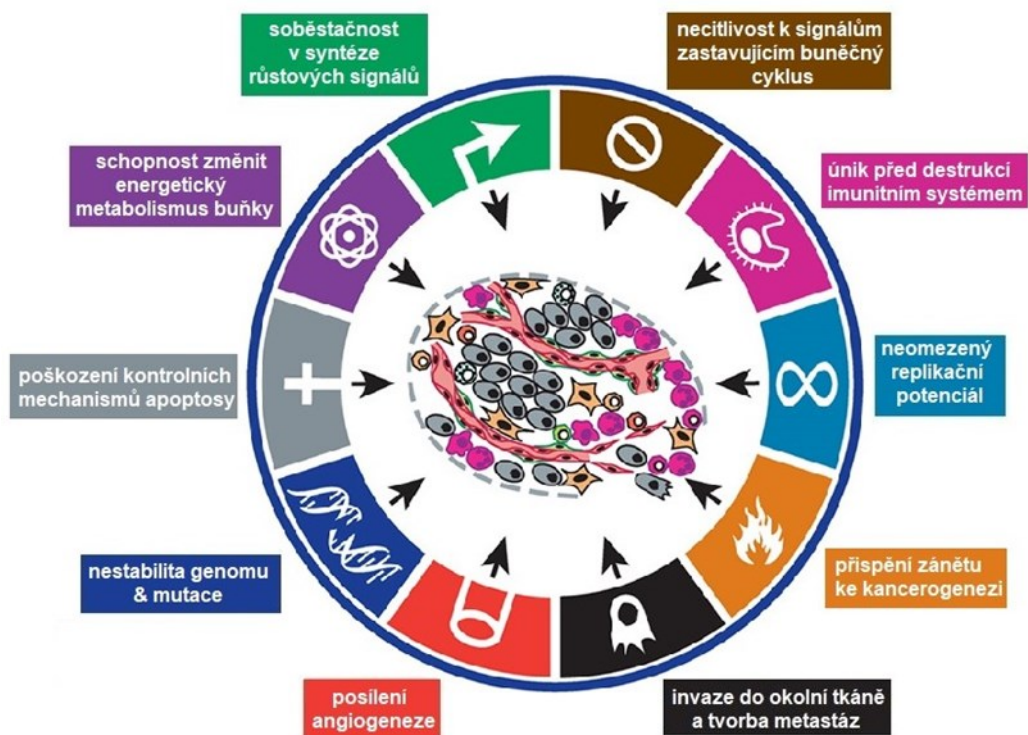
Nádory jsou způsobeny vznikem patologických klonů buňky, ve které se objevila genetická porucha, která je předávána těmto klonům. Genetické změny mají za následek změnu vlastností těchto buněk. Mutace obecně vznikají náhodně, a ne každá mutace vede k nádorovému bujení. Většinou je v poškozené buňce aktivována apoptóza, nebo je buňka rozpoznána a zničena imunitním systémem. Pravděpodobnost vzniku mutací, případně nádorů, je ovlivněna mnoha faktory (Vokurka 2008).

Faktory působící na vznik mutací mohou být fyzikální, chemické nebo biologické. Mezi fyzikální faktory patří ultrafialové nebo ionizující záření. UV záření může způsobovat například nádory kůže, ionizující záření proniká různě hluboko do tkání, podle typu záření. Chemických mutagenů je mnoho typů, působí buď přímé nebo nepřímé poškození DNA. Tyto látky jsou často vdechovány nebo přijímány s potravou, a není možné se jim zcela vyhnout. Karcinogenně působí i některá léčiva, například cytostatika. Mezi biologické faktory působící mutace patří některé viry. Nejvýznamnější je lidský papilomavirus, který způsobuje rakovinu děložního čípku. Patří sem také chronické záněty v organismu, například chronické hepatitidy zvyšují riziko vzniku nádoru jater. Někteří lidé mají vrozené predispozice ke vzniku nádoru, například poruchy imunity, nebo mutace v genech potlačujících nádorové bujení (Vokurka 2008).

Nádorové buňky mají několik základních vlastností způsobených nahromaděnými genetickými mutacemi (Obrázek 1). Mají sníženou závislost na mitogenních podnětech, což je způsobeno vlastní produkcí růstových faktorů, zmnožením receptorů pro růstové faktory nebo modifikací receptorů a převodu signálu. Zároveň mají sníženou schopnost reagovat na faktory tlumící růst buňky, za čímž často stojí inaktivace proteinů p53 a pRb. Nádorové buňky jsou také rezistentní k apoptóze, která by v normálním případě byla odpovědí na

poškození DNA. Proapoptotické signály v buňce buď chybí, nebo se navážou na nepravé návadové receptory. Roli zde opět hraje inhibice p53, který v normální buňce aktivuje apoptózu a inhibuje antiapoptotické faktory (Koutecký 2004).

Dalším typickým znakem nádorových buněk je nesmrtelnost. V normálních buňkách probíhá stárnutí buněk, které se projevuje zkracováním telomer nutných pro správnou replikaci DNA. Nádorové buňky mají schopnost si telomery udržet například tvorbou vysokého množství enzymu telomerázy, který umí dosyntetizovat koncové části telomer podle RNA templátu. Pro tvorbu nádoru je důležitá také angiogeneze, která je nutná k zásobení tumoru živinami. Nádorové buňky působí pomocí narušené genové transkripce zvýšenou tvorbu angiogenetických faktorů, mezi které patří například vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a fibroblastový růstový faktor (FGF), a snižují expresi faktorů působících proti angiogenezi, například trombospondinu 1 (Koutecký 2004).



Obrázek 1 Charakteristické rysy nádorových buněk (upraveno z Hanahan a Weinberg 2011)

Vlastností nádorových buněk je i jejich invazivita a schopnost metastázovat. Používají k tomu mnoho mechanismů, například produkci metaloproteáz, které rozkládají mezibuněčnou hmotu a bazální membránu, aktivaci proteáz v okolí buňky nebo ovlivňování povrchových molekul okolních buněk. Pro tvorbu metastáz je pak nutné, aby se buňky dostaly přes cévní stěnu. Nádorové buňky mají vyšší afinitu k cévní stěně, kterou pak naruší působením proteáz, a dostanou se do mimocévního prostoru. Mají také schopnost unikat imunitnímu systému, který nádorové buňky v normálním případě ničí. Nádorové buňky mají jiné povrchové antigeny než normální buňky, mohou ale potlačit expresi MHC I, podle kterých je imunitní systém, zejm. cytotoxické T lymfocyty, rozpoznají (Koutecký 2004).

Tyto změny jsou způsobeny mutacemi v DNA, které se mohou hromadit. S mutacemi klesá stabilita genomu buňky kvůli snížené funkci opravných mechanismů. Tyto mutace dále působí rozdíly mezi jednotlivými nádory, i když se jedná o nádory stejného typu (Koutecký 2004).

Mutace působící vznik nádorů se nachází v genech, které přímo vedou ke změnám chování buňky, nebo v kontrolních mechanismech chránících buňku před mutacemi a vedoucích k apoptóze poškozené buňky. Mezi geny přímo ovlivňující chování buňky patří onkogeny, které se v normálních buňkách vyskytují jako protoonkogeny, a které jsou zodpovědné za funkce jako dělení buňky nebo regulace buněčného cyklu. Jsou to například receptory pro růstové faktory nebo jaderné transkripční faktory. Geny ovlivňující kontrolní mechanismy v buňce jsou antionkogeny – tumor supresorové geny, nejdůležitější takový gen je p53 (Vokurka 2008).

2.2 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější maligní nádorová onemocnění v České republice i ve světě. Jeho incidence ve většině zemí vzrůstá, pouze v některých rozvinutých zemích stagnuje, pravděpodobně kvůli častějšímu použití kolonoskopie s polypektomií. Jedná se o druhé nejčastější nádorové onemocnění diagnostikované v ČR (na prvním místě je u žen karcinom prsu, u mužů prostaty), u mužů se objevuje častěji než u žen. Podle dat ÚZIS z roku 2017 byla incidence kolorektálního karcinomu v ČR v přepočtu na 100 000 obyvatel 84,5 u mužů a 54,5 u žen, mortalita pak byla u mužů 40,0 a u žen 25,4 na 100 000 obyvatel. V absolutních číslech je kolorektální karcinom diagnostikován přibližně 8 000 lidem ročně, a asi 4 000 lidí na něj každý rok umírají (Diviš et al. 2016, ÚZIS 2020).

Ve světě se kolorektální karcinom objevuje ve větší míře v rozvinutých zemích, obecně jde o třetí nejčastěji diagnostikované nádorové onemocnění, a čtvrtou nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění. Každoročně je diagnostikován u 1–2 milionu lidí, a je příčinou asi 600 000 úmrtí (Brenner et al. 2014).

Mortalita kolorektálního karcinomu se sice snižuje, stále ale zůstává relativně vysoká. Prognóza závisí na stádiu, ve kterém je nádor diagnostikován, a na věku pacienta. Problémem je častý pozdní záchyt onemocnění, čemuž mají předcházet screeningové programy zaměřené na tento typ nádorového onemocnění u osob nad 50 let (Diviš et al. 2016).

2.2.1 Rizikové faktory

Kolorektální karcinom se objevuje ve dvou podobách, sporadické a hereditární. Při hereditární formě existuje genetická predispozice pro tento typ nádoru ve formě zděděné mutace. Při této formě může být indikováno genetické vyšetření, případně i sledování příbuzných. Hereditární forma tvoří pouze 10-20 % případů, patří mezi ně například Lynchův syndrom (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) a familiární adenomatózní polypóza (Diviš et al. 2016).

Sporadická forma kolorektálního karcinomu tvoří většinu těchto nádorů. Pravděpodobnost výskytu této formy ovlivňuje mnoho faktorů, ovlivnitelných i neovlivnitelných. Nejvýznamnějším neovlivnitelným faktorem je věk. Riziko rozvoje tohoto typu rakoviny se výrazně zvyšuje po 50. roce života, a pravděpodobnost výskytu je vyšší u mužů. Dalším rizikovým faktorem může být onemocnění tlustého střeva, například Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida. Chronický zánětlivý stav při těchto onemocněních má často za následek vznik dysplazií, u kterých je vyšší pravděpodobnost, že se z nich vyvinou nádorové buňky. Dále se objevují důkazy, že infekce *Helicobacter pylori*, *Fusobacterium spp.* a jinými mikroorganismy může zvyšovat riziko rozvoje nádoru (Brenner et al. 2013; Diviš et al. 2016).

Mezi ovlivnitelné rizikové faktory patří kouření a špatné stravovací návyky, například častá konzumace alkoholu, červeného masa a živočišných tuků, nebo nízký příjem vlákniny, vápníku a vitamínů A, C, a E. Také úprava potravin hraje roli, riziková je především úprava za vysokých teplot, jako grilování a smažení, při které vznikají karcinogenní polycyklické uhlovodíky. Se špatnými stravovacími návyky souvisí také obezita, která je sama rizikovým faktorem. Problémem je hlavně vysoký podíl viscerálního tuku, který sekrecí prozánětlivých cytokinů působí chronický zánět v oblasti střev (Mármol et al. 2017; Diviš et al. 2016).

2.2.2 Prevence

Prevence kolorektálního karcinomu by měla zahrnovat především eliminaci těch rizikových faktorů, u kterých to je možné. Patří sem například pravidelný pohyb, omezení konzumace červeného masa a masných výrobků, a pravidelná konzumace vlákniny, celozrnných potravin a omega-3 polynenasycených mastných kyselin. Užívání hormonální antikoncepce nebo hormonální substituční terapie (HRT) také snižuje riziko vzniku tohoto typu rakoviny, užívání pouze jako prevence kolorektálního karcinomu však není doporučeno kvůli zvýšenému riziku jiných, například trombotických onemocnění (Brenner 2018; Diviš et al. 2016).

Další možností prevence je dlouhodobé užívání malých dávek (81-325 mg) kyseliny acetylsalicylové. Mechanismus účinku zahrnuje inhibici cyklooxygenázy (COX), ale i jiné mechanismy. Užívání kys. acetylsalicylové je podle U.S. Preventive Services Task Force (USPSTF) doporučeno u pacientů starších 50 let s vyšším než 10% rizikem vzniku rakoviny v příštích 10 letech, u kterých není zvýšené riziko krvácení (Singh 2016).

V sekundární prevenci kolorektálního karcinomu má velký význam celoplošný screening populace nad 50 let. Vzhledem k častému asymptomatickému průběhu prvních stádií a k relativně pomalému rozvoji tohoto typu nádorového onemocnění je screening důležitým nástrojem k odhalení případného nádoru v brzkých stádiích, kdy je lépe léčitelný. Ideální je nádor odhalit ve stádiu adenomu – prekancerózy. Screening kolorektálního karcinomu probíhá pomocí testů okultního krvácení do stolice (TOKS), nebo jako screeningová kolonoskopie. Je doporučováno ve věku mezi 50-54 lety provést každoročně test okultního krvácení, po 55. roce buď pokračovat v testech okultního krvácení, nebo jednou za 10 let absolvovat primární screeningovou kolonoskopii. Od 1.1.2014 probíhá v České republice zvaní občanů nad 50 let na

screeningové vyšetření, které probíhá buď u praktického lékaře, nebo u gynekologa.

Existují dva typy testů okultního krvácení do stolice, guajakový a imunochemický. Je doporučeno dávat přednost imunochemickému testu, který funguje na principu detekce hemoglobinu za pomoci monoklonální protilátky. Jeho výhodou je v senzitivitě, relativně jednoduchém provedení a absence nutnosti dietních opatření (při guajakovém testu může být detekován hemoglobin z potravy, proto je třeba omezit před testem příjem např. červeného masa). Test může být buď kvalitativní – zda se krev ve stolici nachází, nebo kvantitativní, který měří koncentraci hemoglobinu. Pozitivita testu nemusí nutně znamenat přítomnost rakoviny, přítomnost krve ve stolici může být způsobena i např. hemoroidy či zánětlivým onemocněním střeva, je proto nutné provést i další vyšetření. Objevují se i DNA testy, které kromě hemoglobinu zachycují i DNA specifickou pro nádor, zatím ale nejsou příliš rozšířené (Diviš et al. 2016).

Primární screeningovou kolonoskopií lze podstoupit po 55. roce života jako alternativu pravidelných testů na okultní krvácení. Pokud je výsledek negativní, kontrola se opakuje po 10 letech, pokud je pozitivní, následují další vyšetření, například histologické. Alternativou je také vyšetření výpočetní tomografií (CT), které je používáno méně často (Diviš et al. 2016, Brenner et al. 2018).

2.2.3 Symptomy

Rakovina tlustého střeva a konečníku probíhá v časnějších stádiích onemocnění často asymptomaticky, projeví se až při větší velikosti nádoru. Pokud se projeví, je nejčastějším symptomem krvácení z konečníku, případně nález krve ve stolici, ke kterým se mohou přidávat další symptomy. Mezi ty patří například abdominální bolest, změny ve frekvenci vyprazdňování, průjem, zácpa a jejich střídání, pocity plnosti nebo anemie. Tyto symptomy jsou způsobeny částečnou obturací střeva nádorem. Při úplném zneprůchodnění střeva nádorem dochází k ileóznímu stavu, který je v některých případech prvním symptomem nádorového onemocnění. Specifickým projevem karcinomu konečníku jsou tenesmy – nucení na stolici a pocit nedokonalého vyprázdnění. Dalšími symptomy, relativně nespecifickými, jsou ztráta hmotnosti, únava, dyspepsie nebo kachexie (Astin et al. 2011; Diviš et al. 2016).

2.2.4 Diagnostika

Diagnostika kolorektálního karcinomu probíhá podle typických symptomů, nebo při pozitivním nálezu při preventivním screeningu. Pro diagnostiku nádoru je nutné histologické potvrzení, určení velikosti nádoru a případných metastáz, a určení lokalizace a biologického chování. Při výskytu symptomů je jako první krok doporučováno vyšetření *per rectum*, které může nádor odhalit. Pro přesnější vyšetření je dávana přednost kolonoskopii, kvůli vysoké senzitivitě, možnosti vizualizace, a kvůli možnosti odebrání vzorku k biopsii. V některých případech lze při kolonoskopickém vyšetření provést menší zákrok, například odstranění polypů.

Pokud není možné provést kolonoskopii, je další metodou vyšetření nádoru dvojkontrastní irrigografie, která spočívá v rentgenovém (RTG) vyšetření břicha za pomoci dvojitého kontrastu vzduchu a suspenze barya. Nevýhodou je nemožnost odebrat vzorek k biopsii a nutnost dalšího vyšetření ke zjištění karcinomu rekta. Možností je také sledování nádorových markerů, pro kolorektální karcinom se jedná hlavně o markery karcinoembryonální antigen (CEA) a tumorový antigen 19-9 (CA 19-9). Tyto markery jsou však nespecifické, jelikož zvýšené hodnoty se vyskytují u mnoha typů nádorů, využívá se jich spíše pro stanovení prognózy a monitoring léčby.

Další vyšetření se provádí většinou k nálezu metastáz nádoru v jiných částech těla nebo k určení strategie léčby. Pro zhodnocení velikosti nádoru a případných metastáz se využívá CT břicha a malé pánve, u nádorů rekta se využívá magnetická rezonance (MRI). Dále se provádí ultrasonografie a RTG hrudníku ke zjištění metastáz, u karcinomu rekta se využívá i endoskopická sonografie (Diviš et al. 2016).

2.2.5 Stádia onemocnění

Při určení stadia kolorektálního karcinomu se od 1. 1. 2011 využívá TNM klasifikace. Systém TNM spočívá v označení velikosti tumoru (T), postižení regionálních lymfatických uzlin (N) a přítomnosti či rozšíření metastáz (M). Každá z těchto kategorií se podle postižení nádorovým onemocněním dělí do několika podkategorií. Kritéria pro kolorektální karcinom se nachází v následující tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1 TNM klasifikace pro kolorektální karcinom (Diviš et al. 2016)

T	
Tx	Nádor není možné vyloučit
T0	Nepřítomnost nádoru
Tis	Nádor in situ, invaze nádoru do lamina propria mucosae
T1	Invaze nádoru do submukózy
T2	Nádor v muscularis propria
T3	Invaze přes muscularis propria
T4a	Prorůstání nádoru na viscerální peritoneum
T4b	Prorůstání nádoru mezi okolní orgány
N	
Nx	Postižení uzlin se nedá vyloučit
N0	Regionální lymfatické uzliny nejsou postiženy
N1	Postižena 1-3 regionální uzliny
N1a	Postižení 1 uzliny
N1b	Postižení 2-3 uzlin
N1c	Satelity v subseróze, regionální lymf. uzliny nejsou postiženy
N2	Postižení 4 a více uzlin
N2a	Postižení 4-6 uzlin
N2b	Postižení více než 7 uzlin

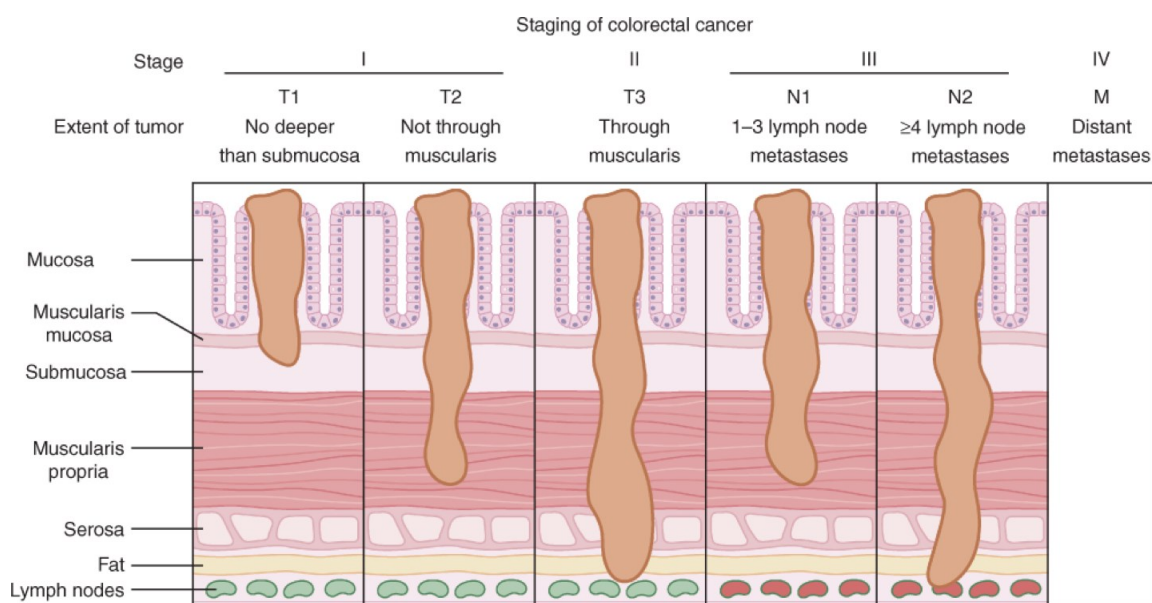
M

Mx	Metastázy se nedají vyloučit
M0	Nepřítomnost vzdálených metastáz
M1	Přítomnost vzdálené metastázy
M1a	Metastáza pouze na jednom orgánu
M1b	Metastázy na více orgánech, postižení peritonea

Podle TNM klasifikace se kolorektální karcinom rozděluje do pěti klinických stádií, podle kterých pak probíhá léčba (Tabulka 2, Obrázek 2).

Tabulka 2 Klinická stádia kolorektálního karcinomu (Zavoral et al. 2013)

Stádium 0	Tis, N0, M0
Stádium I	T1-2, N0, M0
Stádium II	T3-4, N0, M0
Stádium III	jakékoliv T, N1-2, M0
Stádium IV	jakékoliv T, jakékoliv N, M1



Obrázek 2 TNM klasifikace kolorektálního karcinomu (DiPiro et al. 2014)

Dříve byla k určení stádia kolorektálního karcinomu používána Duksova klasifikace, která je nyní obsoletní (Zavoral et al. 2013).

2.2.6 Možnosti léčby

Pro léčbu kolorektálního karcinomu se využívá několika terapeutických přístupů. Patří sem chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie a cílená biologická léčba, často se uplatňují i kombinace několika metod. Postup léčby se určuje podle stádia onemocnění, pro správný výběr postupu je tedy nutná správná diagnóza a určení vlastností nádoru. Na léčbu lépe odpovídají nádory v časných stádiích onemocnění, je zde i vyšší možnost úplného uzdravení, proto je důležité včasné zachycení nádoru (Diviš et al. 2016).

Chirurgická léčba je indikována ve většině případů. Ve velmi časných stádiích je možné nádor či polyp odstranit pouze chirurgicky, v pokročilejších stádiích je chirurgická léčba kombinována s ostatními metodami. U nádorů tlustého střeva je odstraněn nádor a lymfatické cévy, případně je provedena resekce postiženého úseku. Velikost zásahu je dána velikostí nádoru, jeho polohou, a jeho krevním zásobením. U rektálních tumorů je standardem provedení totální mezorektální excise. V současnosti se často používají laparoskopické metody, které jsou méně invazní a snižují dobu rekonvalescence. Jejich nevýhodou je složitější provedení a vyšší cena operace (Brenner et al. 2014). Chirurgicky je také možné řešit metastatické a neresekabilní nádory, pomocí kolostomie či bypassu obcházejícího nádor. Tento postup patří mezi paliativní léčbu nádoru (Diviš et al. 2016).

V pokročilejších stádiích se k chirurgické léčbě přidává chemoterapie. Po resekcii nádoru a histologickém vyšetření může být indikována adjuvantní chemoterapie k prevenci recidivy onemocnění a odstranění zbylých nádorových buněk. U pacientů ve II. stádiu onemocnění je adjuvantní chemoterapie doporučena v případě vyššího rizika relapsu, ve III. stádiu je adjuvantní chemoterapie indikována u všech pacientů bez kontraindikací. Mezi cytostatika používaná v adjuvantní chemoterapii patří 5-fluorouracil, který může být pro zvýšení účinku kombinován s leukovorinem, nebo s dalšími cytostatiky

oxaliplatinou nebo irinotekanem. 5-Fluorouracil a jeho proléčivo kapecitabin zvyšují míru přežití o 13-15 %, přidání oxaliplatiny pak dále zvyšuje míru přežití. Benefity léčby oxaliplatinou se neprokázaly u pacientů nad 65-70 let, stejně tak se neprokázal benefit terapie 5-fluorouracilem s přídatkem irinotekanu, nebo přídatku bevacizumabu, nebo cetuximabu k terapii oxaliplatinou (Brenner et al. 2014). Při rektálních tumorech může být indikována neoadjuvantní chemoradioterapie – kombinace chemoterapie a radioterapie. Cílem je zmenšení nádoru pro snadnější odoperování a snížení pravděpodobnosti relapsu (Diviš et al. 2016).

Biologická léčba je další možností terapie nádorů tlustého střeva a konečníku. Tato biologická léčiva jsou zacílena na nádorové buňky, proto mají vyšší účinnost než klasická cytostatika. Využívají se léčiva cílená na VEGF, například bevacizumab, na receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), kam patří cetuximab a panitumumab, multikinázové inhibitory jako regorafenib, nebo léčiva cílená na lidský epidermální receptor 2 (HER2), například trastuzumab (Piawah, Venook 2019). Použití biologické léčby závisí i na možných mutacích v nádorových buňkách, například buňky s mutací K-ras mohou být rezistentní k terapii léčivy cílenými na EGFR (Diviš et al. 2016).

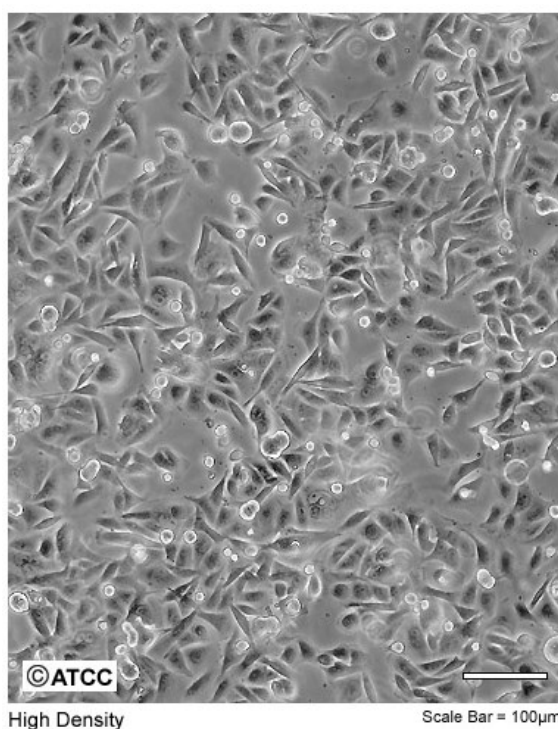
U pacientů se vzdálenými metastázami se rozhoduje podle stavu konkrétního pacienta, léčba by měla být individuální. V některých případech je možná resekce metastáz, případně jejich zmenšení pomocí chemoterapie a následná resekce. Využívá se i biologická léčba. Pokud není možné metastázy odstranit, je doporučována symptomatická a paliativní léčba (Diviš et al. 2016).

Postup terapie je určován podle stadia onemocnění. Ve stadiu 0 a I je tumor odstraněn chirurgicky, adjuvantní terapie není indikována. Ve stadiu II je tumor také odstraněn chirurgicky, v případě rizikových pacientů následuje šestiměsíční adjuvantní terapie 5-fluorouracilem nebo kapecitabinem, nebo neoadjuvantní chemoterapie a radioterapie. Ve stadiu III je po chirurgickém

odstranění tumoru vždy indikována adjuvantní chemoterapie nebo neoadjuvantní chemoradioterapie. Ve IV. stádiu se používá systémová paliativní chemoterapie a cílená léčba (Diviš et al. 2016).

2.3 Nádorová linie SW480

V experimentální části své diplomové práce jsem pracovala s buněčnou linií SW480, proto zde popíšu její vlastnosti. SW480 je lidská nádorová buněčná linie pocházející z kolorektálního adenokarcinomu 51letého muže. Pochází ze středně diferencovaného primárního tumoru ve stádiu III-IV. Jedná se o adherentní epiteliální buňky (Obrázek 3).



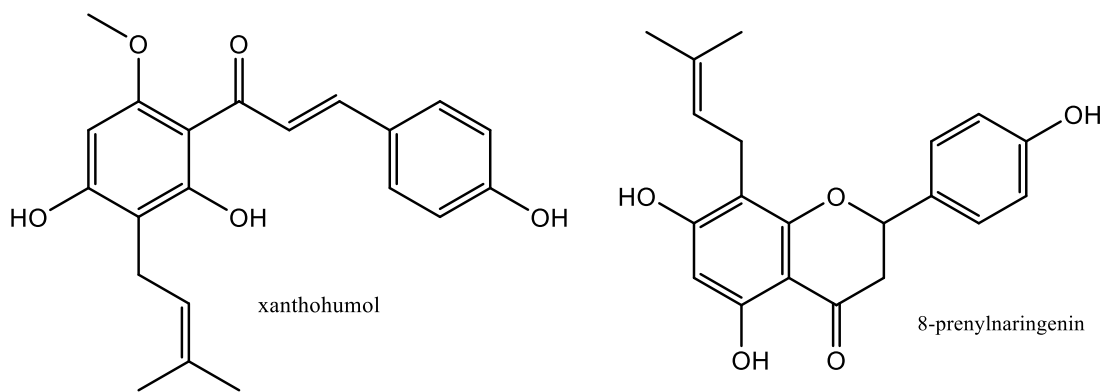
Obrázek 3 Vzhled buněčné linie SW480 (zdroj: ATCC 2016)

U buněčné linie SW480 byly popsány mutace v genech kódujících proteiny p53 a K-ras. V proteinu p53 jsou přítomné dvě bodové mutace R273H a P309S, v řetězci proteinu tedy dochází k substituci aminokyseliny arginin za histidin v pozici 273 a serinu za prolin v pozici 309. Hladiny tohoto mutovaného proteinu jsou v buňkách SW480 zhruba 20x vyšší, než je tomu u buněk nesoucích divoký typ p53. U protoonkogenu K-ras byla popsána mutace G12V, tedy záměna glycinu za valin v pozici 12 (Rochette et al. 2005; Ahmed et al. 2013). Tato mutace je spojována s horší prognózou u pacientů s primárním kolorektálním karcinomem (Hayama et al. 2019).

2.4 Prenylflavonoidy

Prenylflavonoidy jsou v přírodě se vyskytující sekundární metabolity rostlin, ve kterých je přítomen prenylový řetězec navázaný na strukturu flavonoidu. Vyskytují se v relativně malém počtu čeledí, mezi které patří Fabaceae, Moraceae, Cannabaceae, Clusiaceae, Apiaceae nebo Rutaceae. Rostliny pravděpodobně tvoří prenylované flavonoidy jako obranu před škůdci a patogenními organismy, nebo k vyrovnání se s oxidačním stresem. Nejčastěji se nachází v kůře či kořenech, objevují se ale i v ostatních částech rostlin. Obecně nebývají často přijímány potravou (s výjimkou prenylflavonoidů obsažených v pivě), a jejich extrakce z rostlin je komplikovaná, jelikož se vyskytují ve směsích. Izolace prenylflavonoidů proto není příliš ekonomicky zajímavá. Prenylflavonoidy jsou v současnosti velmi zkoumanou skupinou látek kvůli jejich biologickým účinkům (Šmejkal 2014).

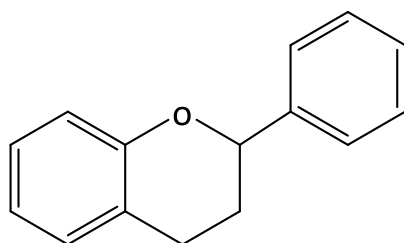
Nejvyšší koncentrace prenylflavonoidů se dá najít ve chmelu otáčivém – *Humulus lupulus* (Cannabaceae). Ve chmelu se nachází především xanthohumol a desmethylxanthohumol, které jsou v průběhu vaření piva konvertovány na isoxanthohumol (z xanthohumolu), 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin (z desmethylxanthohumolu). Střevní bakterie pak konvertují isoxanthohumol na 8-prenylnaringenin. Xanthohumol je nejčastěji konzumovaným prenylflavonoidem (Venturelli et al. 2016). Příklady prenylflavonoidů jsou uvedeny v Obrázku 4.



Obrázek 4 Příklady prenylflavonoidů – vzorce xanthohumolu a 8-prenylnaringenin (Venturelli et al., 2016)

2.4.1 Struktura

Struktura prenylflavonoidů vychází ze základní struktury flavonoidů. Tu tvoří flavanové jádro tvořené dvěma benzenovými jádry spojenými heterocyklickým pyranovým kruhem. Chemický název této sloučeniny je 2-fenyl-benzo- γ -pyran (Obrázek 5). Otevřením pyranového kruhu vznikají chalkony, které se také řadí mezi flavonoidy (Venturelli et al. 2016).



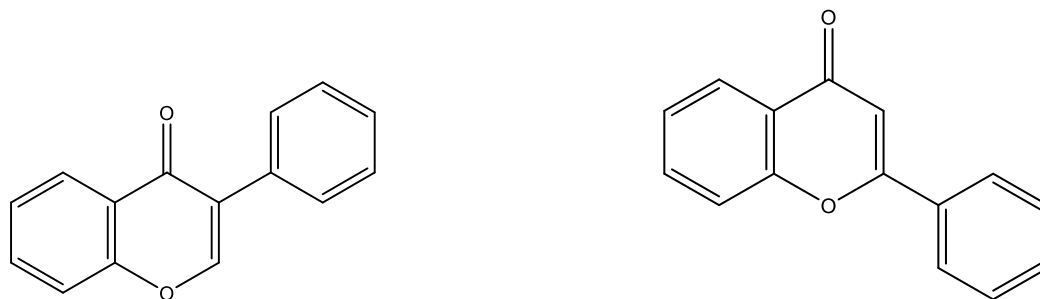
2-fenyl-benzo- γ -pyran

Obrázek 5 Struktura flavanového jádra (Šmejkal, 2014)

Další možností je struktura vycházející z chromonu, na který je v poloze 2 nebo 3 navázaný fenyl. Pokud je fenyl navázaný v poloze 2, vzniká základ pro flavonoidy typu flavonu, v poloze 3 vzniká základ pro isoflavonoidy typu isoflavonu (Obrázek 6). Tato struktura může být dále substituována hydroxylovými skupinami (Šmejkal 2014).

Obecně se mezi flavonoidy řadí mnoho různých typů sloučenin, patří sem například flavony, isoflavony, chalkony, flavonoly, flavanoly nebo flavanony.

Struktura těchto sloučenin se dá upravit i syntetickými nebo biotechnologickými metodami. Na struktuře a substituentech, například methylových nebo hydroxylových skupinách, závisí biologická aktivita flavonoidů (Šmejkal 2014).



flavon

isoflavon

Obrázek 6 Základní struktury flavonoidů – příklady (Šmejkal, 2014)

Prenylované flavonoidy vznikají navázáním jednoho nebo více prenylových, případně geranylových nebo farnesylových řetězců na tyto struktury. Většina prenylflavonoidů je C-prenylovaných, v menším množství se vyskytují i O-prenylované deriváty (Šmejkal 2014). Se zvyšujícím se množstvím prenylových řetězců stoupá lipofilita sloučenin, vazba na membrány a transmembránový transport, což zvyšuje biologickou aktivitu prenylovaných flavonoidů (Venturelli et al. 2016). Prenylace flavonoidů snižuje jejich absorpci ze střeva, zvyšuje ale míru jejich inkorporace do buněk, a zpomaluje eflux z buněk. Usnadňuje také akumulaci prenylflavonoidů ve tkáních při pravidelném příjmu potravou (Mukai 2018).

2.4.2 Biologické účinky

Prenylované flavonoidy mají širokou škálu biologických účinků. Působí antioxidačně, antikoagulačně, antibakteriálně, antiviroticky, anthelminticky a protizánětlivě. Ovlivňují také metabolismus cukrů a tuků, a mají estrogení aktivitu. Mají také protinádorové a cytotoxické účinky (Venturelli et al. 2016). Většina těchto vlastností byla prokázána při *in vitro* pokusech, je třeba je potvrdit dalšími pokusy *in vitro* či *in vivo*.

Prenylflavonoidy s antibakteriální a antifungální aktivitou pravděpodobně chrání rostlinu před chorobami. Tato aktivita prenylflavonoidů závisí pravděpodobně na přítomnosti a pozici prenylového řetězce, se zvýšenou lipofilitou proniká snáze do membrán, a lépe interaguje s cílovými proteiny. Antibakteriální aktivitu prenylflavonoidů by bylo možné využít k léčbě infekcí. Některé prenylflavonoidy vykazují i antivirovou aktivitu, mechanismus tohoto působení zatím není plně objasněn (Chen et al. 2014).

Některé prenylflavonoidy patří mezi fytoestrogeny, což znamená, že vykazují podobné účinky jako estradiol. Ten má vliv na reprodukční systém, CNS, denzitu kostí, retenci vody, nebo na srážlivost krve. Úroveň fytoestrogení aktivity závisí na afinitě k estrogenovým receptorům, která je zvyšována prenylací. Relativně vysokou fytoestrogení aktivitu má 8-prenylnaringenin. Má protektivní vliv na kardiovaskulární systém, podle některých studií působí osteoprotektivně a zmírňuje příznaky menopauzy, jako návaly horka. Doplňky stravy obsahující prenylflavonoidy, většinou z chmele, mohou být využívány ke snížení projevů menopauzy či ke zvětšení prsou. Na určení efektivity prenylflavonoidů v těchto indikacích je však nutné provést další studie (Tronina et al. 2020).

Antioxidační aktivita prenylovaných flavonoidů znamená schopnost vychytávat volné radikály, které mohou být pro člověka škodlivé. Způsobují například oxidační poškození DNA, proteinů a lipidů. Existuje několik

mechanismů antioxidačního působení prenylflavonoidů, patří sem zhášení reaktivních kyslíkových radikálů, chelatace dvojmocných kovových kationtů nebo schopnost inhibice aktivity oxidačně-redukčních enzymů (Nešpor et al. 2017). Je to dáno jejich strukturou, mohou z hydroxyskupin, navázaných na základní strukturu, snadno odštěpit vodík, který se váže na volný radikál, a po jehož odštěpení vzniká méně reaktivní fenoxylový radikál. Prenylace většinou vede ke zvýšení antioxidační aktivity flavonoidů, záleží však na místě navázání prenylu (Xiaoman et al. 2015).

Některé prenylované flavonoidy působí i protizánětlivě to je dáno jejich schopností inhibovat COX-1 a COX-2, čímž brzdí syntézu prostaglandinů. Zároveň inhibují i aktivitu jaderného transkripčního faktoru NF- κ B, který zvyšuje transkripci genů pro tvorbu COX-2. Mohou také inhibovat tvorbu NO pomocí inhibice indukovatelné syntázy oxidu dusnatého (iNOS). Neplatí to však pro všechny flavonoidy, například 8-prenylnaringenin naopak indukuje tvorbu iNOS (Nešpor et al. 2017).

Prenylflavonoidy mohou působit i kardioprotektivně a potlačují příznaky aterosklerózy, mají vliv na oxidaci lipoproteinů a na srážlivost krve. Kardioprotektivní účinek je způsoben jejich antioxidačním, antitrombotickým, antiflogistickým a hypolipidemizujícím účinkem, vyšší příjem prenylflavonoidů snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. Prenylflavonoidy mají také vliv na glykemii, pomocí inhibice α -glukosidázy snižují absorpci glukózy v tenkém střevě (Nešpor et al. 2017).

2.4.3 Protinádorová aktivita

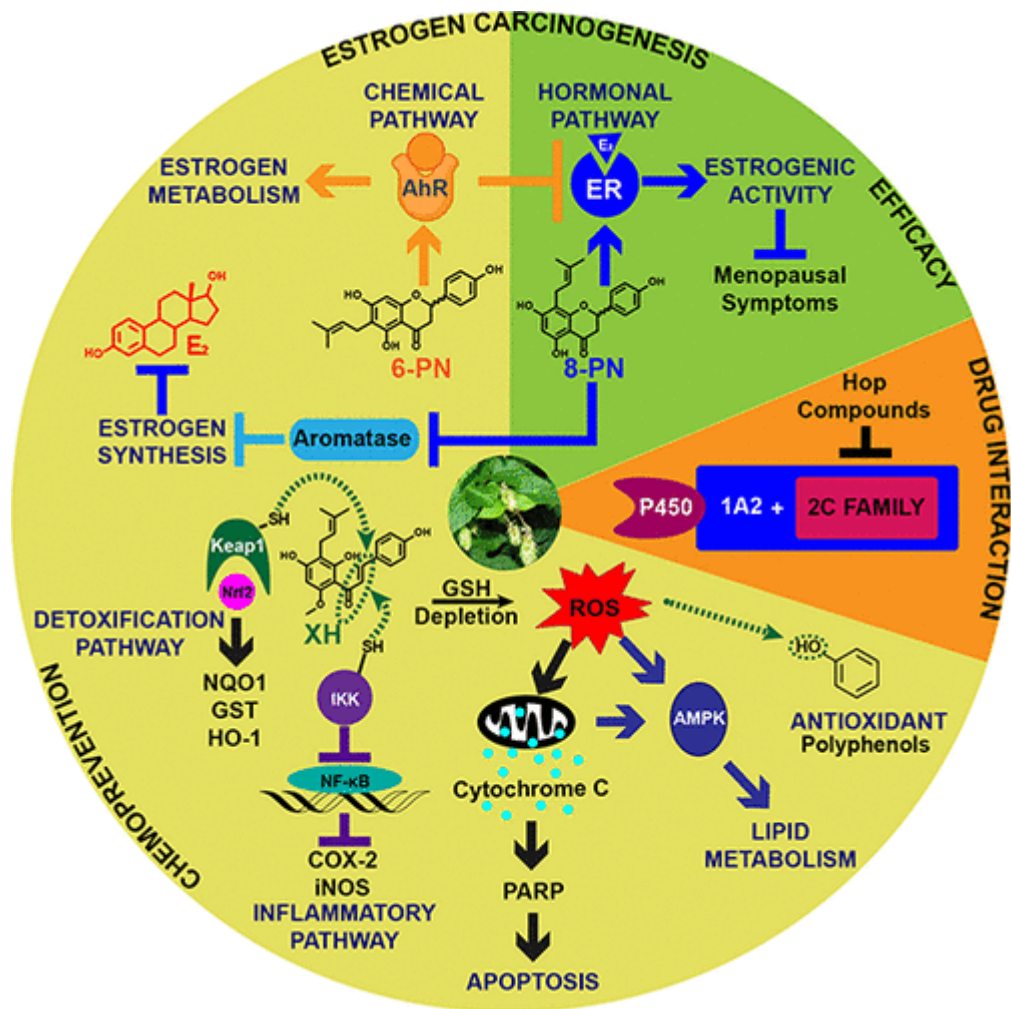
U mnoha prenylovaných flavonoidů byla prokázána protinádorová aktivita, které tyto látky dosahují pomocí různých mechanismů účinku. Mají přímou antioxidační aktivitu, pomocí které zabraňují reaktivním formám kyslíku poškozovat buňky, a tím vést ke vzniku rakoviny. Přispívají také k eliminaci karcinogenů indukcí enzymů detoxikujících kancerogeny, například NAD(P)H:chinonoxidoreduktázy (NQO). Dále také inhibují metabolickou aktivaci prokarcinogenů pomocí inhibice některých isoformů cytochromu P450, čímž ovlivňují biotransformaci heterocyklických aminů nebo benzo[a]pyrenu (Karabín et al. 2012).

Prenylované flavonoidy mají i protizánětlivé účinky, které se mohou uplatnit v protinádorovém působení, protože chronický zánět je jednou z možných příčin vzniku nádorových onemocnění. Snížením tvorby prostaglandinů, například pomocí inhibice COX-2 a NF- κ B, mohou prenylflavonoidy snižovat riziko vzniku zánětu a zvýšené angiogeneze. Angiogeneze je také ovlivňována tvorbou NO, který má silné vasodilatační účinky a zvyšuje tok krve a živin do nádoru. Prenylflavonoidy mohou tvorbu NO inhibovat prostřednictvím inhibice syntézy iNOS (Karabín et al. 2012).

Prenylflavonoidy mají vliv i na buněčný cyklus, který mají schopnost zastavit v S nebo G₁ fázi, nebo na hranici těchto fází. Některé, například xanthohumol, inhibují při pokusech *in vitro* aktivitu DNA-polymerázy α nebo DNA-topoisomerázy, čímž zpomalují replikaci nádorových buněk (Karabín et al. 2012).

Výhodou prenylflavonoidů je také nízká cytotoxicita v nenádorových buňkách, a z toho plynoucí menší množství nežádoucích účinků. Z tohoto důvodu i kvůli jejich ostatním vlastnostem jsou nadějnými látkami pro prevenci a léčbu nádorových onemocnění (Karabín et al. 2012). Biologické cíle

prenylflavonoidů z chmelu otáčivého, které se mohou podílet na protinádorovém působení těchto látek, jsou uvedeny v Obrázku 7.



Obrázek 7 Biologické cíle prenylflavonoidů z chmelu otáčivého (Bolton et al. 2019)

3 Cíl práce

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo studovat protinádorovou aktivitu semisyntetických prenylovaných derivátů flavonoidu naringeninu v buněčné linii SW480. Pro splnění tohoto cíle bylo třeba provést:

- Rozmražení buněk SW480, počítání buněk v Bürkerově komůrce, pasážování, nasazení, kultivace a ovlivnění buněk prenylflavonoidy
- Test cytotoxicity pomocí roztoku neutrální červeně (NRU test)
- Stanovení koncentrace IC_{50} u vybraných derivátů
- Hodnocení změn v buněčném cyklu pomocí průtokové cytometrie

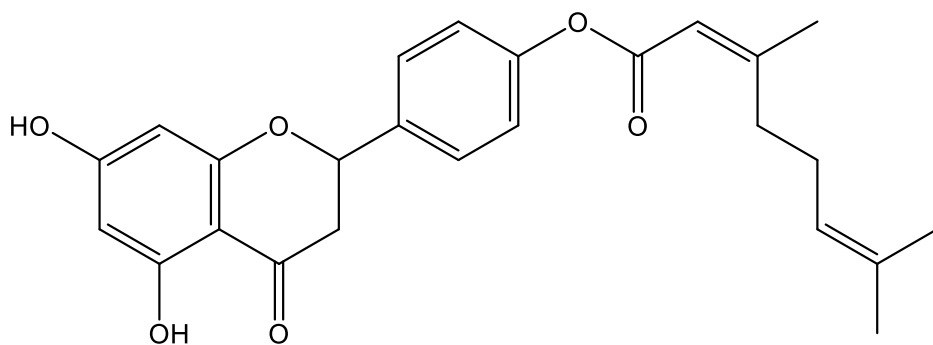
4 Experimentální část

4.1 Biologický materiál a chemikálie

- Buněčná linie SW480 (ATCC)
- „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM) s vysokým obsahem glukosy (Sigma-Aldrich, ČR)
- Fetální bovinní sérum – FBS (Lonza, ČR)
- HEPES (Sigma-Aldrich, ČR)
- Penicilin/Streptomycin (Lonza, ČR)
- 0,01 M fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) (Sigma-Aldrich, ČR)
- Trypsin-EDTA (Lonza, ČR)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, ČR)
- Doxorubicin
- Neutrální červeň
- Trypanová modř (Biotech, ČR)
- Bovinní sérový albumin (BSA)
- Běžné chemikálie čistoty p.a.

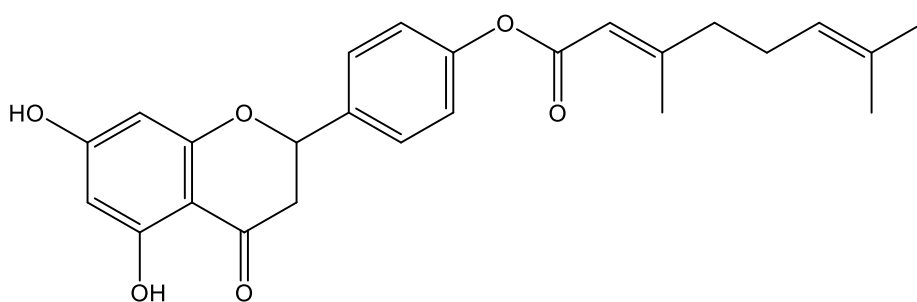
4.1.1 Testované látky

Testované deriváty naringeninů byly připraveny Dr. Hubertem Chapui a Jakubem Kernalem na University of Lorraine (Nancy, Francie). Struktury látek se známou strukturou jsou uvedeny v obrázku 8. Vzorek G obsahoval naringenin vyextrahovaný z kvasinkové kultury bez obsahu prenyltransferas, vzorek H obsahoval směs naringeninů a jeho prenylovaných derivátů, získanou extrakcí z kvasinkové kultury obsahující prenyltransferasu AtaPT (*Aspergillus terreus* aromatická prenyltransferasa).



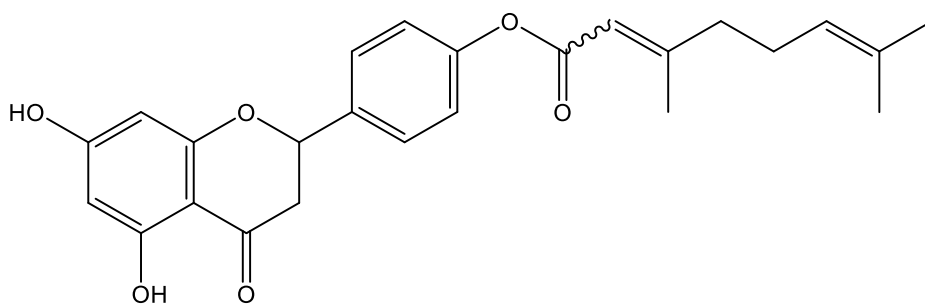
4-(5,7-dihydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl (Z)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

Derivát A



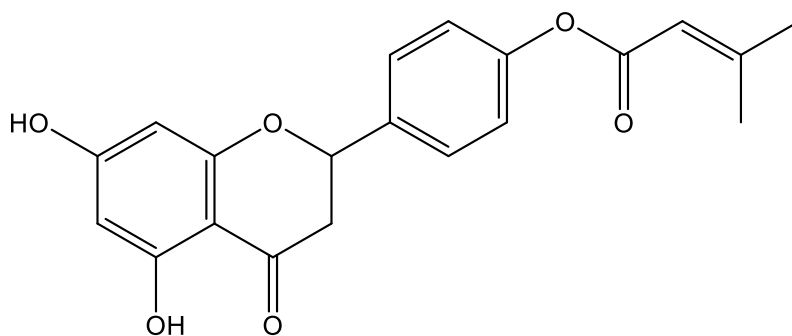
4-(5,7-dihydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl (E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

Derivát B



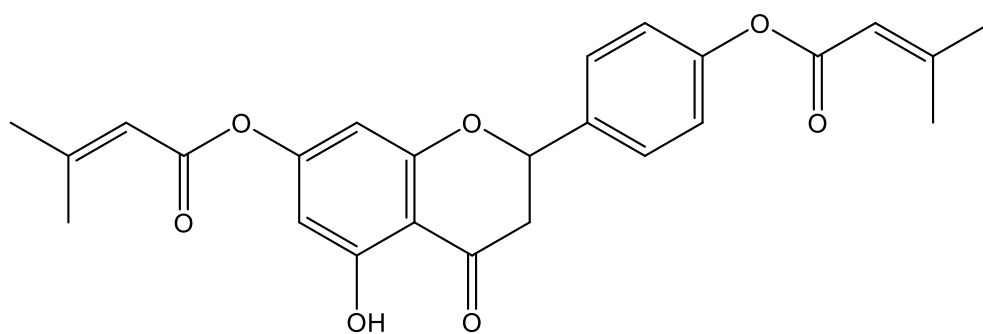
4-(5,7-dihydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl 3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

Derivát C



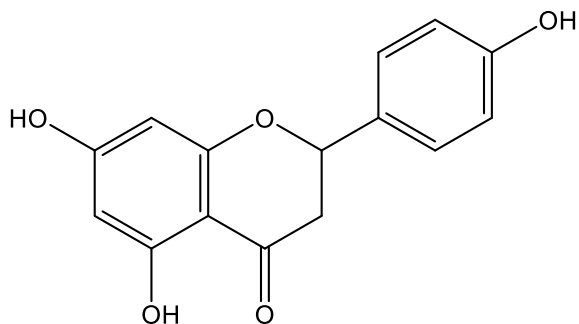
4-(5,7-dihydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl 3-methylbut-2-enoate

Derivát D



5-hydroxy-2-(4-((3-methylbut-2-enoyl)oxy)phenyl)-4-oxochroman-7-yl 3-methylbut-2-enoate

Derivát E



5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one

Derivát F – naringenin

Obrázek 8 Struktura naringeninů a jeho prenylovaných derivátů

4.2 Pomůcky a přístroje

4.2.1 Pomůcky

Sterilní kultivační lahve, mikrozkuhavky, sterilní jednorázové pipety, jedno- a multikanálové automatické pipety, sterilní a nesterilní špičky na pipety, pipetovač, sterilní 6-jamkové a 96-jamkové destičky, vaničky, kádinky, Bürkerova komůrka, stojan na zkumavky, kahan, jednorázové rukavice

4.2.2 Přístroje

Laminární box (BioAir AURA 2000 M.A.C.)

CO₂ Inkubátor (Heraeus HeraCell 150)

Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100)

Vodní lázeň (Mettler)

Spektrometr (Tecan Infinite M200)

Průtokový cytometr (SONY SA3800)

4.3 Metody

4.3.1 Kultivační médium

Médium ke kultivaci buněk SW-480 se skládá z 500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) média s vysokým obsahem glukosy, ke kterému je přidáno 50 ml inaktivovaného FBS (fetální bovinní sérum), 5 ml HEPES pufru a 5 ml roztoku penicilinu a streptomycinu (Pen/Strep).

4.3.2 Rozmrazování buněk

Buňky se dlouhodobě dají uchovávat zamražené v tekutém dusíku. Pro použití v pokusech je nutné buňky rozmrazit a namnožit v kultivačním médiu. Při rozmrazování buněk je nejprve třeba připravit nezahřáté kultivační médium, a vyjmout buňky z tekutého dusíku. Malé množství nezahřátého média se přidá k zamraženým buňkám, po rozpuštění části buněk se odsaje a přidá ke zbytku média. Toto se opakuje, dokud nejsou rozpuštěny všechny buňky, následně se médium s buňkami homogenizuje a centrifuguje 5 min při 70 g a laboratorní teplotě. Poté se odsaje supernatant, a peleta je resuspendována v 15 ml kultivačního média. Tato suspenze je nasazena do kultivační lahve a ponechána v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Po 24 hodinách je třeba vyměnit kultivační médium.

4.3.3 Pasáž buněk

Pasáž buněk probíhala vždy po třech až čtyřech dnech (v pondělí a ve čtvrtek), když buňky dosáhly konfluency přibližně 80 %.

Při pasážování buněk bylo nejprve slito původní médium. Buňky pak byly opláchnuty 2x7 ml PBS. Následně byl přidán 1 ml trypsinu-EDTA, a láhev byla vložena na 3 minuty do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Buňky je třeba pravidelně kontrolovat pod mikroskopem. Ve chvíli, kdy měla většina buněk po sklepnutí

láhve kulovitý tvar, byly přidány 4 ml kultivačního média, a směs byla homogenizována pomocí pipety. Médium s buňkami (0,7 - 1 ml) bylo přeneseno do nové sterilní lahve, a doplněno 10 ml kultivačního média. Láhev byla následně vložena do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).

Zbylé buňky byly použity k pokusům.

4.3.4 Počítání buněk

Výpočet koncentrace buněk je nutný pro určení objemu buněčné suspenze, která se následně využije k nasazování buněk na destičku. Pro výpočet koncentrace buněk v suspenzi byla využita Bürkerova komůrka.

Z buněčné suspenze bylo odebráno 10 µl, ke kterým bylo přidáno 10 µl trypanové modři. Po homogenizaci bylo 9 µl této směsi pipetováno do Bürkerovy komůrky, kde byly buňky počítány. Počítáno bylo vždy 5 velkých čtverců v úhlopříčce, v každém čtverci byly počítány buňky ležící uvnitř čtverce, a buňky dotýkající se pravého a dolního okraje.

Množství buněk v 1 ml bylo vypočítáno pomocí vzorce

$$c = \frac{x}{n} \times 2 \times 10^4$$

c.....koncentrace buněk v 1 ml

x.....celkový počet buněk

n.....počet spočítaných čtverců

2.....ředění

10⁴.....přepočet na 1 ml

4.3.5 Nasazování a ovlivňování buněk

Pro provádění pokusů byly buňky nasazeny na 96jamkové destičky. Do každé jamky bylo nasazeno 3000 buněk ve 100 μl média.

Po 24hodinové inkubaci bylo k těmto buňkám přidáno 100 μl roztoku média se zkoumanými látkami. Jako kontrolní vzorek byl použit roztok média s 0,1 % rozpouštědla zkoumaných látek (ethanol nebo DMSO). V některých pokusech byl použit i kontrolní vzorek s koncentrací 1 % ethanolu, jelikož některé látky byly ve vyšších koncentracích hůře rozpustné, a pro dosažení koncentrace 100 μM bylo použito desetinásobné množství 10 μM roztoku.

Dále byl jako negativní kontrola použit 20% roztok DMSO v médiu, a roztok doxorubicinu v koncentraci 0,05 μM , což je pro tyto buňky IC_{50} .

Zkoumané látky byly k buňkám pipetovány v různých koncentracích ve 100 μl média. V prvních pokusech byly použity koncentrace 1, 10 a 100 μM , v následujících pokusech byly použity koncentrace 1, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 μM . K přípravě těchto koncentrací byly použity 1000x koncentrovanější roztoky látek v rozpouštědle, které byly naředěny médiem v množství 2 μl roztoku látky a 998 μl média. První sada látek byla rozpuštěna v ethanolu, druhá sada byla rozpuštěna v DMSO.

Ve všech pokusech byla každá z látek přidána do 6 jamek. Po přidání látek následovala 72hodinová inkubace při 37 °C a 5 % CO_2 v inkubátoru, poté byla změřena viabilita buněk pomocí testu s neutrální červení (NRU).

4.3.6 Test cytotoxicity – NRU

Při všech pokusech byl pro stanovení viability buněk použit NRU test – barvení neutrální červení (neutral red uptake). Princip tohoto barvení spočívá ve schopnosti žijících buněk vázat neutrální červeň. Neutrální červeň prostupuje do buněk pomocí pasivní difuze a koncentruje se v lyzosomech. V lyzosomech je pomocí ATP udržováno nižší pH, ve kterém je molekula barviva nabitá, a proto zde zůstává zachycena. Po smrti buněk se nízké pH v lyzosomech neudrží, proto se zde molekuly barviva nekumulují. Po fixaci a lýze buněk se množství barviva zachyceného buňkami dá změřit spektrofotometrem.

Pro toto barvení bylo z destiček vyklepnutím odstraněno médium s látkami, a bylo nahrazeno 200 μ l média s rozpuštěnou neutrální červení o koncentraci 40 μ g/ml. Destičky s tímto médiem byly vráceny na 2-3 hodiny do termostatu k inkubaci. Poté bylo médium znovu odstraněno vyklepnutím, a k buňkám bylo přidáno 100 μ l fixačního roztoku. Fixační roztok je 1 g/100 ml CaCl_2 v 0,5 % roztoku formaldehydu. Destičky s fixačním roztokem se nechaly stát při pokojové teplotě, po 15 minutách byl fixační roztok vyklepnut, a k buňkám bylo přidáno 200 μ l lyzačního roztoku. Lyzační roztok se skládá z 1 % CH_3COOH v 50 % ethanolu. Destičky s lyzačním roztokem byly ponechány 30 minut na třepačce. Poté byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan při 540 nm.

4.3.7 Příprava vzorků pro sledování buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

Pro cytometrické měření byly buňky nasazeny na 6jamkovou destičku. Po 72hodinové inkubaci s látkami bylo médium odstraněno, a buňky byly dvakrát opláchnuty PBS. Poté bylo do jamek přidáno 200 μ l trypsinu, po tříminutové inkubaci byly do jamek přidány 2 ml sérového média. Suspenze s buňkami byla z jamek přenesena do 5 ml plastové zkumavky s víčkem a centrifugována 5 minut při 20 °C a 130 g. Po odsátí supernatantu byly buňky opláchnuty studeným PBS a znovu centrifugovány za stejných podmínek. PBS bylo odsáto, a k buňkám byly po částech a za třepání na třepačce přidávány 2 ml ledového ethanolu 70 %. Do doby měření byl vzorek ponechán v lednici. Pokud bylo měření prováděno za delší dobu, byl vzorek uchováván při -20 °C.

Před samotným měřením byl vzorek promíchán na třepačce a centrifugován 5 minut při 20 °C a 500 \times g. Po odsátí ethanolu následoval oplach PBS s 0,5 % BSA jako prevence rozpadu buněk. Poté byl vzorek znova centrifugován 5 minut při 20 °C a 130 g, PBS bylo odsáto, a k buňkám bylo přidáno 500 μ l barvicího roztoku PI/RNase (propidium jodid a ribonukleasa). Vzorek se 45-60 minut inkuboval při 37 °C, před měřením na průtokovém cytometru byl vzorek promíchán na třepačce. Při vlastním měření bylo snímáno 10 000 událostí v oblasti výskytu buněk.

4.3.8 Statistická analýza

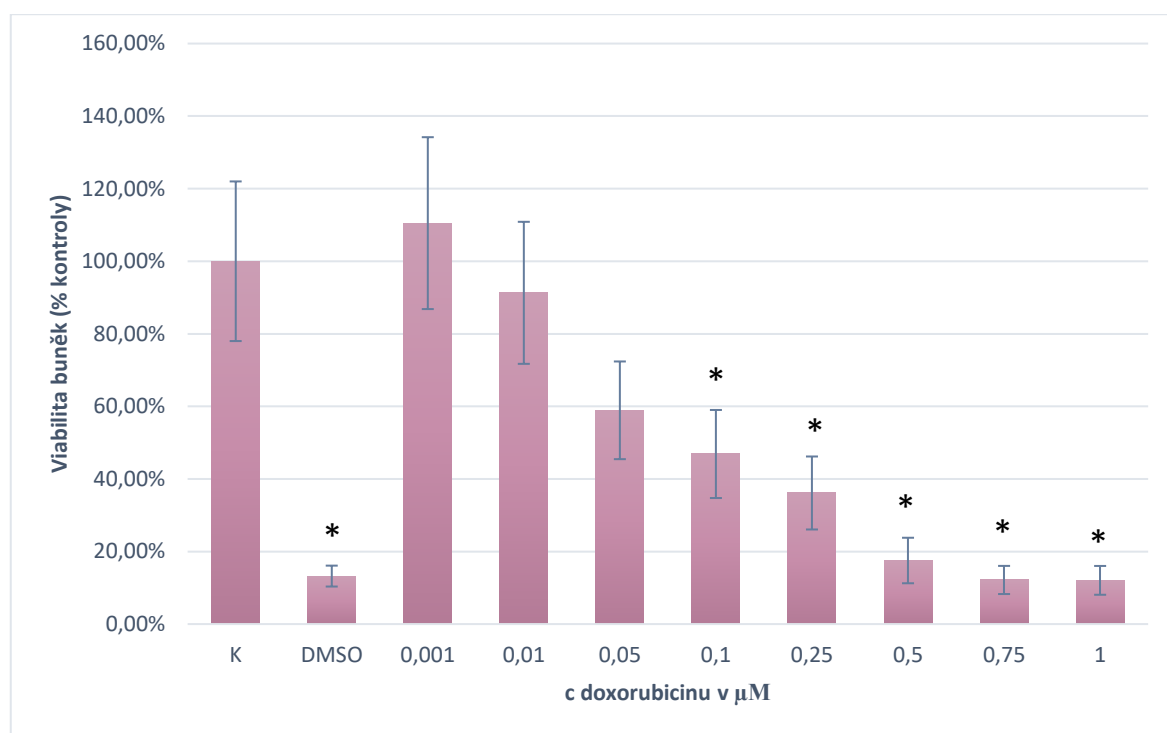
Vzorky pro sledování cytotoxicity byly měřeny v hexaplikátech a každé stanovení bylo provedeno obvykle dvakrát. Analýza buněčného cyklu byla opakována 2x. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD. Statistické hodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) pomocí one-way ANOVA s Dunnettovým *post hoc* testem. Rozdíly byly považovány za významné, když $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Stanovení IC₅₀ doxorubicinu

Před provedením pokusů s látkami bylo třeba stanovit hodnotu IC₅₀ doxorubicinu pro buňky SW480. Tato koncentrace pak byla použita jako jeden z kontrolních vzorků. Pro určení IC₅₀ byly provedeny dva pokusy s koncentracemi doxorubicinu 0,001 – 1 μM.

Koncentraci IC₅₀ se nejvíce blížila koncentrace doxorubicinu 0,05 μM (Obrázek 9).



Obrázek 9 Vliv doxorubicinu na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr ± SD ze dvou experimentů. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO. * $p < 0,05$ – signifikantně se liší od kontroly (jednocestná ANOVA s Dunettovým post hoc testem).

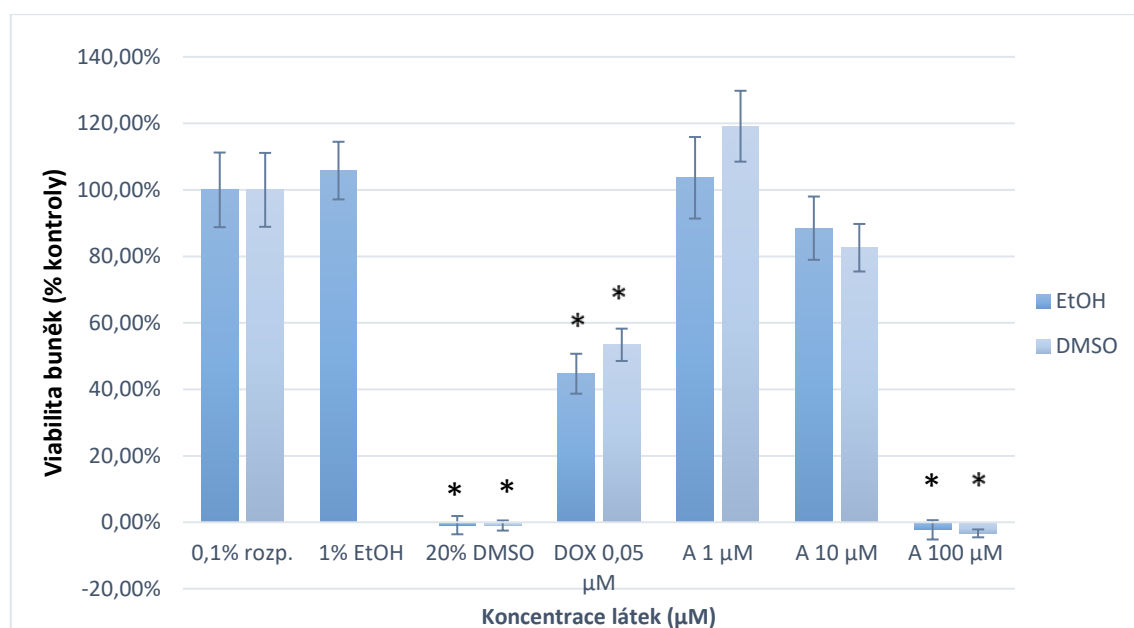
5.2 Stanovení cytotoxicity látek

Pokusy s látkami byly provedeny v několika opakováních. S látkami rozpuštěnými v ethanolu byly provedeny dva pokusy v koncentracích 1, 10 a 100 μM . U látek, které při těchto pokusech vykazovaly cytotoxický efekt, byl proveden další pokus s koncentracemi 1, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 μM . S látkami rozpuštěnými v DMSO byl experiment s koncentracemi 1, 10 a 100 μM zopakován jednou, dvakrát pouze s látkami A, B a C. S látkami A, B, C a E rozpuštěnými v DMSO byl také zopakován experiment v koncentracích 1, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 μM . Experimenty s některými deriváty byly provedeny pouze jednou, z důvodu omezení kvůli pandemii Covid-19, a kvůli mé účasti na programu Erasmus+.

Výsledky jsou zobrazeny pomocí grafu životaschopnosti buněk v závislosti na koncentraci látek. Výsledek kontrolních vzorků je považován za 100 %, ostatní výsledky jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku s odpovídající koncentrací rozpouštědla. Ve sloupci 1 % EtOH jsou zobrazeny pouze výsledky látek rozpuštěných v ethanolu.

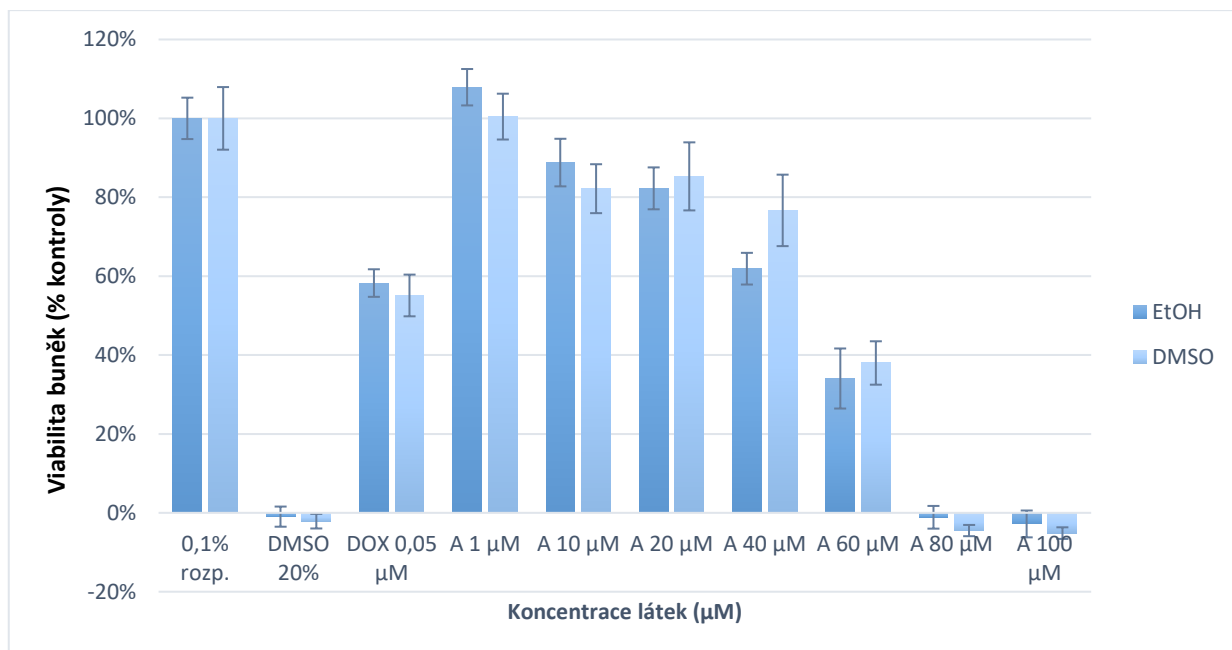
5.2.1 Derivát A

Z Obrázku 10 je patrné, že látka A vykazuje v koncentraci 100 μM silný cytotoxický účinek, určitý malý pokles životaschopnosti buněk lze sledovat i při koncentraci 10 μM . Proto byly provedeny další pokusy s podrobnějším odstupňováním koncentrací.

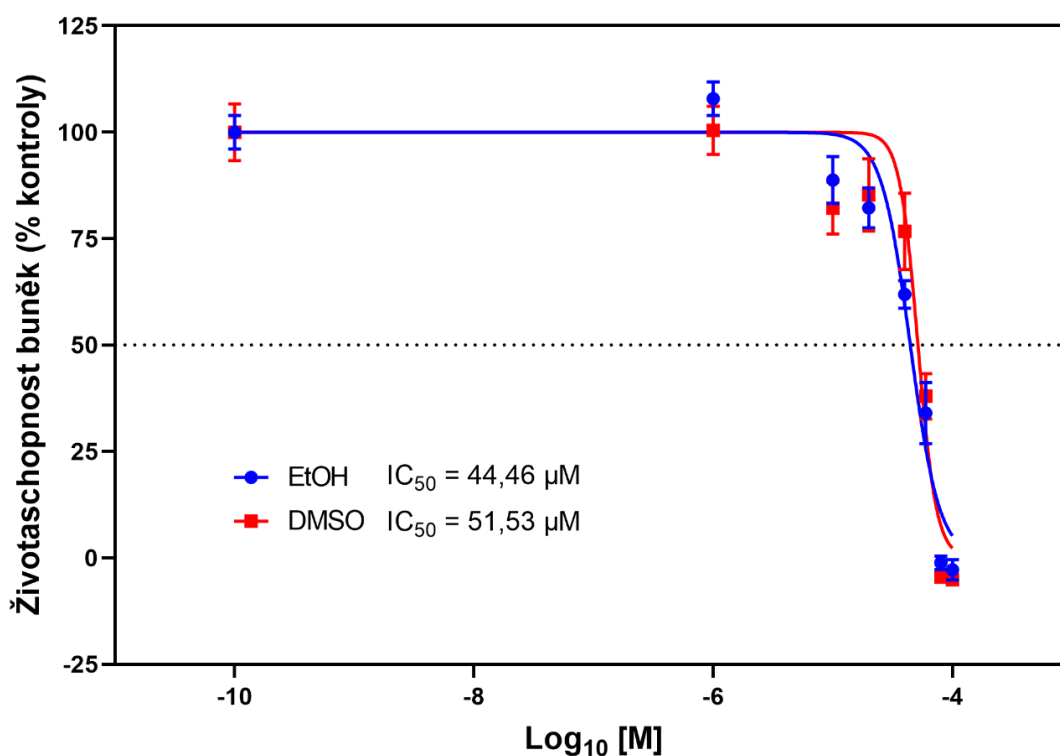


Obrázek 10 Vliv látky A na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace – pilotní experiment. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD ze dvou experimentů. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μM doxorubicin (DOX). * $p < 0,05$ – signifikantně se liší od kontroly (jednocestná ANOVA s Dunettovým post hoc testem).

Ze získaných výsledků vyplývá, že látka A má silně cytotoxický účinek již při koncentraci 80 μM , v nižších koncentracích je tento účinek slabší nebo téměř žádný (Obrázek 11). Z těchto výsledků pak byla spočítána IC_{50} , která pro tuto látku činí při rozpuštění v ethanolu 44,46 μM , při rozpuštění v DMSO 51,53 μM . Výsledky pro látky rozpuštěné v ethanolu a v DMSO se liší pouze minimálně (Obrázek 12).



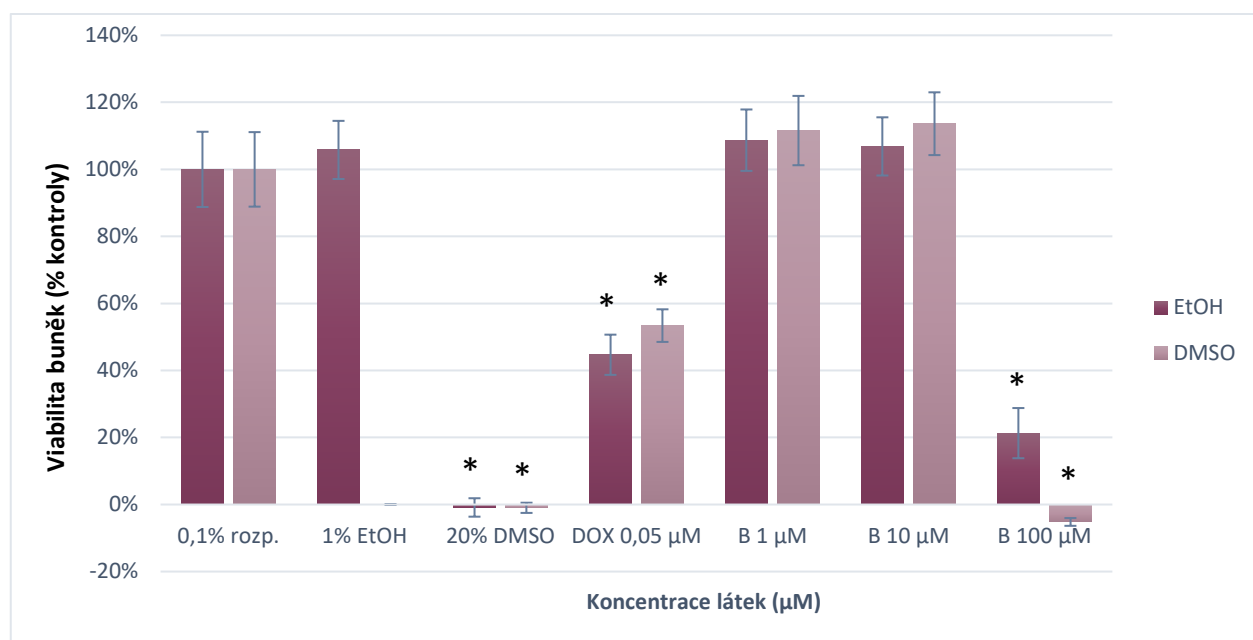
Obrázek 11 Vliv látky A na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD z jednoho experimentu. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX).



Obrázek 12 Stanovení IC_{50} látky A bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9 jako průměr ze dvou experimentů.

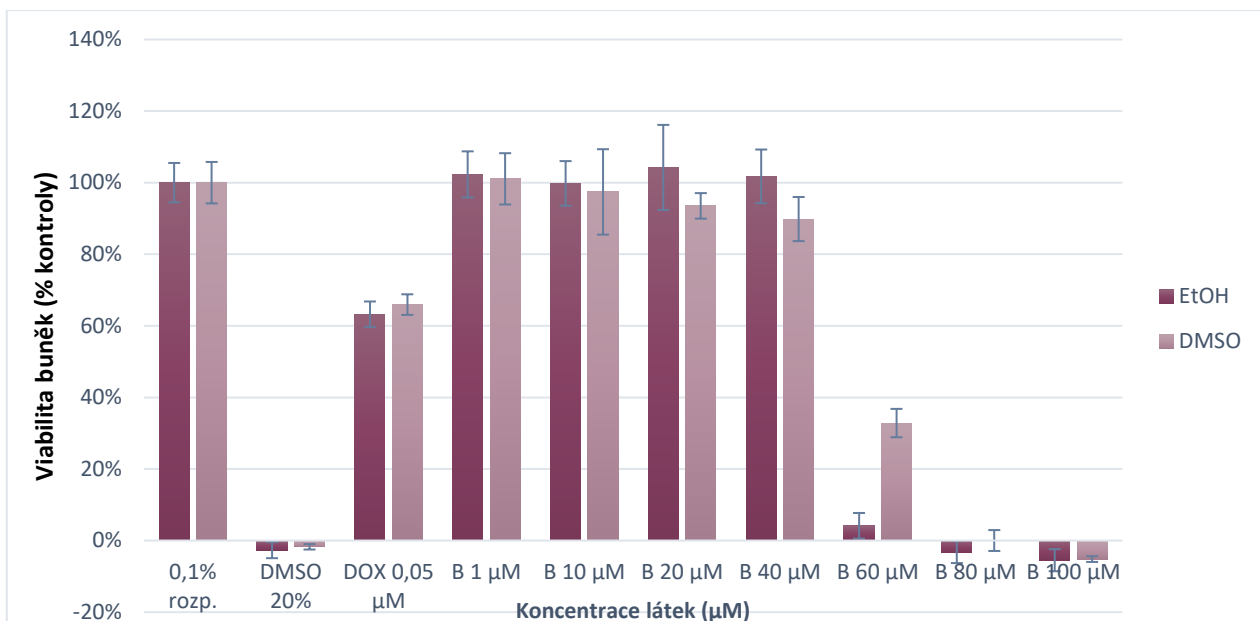
5.2.2 Derivát B

Látka B vykazuje při koncentraci 100 μM cytotoxický účinek, i když se u pokusů s látkami rozpuštěnými v ethanolu výsledky liší. V koncentracích 10 a 1 μM cytotoxický účinek nebyl pozorován, naopak životaschopnost buněk byla o něco vyšší než v kontrolním vzorku (Obrázek 13). I u této látky byly provedeny pokusy v dalších koncentracích.

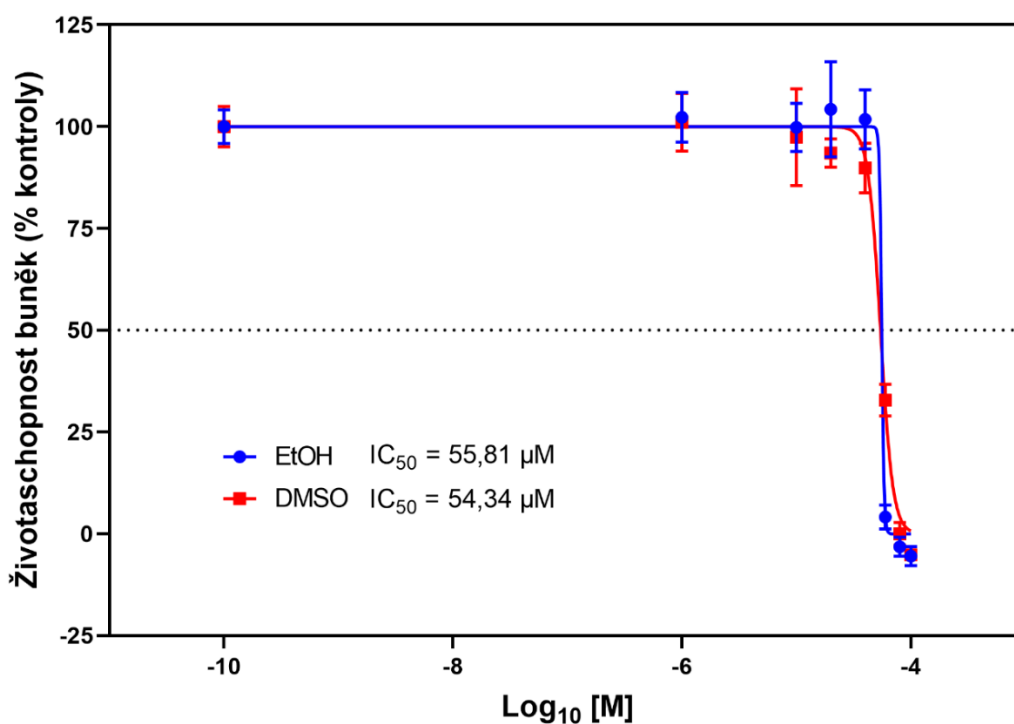


Obrázek 13 Vliv látky B na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace – pilotní experiment. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD ze dvou experimentů. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μM doxorubicin (DOX). * $p < 0,05$ – signifikantně se liší od kontroly (jednocestná ANOVA s Dunettovým post hoc testem).

U látky B nastupuje cytotoxický účinek částečně při koncentraci 60 μM , úplně pak při koncentraci 80 μM . V ostatních koncentracích nebyl pozorován žádný účinek (Obrázek 14). IC_{50} látky B odpovídá při rozpuštění v ethanolu koncentraci 55,81 μM , při rozpuštění v DMSO koncentraci 54,34 μM (Obrázek 15). Výsledky látek rozpuštěných v ethanolu a DMSO si jsou velmi podobné, pouze v koncentraci 60 μM má látka rozpuštěná v ethanolu vyšší účinek.



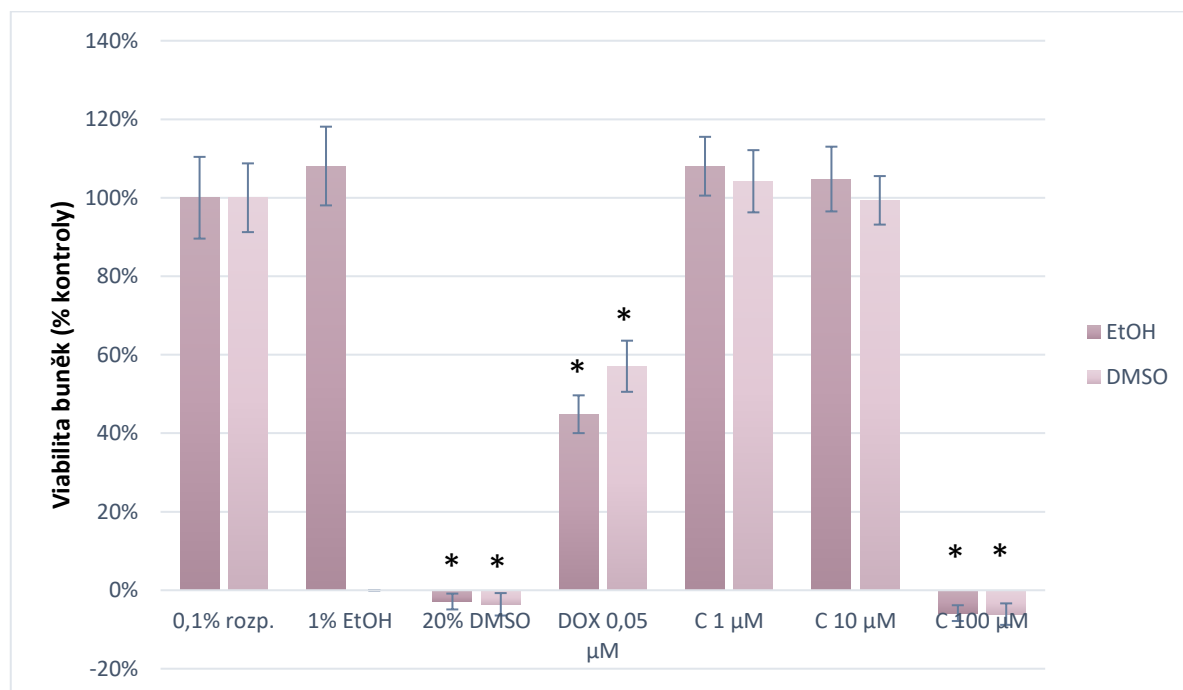
Obrázek 14 Vliv látky B na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD z jednoho experimentu. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX).



Obrázek 15 Stanovení IC_{50} látky B bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9 jako průměr ze dvou experimentů.

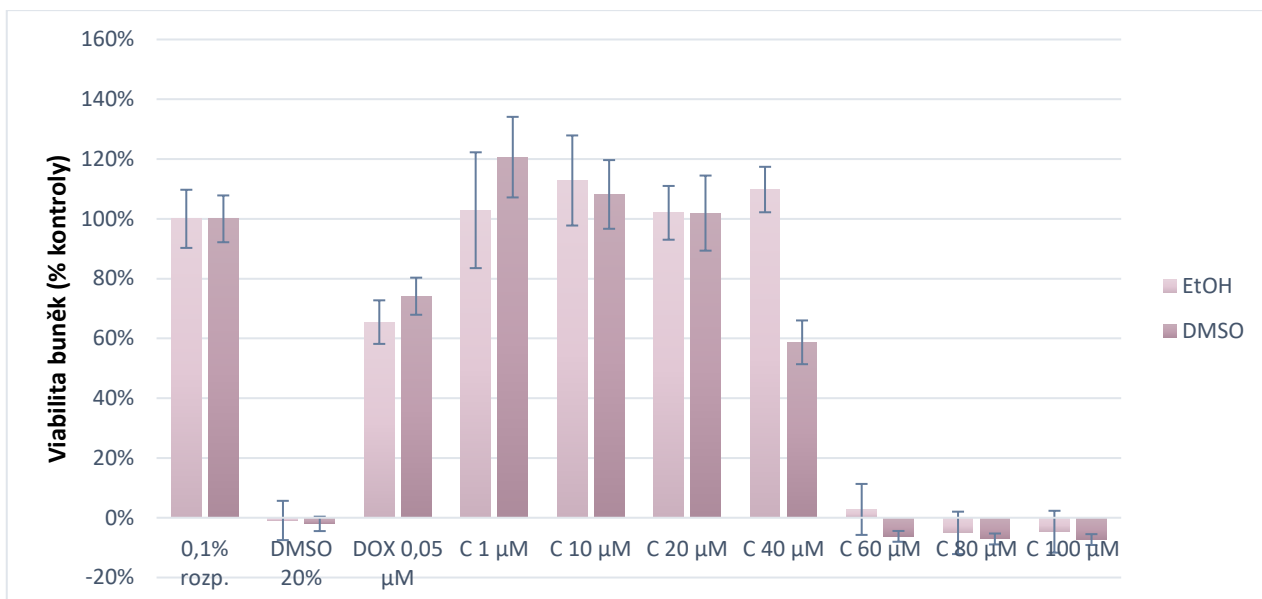
5.2.3 Derivát C

Látka C je směsí látek A a B, proto není překvapivé, že výsledky jsou velmi podobné jako u pokusů s těmito látkami (Obrázek 16). Také s látkou C byly provedeny další pokusy pro stanovení IC_{50} .

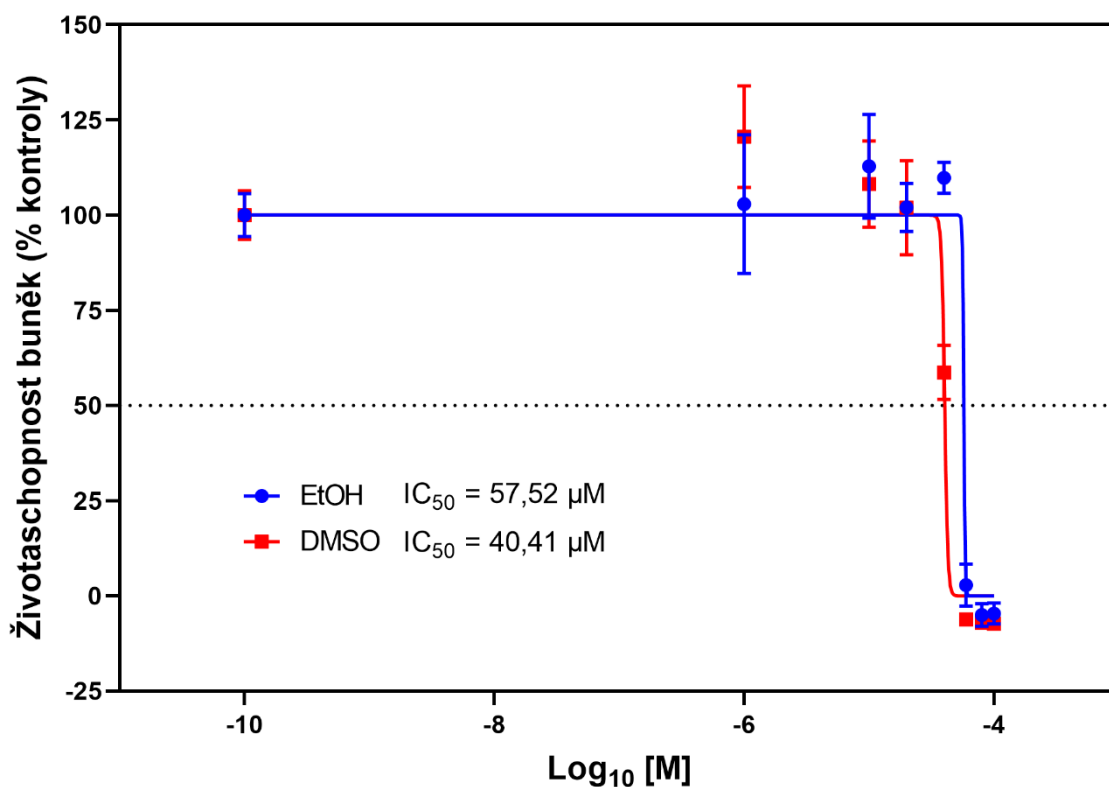


Obrázek 16 Vliv látky C na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace – pilotní experiment. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD ze dvou experimentů. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX). * $p < 0,05$ – signifikantně se liší od kontroly (jednocestná ANOVA s Dunettovým post hoc testem).

Látka C má silnější cytotoxické účinky než látky A a B, životnost buněk klesla k nule již při koncentraci 60 μ M, v nižších koncentracích tento efekt ale nemá, pouze částečně při rozpuštění v DMSO v koncentraci 40 μ M (Obrázek 17). IC_{50} pro látku C je při rozpuštění v ethanolu 57,52 μ M, při rozpouštění v DMSO pak 40,41 μ M, což je nejméně ze všech testovaných látek (Obrázek 18). Látka C je tedy ze zkoumaných látek neúčinnější.



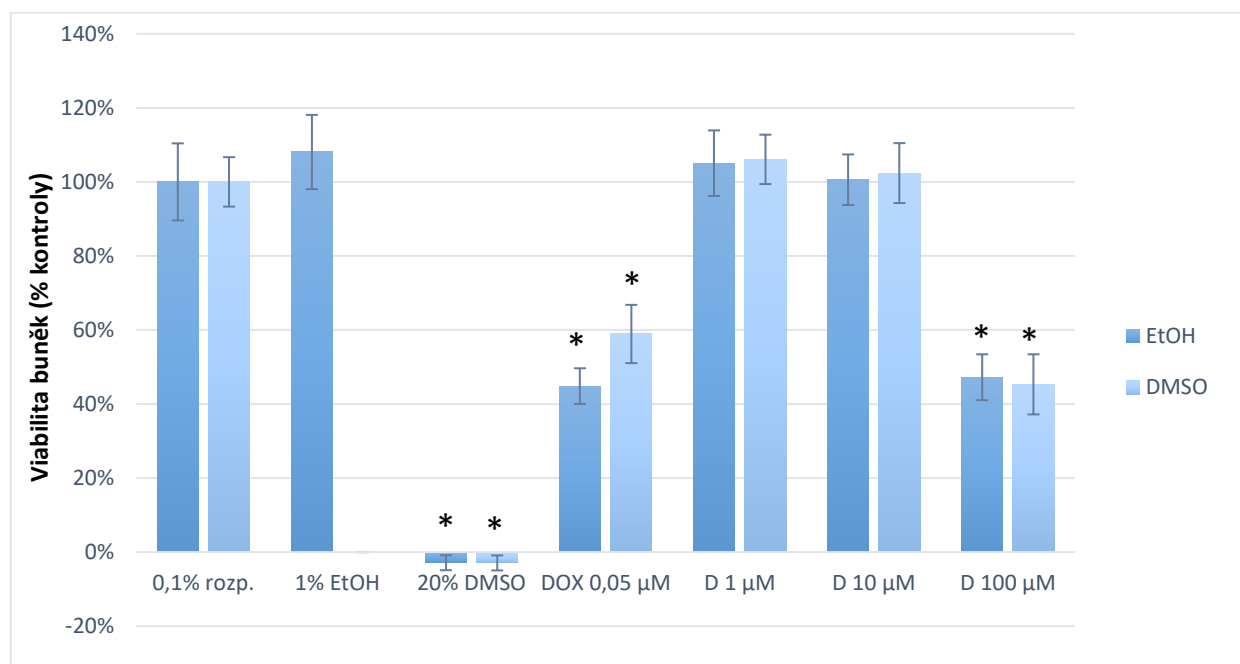
Obrázek 17 Vliv látky C na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD z jednoho experimentu. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX).



Obrázek 18 Stanovení IC_{50} látky C bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9 jako průměr ze dvou experimentů.

5.2.4 Derivát D

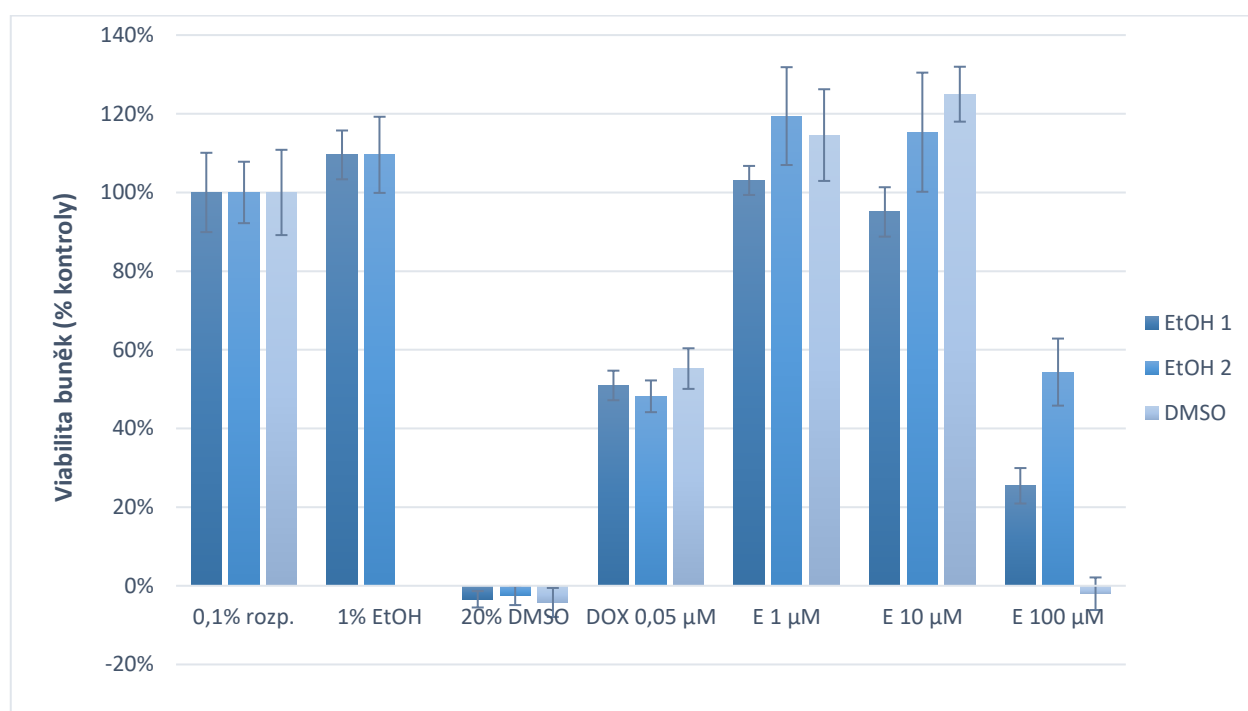
Cytotoxický účinek látky D není příliš silný, i v nejvyšší koncentraci dosahovala viabilita buněk kolem 50 %, v nižších koncentracích neměla tato látka žádný účinek (Obrázek 19). Proto nebyly provedeny žádné další pokusy.



Obrázek 19 Vliv látky D na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace – pilotní experiment. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD ze dvou experimentů. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX). * $p < 0,05$ – signifikantně se liší od kontroly (jednocestná ANOVA s Dunettovým post hoc testem).

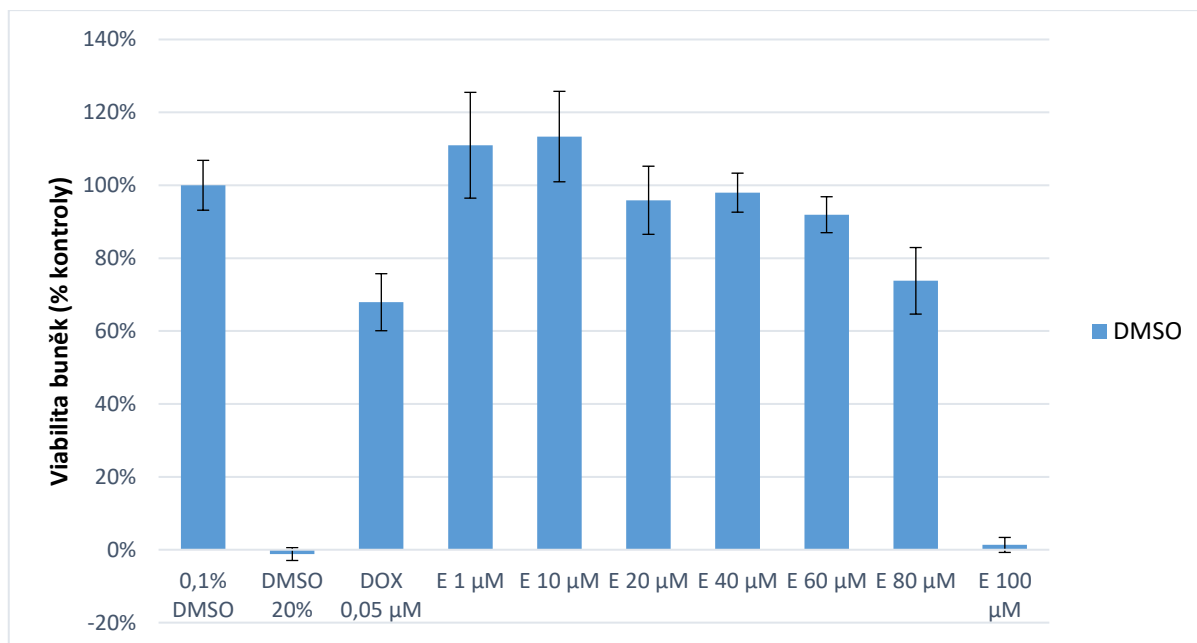
5.2.5 Derivát E

U látky E se ukázalo jako problematické její rozpouštění v ethanolu. Jak je z Obrázku 20 patrné, při prvním pokusu s látkami v ethanolu byla viabilita buněk při koncentraci 100 μM 25 %, při druhém pokusu již dosahovala 54 %. Příčinou byla tvorba krystalů látky E, a tím pokles její koncentrace v roztoku. Při pokusu s látkami rozpuštěnými v DMSO byla v nejvyšší koncentraci viabilita buněk nulová, proto byl proveden pokus s dalšími koncentracemi, tentokrát pouze s látkami rozpuštěnými v DMSO.

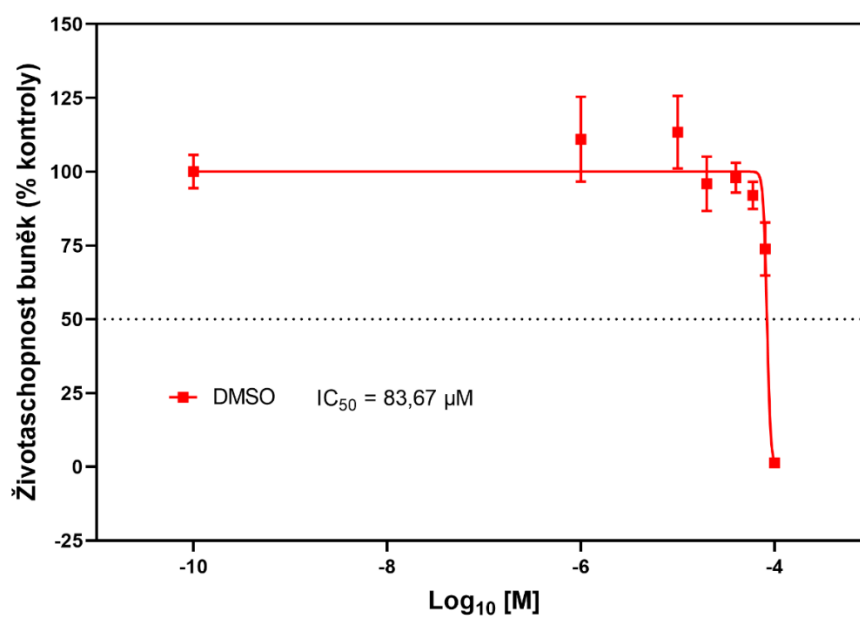


Obrázek 20 Vliv látky E na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace – pilotní experiment. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD z jednoho experimentu. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μM doxorubicin (DOX).

Cytotoxický účinek se prokázal pouze u koncentrace 100 μM a v malé míře u 80 μM . Při nejnižších koncentracích byla viabilita dokonce vyšší než v kontrolním vzorku (Obrázek 21). IC_{50} látky E je při rozpouštění v DMSO 83,67 μM (Obrázek 22).



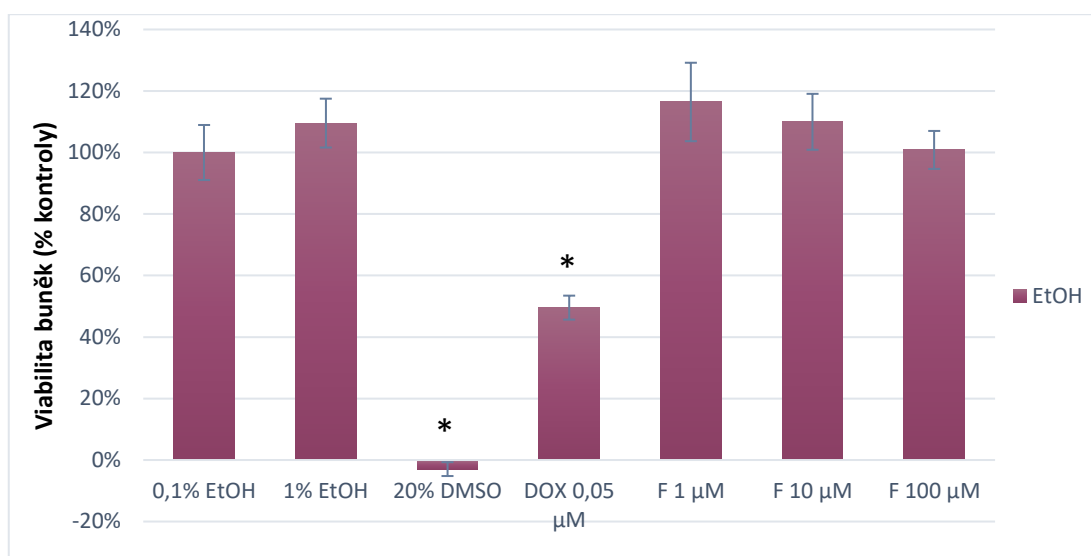
Obrázek 21 Vliv látky E na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD z jednoho experimentu. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX).



Obrázek 22 Stanovení IC_{50} látky E bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9 jako průměr z jednoho experimentu.

5.2.6 Derivát F – naringenin

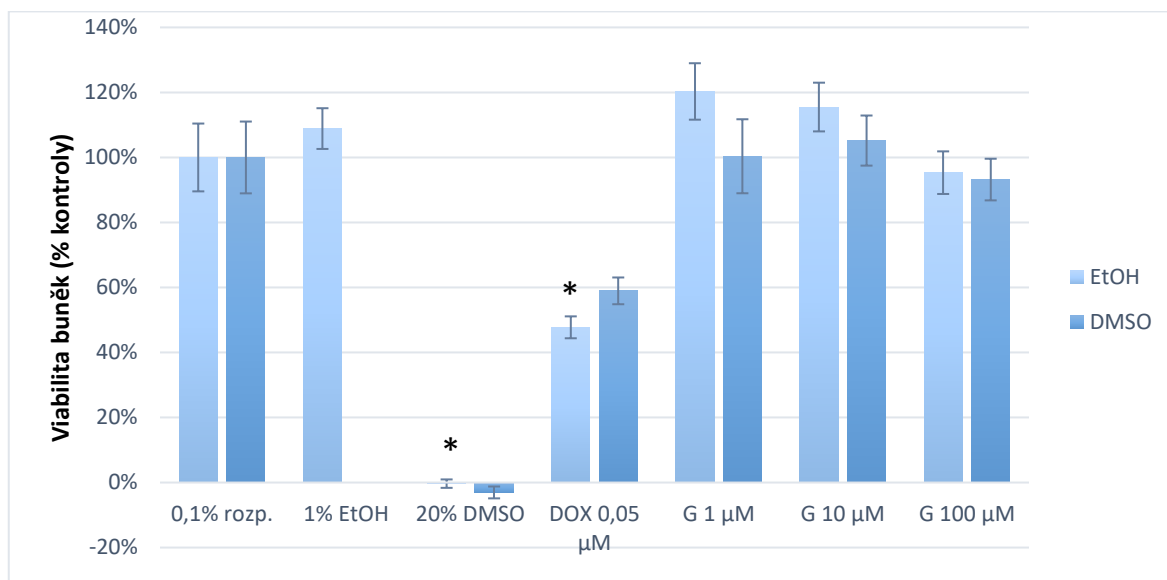
Látka F neměla v žádné koncentraci cytotoxický účinek, životnost buněk byla ve všech koncentracích vyšší než v kontrolním vzorku, proto nebyly provedeny žádné další pokusy (Obrázek 23).



Obrázek 23 Vliv látky F na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace – pilotní experiment. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD ze dvou experimentů. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX). * $p < 0,05$ – signifikantně se liší od kontroly (jednocestná ANOVA s Dunettovým post hoc testem).

5.2.7 Derivát G

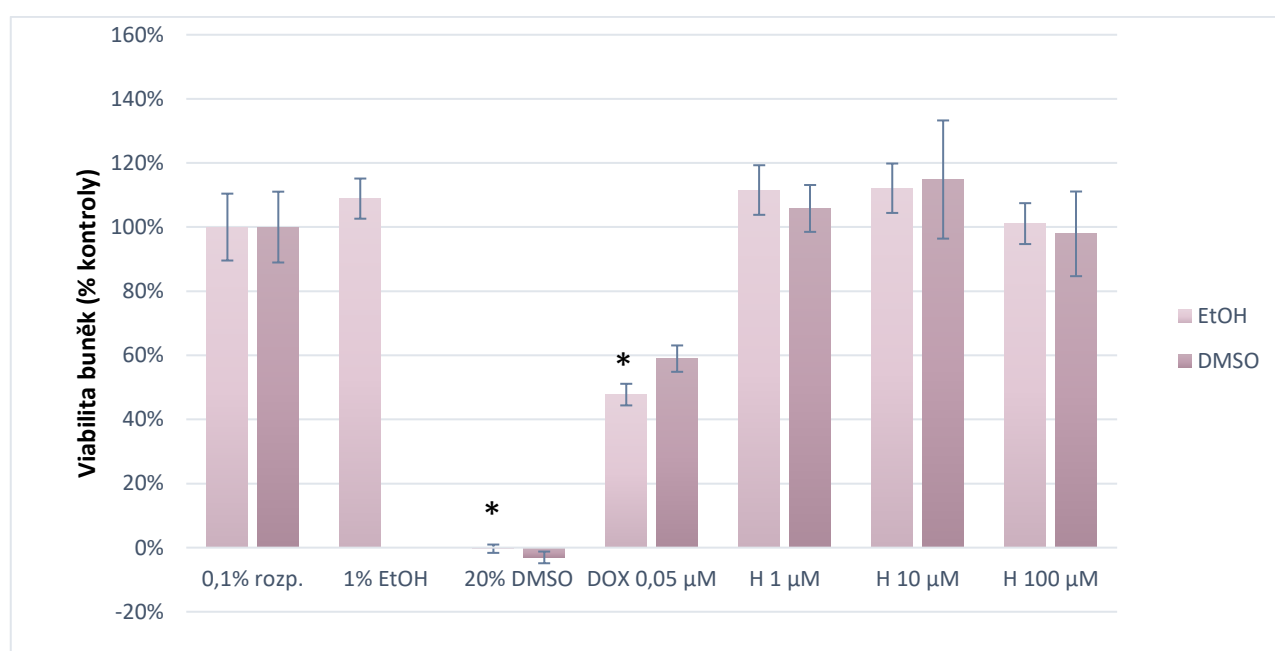
Také u látky G se cytotoxický účinek neprokázal, viabilita buněk byla stejná nebo vyšší než u kontrolních vzorků (Obrázek 24).



Obrázek 24 Vliv látky G na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace – pilotní experiment. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD z jednoho (DMSO) nebo dvou (EtOH) experimentů. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX). * $p < 0,05$ – signifikantně se liší od kontroly (jednocestná ANOVA s Dunettovým post hoc testem).

5.2.8 Derivát H

Viabilita buněk ovlivněných látkou H přesahovala ve většině případů 100 %, v jednom z pokusů dosahovala ve všech koncentracích téměř 120 %. Tato látka tedy nemá v těchto koncentracích žádný cytotoxický účinek. Vzhledem k nízké cytotoxické aktivitě látky H a velmi podobným výsledkům při rozpouštění v ethanolu i DMSO již nebyl proveden druhý pokus s látkou rozpuštěnou v DMSO (Obrázek 25).



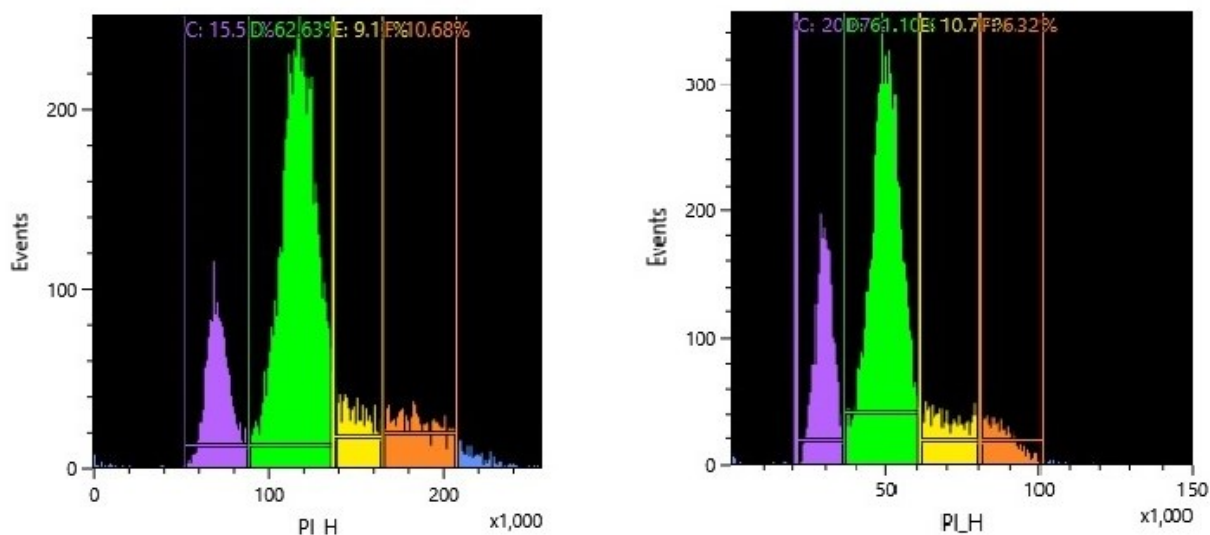
Obrázek 25 Vliv látky H na životaschopnost buněk SW480 po 72 hodinách inkubace – pilotní experiment. Viabilita buněk byla stanovena pomocí testu s neutrální červení. Data uváděná jako procenta kontroly (= 100 %) představují průměr \pm SD z jednoho (DMSO) nebo dvou (EtOH) experimentů. Jako negativní kontrola byl použit 20% DMSO a 0,05 μ M doxorubicin (DOX). * $p < 0,05$ – signifikantně se liší od kontroly (jednocestná ANOVA s Dunettovým post hoc testem).

5.3 Vliv na buněčný cyklus

Měření na průtokovém cytometru bylo provedeno za účelem zjištění, zda látky, které měly v předchozích pokusech cytotoxický účinek, působí na buněčný cyklus. Měření bylo provedeno ve dvou opakováních, použity byly látky A, B, C a E rozpuštěné v DMSO v koncentracích blízkých vypočítané IC_{50} – pro látky A a B 50 μ M, pro látku C 40 μ M a pro látku E 90 μ M. Jako kontrola byl použit 0,1 % DMSO.

5.3.1 DMSO

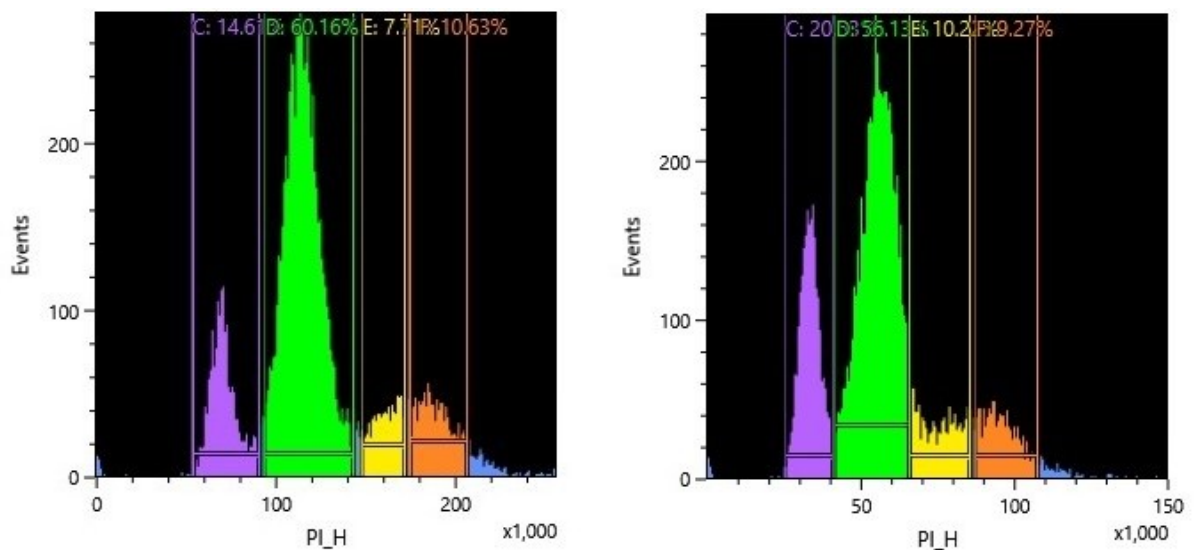
Z výsledků kontrolního vzorku je patrné, že se většina, přibližně 60 %, buněk nachází ve fázi G_0/G_1 . Ve fázích S a G_2/M se nachází menší část buněk, v každé z těchto fází je to přibližně 10 % nebo méně buněk. Relativně vysoký je peak pro sub- G_0/G_1 fázi, zde je 15-20 % buněk (Obrázek 26). Buňky v tomto peaku mohou být pouze fragmenty buněk, které prošly apoptózou či nekrózou.



Obrázek 26 Analýza buněčného cyklu – kontrolní vzorek. Buňky byly inkubovány s DMSO 0,1% při 37°C po dobu 72 hodin. Buňky byly fixovány a obarveny propidium jodidem. Fialová barva představuje fázi sub G_0/G_1 , zelená barva fázi G_0/G_1 , žlutá barva fázi S, oranžová barva fázi M a modrá barva značí shluky buněk. Záznam ze dvou provedených experimentů.

5.3.2 Derivát A

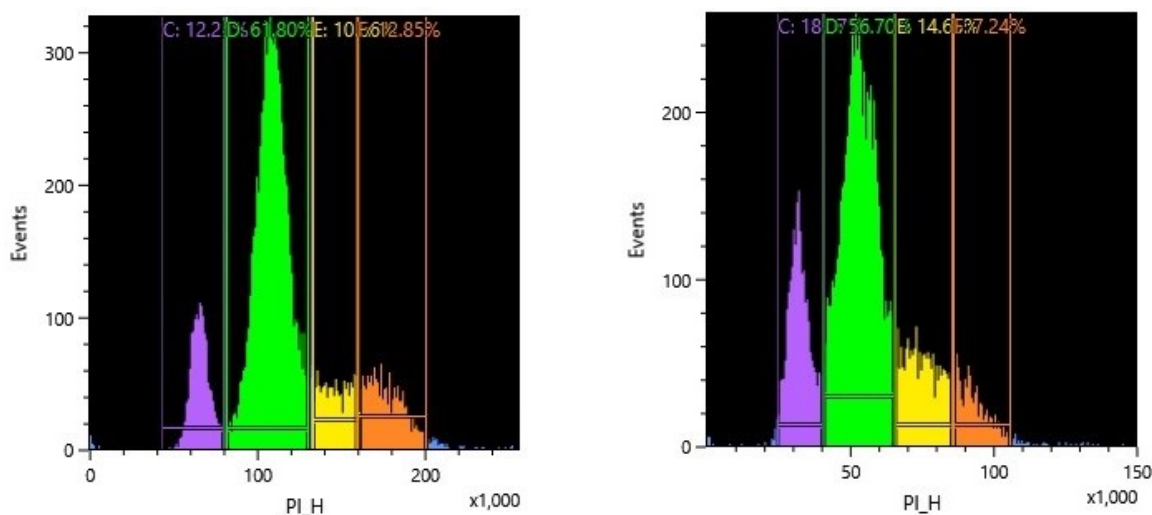
Cytometrické měření buněk ovlivněných látkou A v koncentraci 50 μM má velmi podobné výsledky jako kontrolní vzorek, většina buněk je ve fázi G_0/G_1 , ve fázích S a G_2/M je přibližně po 10 % buněk. Asi pětina buněk je v sub- G_0/G_1 fázi (Obrázek 27).



Obrázek 27 Vliv látky A v koncentraci odpovídající hodnotě IC_{50} na buněčný cyklus buněk SW480. Buňky byly inkubovány s látkou A v koncentraci 50 μM při 37°C po dobu 72 hodin. Buňky byly fixovány a obarveny propidium jodidem. Záznam ze dvou provedených experimentů.

5.3.3 Derivát B

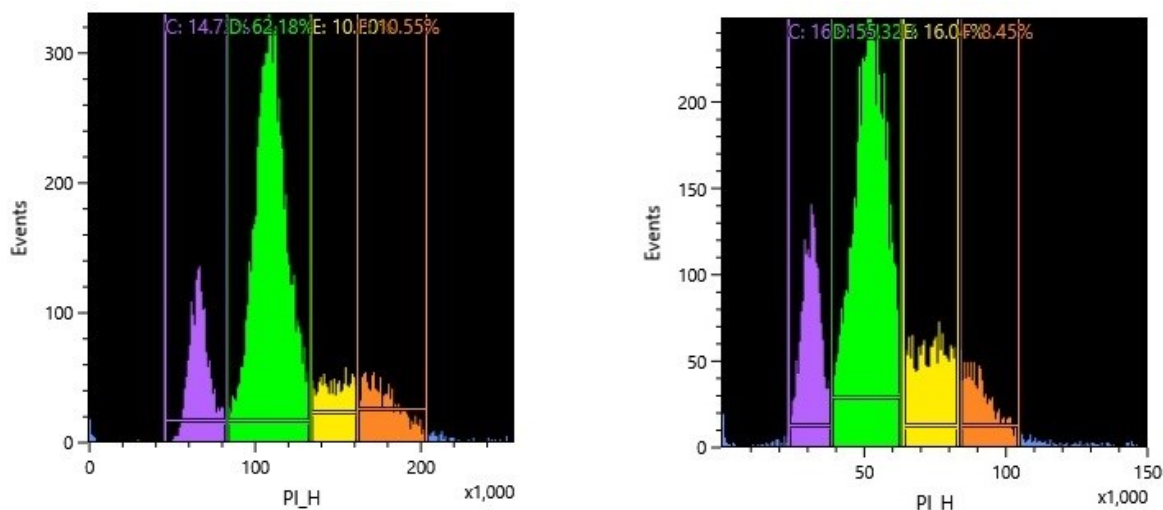
Výsledky látky B jsou také podobné kontrole, ve fázi S se nachází o něco větší procento buněk, v jednom z měření nad 14 %, ve fázi G₂/M je pak téměř 13 a 7 % buněk. Peak pro sub-G₀/G₁ je opět relativně vysoký, nachází se v něm 12 a 18 % buněk (Obrázek 28).



Obrázek 28 Vliv látky B v koncentraci odpovídající hodnotě IC₅₀ na buněčný cyklus buněk SW480. Buňky byly inkubovány s látkou B v koncentraci 50 μM při 37°C po dobu 72 hodin. Buňky byly fixovány a obarveny propidium jodidem. Záznam ze dvou provedených experimentů.

5.3.4 Derivát C

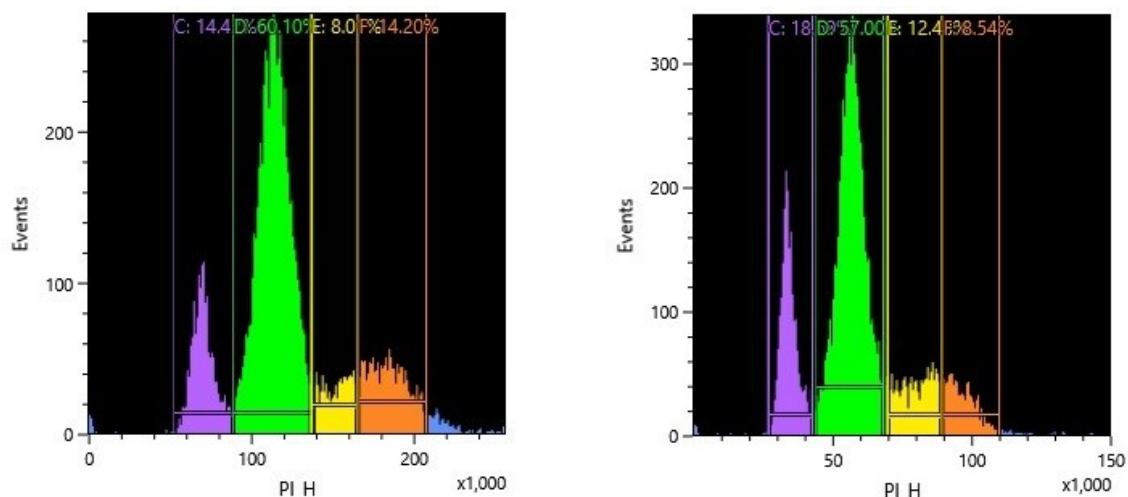
U látky C je opět většina buněk v G₀/G₁ fázi, počet buněk ve fázích S a G₂/M se v jednotlivých měřeních liší, v jednom je v každé z fází asi 10 % buněk, ve druhém je ve fázi S 16 % buněk a v G₂/M asi 8 % buněk. Část buněk v sub-G₀/G₁ je o něco nižší než u ostatních látek, ale ne výrazně, průměrně se v této fázi nachází 15 % buněk (Obrázek 29).



Obrázek 29 Vliv látky C v koncentraci odpovídající hodnotě IC_{50} na buněčný cyklus buněk SW480. Buňky byly inkubovány s látkou C v koncentraci $40 \mu\text{M}$ při 37°C po dobu 72 hodin. Buňky byly fixovány a obarveny propidium jodidem. Záznam ze dvou provedených experimentů.

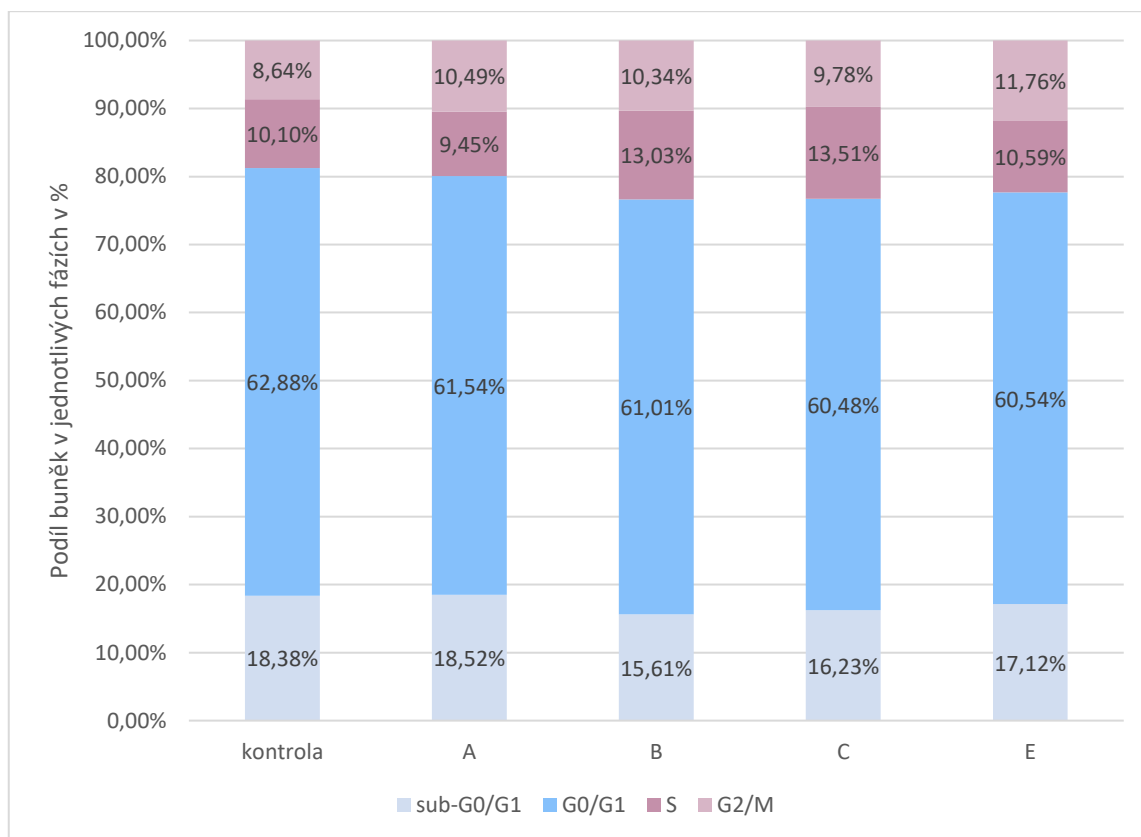
5.3.5 Derivát E

Látka E má podobné výsledky jako předchozí látky, podíl buněk ve fázi G_0/G_1 se pohybuje okolo 60 %, ve fázích S a G_2/M kolem 10 %, v sub- G_0/G_1 se nachází 14 a 18 % buněk (Obrázek 30).



Obrázek 30 Vliv látky E v koncentraci odpovídající hodnotě IC_{50} na buněčný cyklus buněk SW480. Buňky byly inkubovány s látkou E v koncentraci $90 \mu\text{M}$ při 37°C po dobu 72 hodin. Buňky byly fixovány a obarveny propidium jodidem. Záznam ze dvou provedených experimentů.

V Obrázku 31 je shrnuto působení všech látek na buněčný cyklus v buňkách SW480.



Obrázek 31 Shrnutí působení látek A, B, C a E na buněčný cyklus. Data uváděná jako podíl buněk v jednotlivých fázích v % představují průměr ze dvou experimentů.

6 Diskuze

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí v České republice, na nádorová onemocnění umírá téměř každý čtvrtý člověk, a jejich incidence stoupá. Mezi nejrozšířenější nádory patří kolorektální karcinom. Při léčbě kolorektálního karcinomu se nejčastěji využívá chirurgických metod, dále se využívá chemoterapie, radioterapie a cílená biologická léčba, nebo kombinace těchto metod. Kvůli častým nežádoucím účinkům a možné rezistenci nádorových buněk k léčbě je stále snaha najít nové možnosti léčby (ÚZIS 2020, Diviš et al. 2016).

Prenylflavonoidy jsou sekundární metabolity některých druhů rostlin, které vykazují různé biologické účinky. Vychází ze struktury flavonoidů, na kterou je navázán jeden nebo více prenylových řetězců. Prenylací flavonoidů se mění vlastnosti těchto látek, zvyšuje se jejich lipofilita, transport přes membrány a biologická aktivita. U některých prenylflavonoidů byla prokázána protinádorová aktivita (Venturelli et al., 2016).

V této práci bylo cílem studovat možnou antiproliferativní aktivitu semisyntetických prenylovaných derivátů naringeninů, připravených Dr. Hubertem Chapui a Jakubem Kernalem na University of Lorraine. Naringenin je flavanon, který se v přírodě nachází především v citrusových plodech, jeho deriváty 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin vznikají při vaření piva z desmethylxanthohumolu (Venturelli et al. 2016). Naringenin vykazuje antioxidační a protinádorovou aktivitu (Arafah et al. 2020), prenylované deriváty naringeninů, 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin, mají také protinádorový účinek (Venturelli et al. 2016).

Výhodou prenylflavonoidů je také nízká cytotoxicita v nenádorových buňkách, a z toho plynoucí menší množství nežádoucích účinků (Karabín et al. 2012). Xanthohumol 100 μM nepůsobil v kultuře primárních lidských hepatocytů

cytotoxicky (Weiskirchen et al. 2015). Cytotoxicita naringeninu, isoxanthohumolu a 8-prenylnaringeninu v lidských nenádorových liniích MCF-10A a diferencovaných CaCo-2 byla velmi nízká s hodnotami IC_{50} přesahujícími 100 μM (Ambrož et al. 2019, Bartmaňska et al. 2018).

Antiproliferativní účinek prenylovaných derivátů naringeninu byl testován na buněčné linii SW480, která pochází z kolorektálního karcinomu ve III/IV stádiu. Buněčná linie kolorektálního karcinomu byla vybrána, protože nejpravděpodobnější cestou podání prenylflavonoidů je *per os*. Lze tedy předpokládat, že prenylflavonoidy se dostanou do kontaktu s buňkami tlustého střeva v poměrně vysoké koncentraci. Pro hodnocení viability buněk byl použit NRU test. Testované látky byly pro první pokusy rozpuštěny v ethanolu, ale kvůli špatné rozpustnosti některých látek, případně jejich krystalizaci při pokusech, byly pro další pokusy použity látky rozpuštěné v DMSO.

U čtyř z testovaných prenylovaných derivátů naringeninu (A, B, C a E) se při pilotních pokusech s koncentracemi 1, 10 a 100 μM prokázala cytotoxická aktivita, u látky D byl pokles viability buněk jen velmi malý nebo žádný. U naringeninu nebyla pro tuto buněčnou linii v žádném ze vzorků (F, G, H) ve zkoumaných koncentracích prokázána cytotoxická aktivita. Výsledky pokusů s naringeninem se shodují s výsledky jiných studií. Ambrož et al. (2019) uvádí IC_{50} naringeninu v buněčných liniích SW480 a SW620 vyšší než 200 μM , podle Chidambara Murthy et al. (2012) nebyla prokázána antiproliferační aktivita naringeninu v linii SW480 v koncentracích do 200 μM . V jiných buněčných liniích se ale cytotoxický efekt naringeninu prokázal, například Lim et al. (2017) prokázali cytotoxicitu naringeninu v koncentracích nad 50 μM v buněčných liniích PC3 a LNCaP odvozených z nádoru prostaty, a podle Frydoonfar et al. (2003) naringenin signifikantně inhiboval proliferaci linie HT-29 odvozené od kolorektálního karcinomu v koncentraci nad 0,71 mmol. Kocyigit et al. (2016) stanovili IC_{50} naringeninu v buněčné linii HT-29 na 870 μM . Cytotoxicita

naringenin je tedy v buněčných liniích odvozených z kolorektálního karcinomu slabá.

U látek A, B, C a E byla dále určena hodnota IC_{50} . Látky A a B jsou izomery, látka C je pak směsí těchto izomerů. IC_{50} pro látky A, B a C se pohybuje kolem $50 \mu\text{M}$, mírně se mezi sebou liší výsledky u látek rozpuštěných v ethanolu a DMSO. Nejvyšší účinnost měla látka C rozpuštěná v DMSO, pro kterou byla vypočítaná IC_{50} $40,41 \mu\text{M}$. Pro látku E byla IC_{50} stanovena na $83,67 \mu\text{M}$. Ve srovnání s jinými prenylovanými deriváty naringenu, 6-prenylnaringeninem a 8-prenylnaringeninem, mají tyto látky v linii SW480 srovnatelnou nebo nižší účinnost. Podle Ambrože et al. (2019) byla v linii SW480 IC_{50} 6-prenylnaringenu $14,8 \mu\text{M}$, pro 8-prenylnaringenin to bylo $56,3 \mu\text{M}$.

Cytometrické měření bylo provedeno za účelem zjištění, zda testované látky ovlivňují buněčný cyklus. Některé prenylflavonoidy mají schopnost buněčný cyklus zastavit ve fázi G1 (Wang et al. 2017), jiné, například xanthohumol, jej mohou zastavit ve fázi G2/M (Liu et al. 2019). Z výsledků měření nelze vliv testovaných látek na buněčný cyklus potvrdit, výsledky všech vzorků byly srovnatelné s kontrolním vzorkem. Ve všech vzorcích včetně kontroly byl relativně velký podíl buněk v sub-G0/G1 fázi, což mohou být části buněk po apoptóze či nekróze, nedá se ale říct, jaký vliv mají testované látky. Vzhledem k tomu, že se buňky v sub-G0/G1 fázi nacházely v kontrolním vzorku v podobné koncentraci jako ve vzorcích s látkami, se může jednat o vlastnost buněčné linie.

7 Závěr

Výsledky dosažené během řešení této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- V pilotních experimentech s koncentracemi 1, 10 a 100 μM byl v buněčné linii SW480 prokázán cytotoxický účinek látek A, B C a E, u ostatních testovaných látek se v použitých koncentracích cytotoxický účinek neprojevil.
- Pro látky A, B, C a E byla stanovena IC_{50} . Pro látky A a B se hodnota IC_{50} pohybovala kolem 50 μM , u látky E to bylo 83,67 μM . Nejsilnější cytotoxický účinek se projevil u látky C, což je směs izomerů A a B, pro kterou byla IC_{50} vypočítána na 40,41 μM .
- Vliv látek A, B, C a E na buněčný cyklus nebyl pomocí průtokové cytometrie prokázán.

8 Seznam zkratek

ATCC – American Type Culture Collection

BSA – hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)

COX 1 a 2 – cyklooxygenáza 1 a 2

CT – počítačová tomografie

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimethylsulfoxid

DOX – doxorubicin

EGFR – epidermální růstový faktor

FBS – fetální bovinní sérum

FGF – fibroblastový růstový faktor

HEPES – pufr, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina

HER-2 - lidský epidermální receptor 2

HRT – hormonální substituční terapie

IC₅₀ – střední inhibiční koncentrace

iNOS – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého

MHC I – hlavní histokompatibilní komplex třídy I

MRI – magnetická rezonance

NF-κB – nukleární faktor kappa B

NRU – test uptake neutrální červeně

PBS – fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)

PI/RNase – propidium jodid a ribonukleasa

RTG – rentgen

TOKS – test okultního krvácení ze stolice

USPSTF - U.S. Preventive Services Task Force

ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor

9 Použitá literatura

Ahmed D., Eide P.W., Eilertsen I.A., Danielsen S.A., Eknæs M., Hektoen M., Lind G.E., Lothe R.A. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013; 2(9):e71.

Akkoca A.N., Yanik S., Ozdemir Z.T., Cihan F.G., Sayar S., Cincin T.G., Cam A., Ozer C. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(9):2828-35.

Ambrož M., Lněničková K., Matoušková P., Skálová L., Boušová I. Antiproliferative Effects of Hop-derived Prenylflavonoids and Their Influence on the Efficacy of Oxaliplatin, 5-fluorouracil and Irinotecan in Human Colorectal C Cells. *Nutrients*. 2019; 11(4):879.

Arafah A., Rehman M.U., Mir T.M., Wali A.F., Ali R., Qamar W., Khan R., Ahmad A., Aga S.S., Alqahtani S., Almatroudi N.M. Multi-Therapeutic Potential of Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavone): Experimental Evidence and Mechanisms. *Plants (Basel)*. 2020;9(12):1784.

Astin M., Griffin T., Neal R.D., Rose P., Hamilton W. The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *Br J Gen Pract*. 2011; 61(586):e231-43.

Bartmańska A., Tronina T., Popłoński J., Milczarek M., Filip-Psurska B., Wietrzyk J. Highly Cancer Selective Antiproliferative Activity of Natural Prenylated Flavonoids. *Molecules*. 2018; 23(11):2922.

Bolton J.L., Dunlap T.L., Hajirahimkhan A., Mbachu O., Chen S.N., Chadwick L., Nikolic D., van Breemen R.B., Pauli G.F., Dietz B.M. The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. *Chem Res Toxicol*. 2019; 32(2):222-233.

Brenner H., Chen C. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *Br J Cancer*. 2018; 119(7):785-792.

Brenner H., Kloor M., Pox C.P. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014; 383(9927):1490-1502.

DiPiro J.T., Talbert R.L., Yee G.C., Matzke G.R., Wells B.G., Posey L.M. (eds.) *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 9. vydání. McGraw-Hill, 2014, str. 2159-2192. ISBN 978-0071800532.

Diviš P., Divišová K., Katolická J., Rotnágllová S. Kolorektální karcinom – současný pohled na diagnostiku a léčbu. *Med praxi*. 2016; 13(1):34-38.

Frydoonfar H.R., McGrath D.R., Spigelman A.D. The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid Naringenin. *Colorectal Dis*. 2003; 5(2):149-52.

Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144:646-674.

Hayama T., Hashiguchi Y., Okamoto K., Okada Y., Ono K., Shimada R., Ozawa T., Toyoda T., Tsuchiya T., Inuma H., Nozawa K., Matsuda K. G12V and G12C mutations in the gene KRAS are associated with a poorer prognosis in primary colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2019; 34(8):1491-1496.

Chen X., Mukwaya E., Wong M.S., Zhang Y. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharm Biol*. 2014; 52(5):655-60.

Chidambara Murthy K.N., Kim J., Vikram A., Patil B.S. Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. *Food Chem*. 2012; 132(1):27-34.

Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví. *Chem listy*. 2012; 2012(106):1095-1103.

Kocyigit A., Koyuncu I., Dikilitas M., Bahadori F., Turkkan B. Cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of naringenin-oxime relative to naringenin on normal and cancer cell lines. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2016; 6(10): 872-880.

Koutecký J., *Klinická onkologie I*. 1. vydání. Riopress, 2004, str. 15-19. ISBN 80-86221-77-6.

Lim W., Park S., Bazer F.W., Song G. Naringenin-Induced Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells Is Mediated via the PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways. *J Cell Biochem*. 2017; 118(5):1118-1131.

Liu X., An L.J., Li Y., Wang Y., Zhao L., Lv X., Guo J., Song A.L. Xanthohumol chalcone acts as a powerful inhibitor of carcinogenesis in drug-resistant human colon carcinoma and these effects are mediated via G2/M phase cell cycle arrest, activation of apoptotic pathways, caspase activation and targeting Ras /MEK/ERK pathway. *J BUON*. 2019; 24(6):2442-2447.

Mármol I., Sánchez-de-Diego C., Pradilla Dieste A., Cerrada E., Rodriguez Yoldi M.J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(1):197.

Mukai R. Prenylation enhances the biological activity of dietary flavonoids by altering their bioavailability. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018; 82(2):207-215.

Nešpor J., Hanko V., Karabín M., Jelínek L., Dostálek P. Prenylated flavonoids as valuable biologically active compounds from hops. *Kvasny Prum*. 2017; 63:164–172.

Piawah S., Venook A.P. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2019; 125(23):4139-4147.

Ranger G.S. The role of aspirin in colorectal cancer chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 104:87-90.

Rochette P.J., Bastien N., Lavoie J., Guérin S.L., Drouin R. SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. *J Mol Biol*. 2005; 352(1):44-57.

Šmejkal, K. Cytotoxic potential of C-prenylated flavonoids. *Phytochem Rev*. 2014; 13(1):245–275.

Tronina T., Popłoński J., Bartmańska A. Flavonoids as Phytoestrogenic Components of Hops and Beer. *Molecules*. 2020; 25(18):4201.

Venturelli S., Burkard M., Biendl M., Lauer U.M., Frank J., Busch C. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*. 2016, 32(11-12):1171-1178.

Vokurka M. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 2. vydání. Karolinum, 2008, str. 49-53. ISBN 978-80-246-1561-5.

Wang D., Sun Q., Wu J., Wang W., Yao G., Li T., Li X., Li L., Zhang Y., Cui W., Song S. A new Prenylated Flavonoid induces G0/G1 arrest and apoptosis through p38/JNK MAPK pathways in Human Hepatocellular Carcinoma cells. *Sci Rep*. 2017; 7(1):5736.

Weiskirchen R., Mahli A., Weiskirchen S., Hellerbrand C. The hop constituent xanthohumol exhibits hepatoprotective effects and inhibits the activation of hepatic stellate cells at different levels. *Front Physiol*. 2015; 6:140.

Yang X., Jiang Y., Yang J., He J., Sun J., Chen F., Zhang M., Yang B. Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities, *Trends Food Sci Technol*. 2015; 44(1):93-104.

Zavoral M., Vojtěchová G., Suchánek Š. Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie*. 2013; 7(4):172-175.

Online zdroje:

ATCC – SW480 [SW-480] (ATCC® CCL-228™) [online]. Poslední revize 2016 [cit. 25. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/ccl-228.aspx?geo_country=cz#characteristics>.

ÚZIS – národní onkologický registr, textová a tabulková část pro r. 2017 [online]. Poslední revize 2020 [cit. 13. 2. 2021]. Dostupné z: <<https://www.uzis.cz/index.php?pg=registry-sber-dat--narodni-zdravotni-registry--narodni-onkologicky-registr#publikace>>.