

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra farmakologie a toxikologie



**STUDIUM EXPRESE A TOXICITY DERIVÁTŮ KATECHOLU  
V PRSNÍCH NÁDOROVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Tereza Vyoralová

„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. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

Tímto bych chtěla velmi poděkovat všem, kteří se jakýmkoliv způsobem podíleli na uskutečnění této diplomové práce. Poděkování patří zejména PharmDr. Alejandru Carazovi, Ph.D. za laskavou a odbornou pomoc a cenné rady, a to jednak při práci v laboratoři, tak i při vypracování diplomové práce. V neposlední řadě děkuji také své rodině a přátelům, že mi byli po celou dobu studia oporou.

## **ABSTRAKT**

---

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**

**Studentka:** Tereza Vyoralová

**Školitel:** PharmDr. Alejandro Carazo Ph.D.

**Název diplomové práce:** Studium exprese a toxicity derivátů katecholu v prsních nádorových buněčných liniích

Estrogeny v lidském organismu mají několik důležitých funkcí, mimo jiné hrají významnou roli při vzniku a rozvoji karcinomu prsu. Své účinky uplatňují vazbou na estrogení receptory (ER) a vykazují komplexní spektrum účinků, například regulace reprodukce, menstruačního cyklu, funkce mozku, kostní denzity či mobilizace cholesterolu. Navíc přítomnost a množství ER v prsním karcinomu je v současnosti využíváno jako jeden z nejdůležitějších prediktivních biomarkerů u pacientů trpících tímto onemocněním. Výskyt a aktivita ER koreluje s léčebnou odpovědí karcinomu prsu na hormonální léčbu a s pacientovou prognózou. Navzdory intenzivnímu výzkumu je karcinom prsu stále řazen mezi nádory s nejvyšší letalitou.

Katecholy jsou organické sloučeniny, které se vyskytují v potravě jako polutanty, ale i v lidském organismu, kde hrají důležitou roli jako prekurzory neurotransmiterů. Díky přítomnosti fenolických skupin ve své struktuře jsou katecholy strukturálně podobné polyfenolům. Je známo, že sloučeniny typu polyfenolů mají pozitivní vliv na snížení incidence karcinomu prsu. Přesto doposud nebyl jejich možný účinek v rozvoji a progresi karcinomu prsu zcela prozkoumán.

V této diplomové práci jsme se zabývali studiem cytotoxické aktivity devíti vybraných látek odvozených od základní struktury katecholu v prsních nádorových buněčných liniích, a to v buněčné linii MCF7/S0.5 a ve fulvestrant rezistentním derivátu MCF7/182R-6. Následně byla testována míra ovlivnění genové exprese estrogen responsivních genů trefoil factor 1 (TFF1) a estrogen receptor 1 (ESR1) těmito látkami. Výsledky ukazují, že v obou buněčných liniích jsou testované látky dobře snášené, a

to i v nejvyšší testované koncentraci. Studium genové exprese naznačilo schopnost těchto derivátů aktivovat ER, a zvýšit tak aktivitu cílových genů přímou interakcí s receptorem, ale pravděpodobně i nepřímou aktivitou. Zejména látka 4-chloropyrokatechol (4-CPC) vykazovala v buněčné linii MCF7/S0.5 ve srovnání s estradiolem silně zvýšenou expresi TFF1 a srovnatelnou aktivitu pro ESR1. Proto byla vybrána pro podrobnější studium v šesti různých koncentracích. V buněčné linii MCF7/182R-6 byla aktivita katecholů poměrně odlišná. Oproti parenterální buněčné linii byla exprese TFF1 významně snížena, ale u ESR1 byly výsledky srovnatelné. Tyto výsledky dokazují, že testované látky jsou schopné interakce s ER. Díky tomu lze deriváty katecholu studovat do větší hloubky jako nadějně látky v ER zprostředkovaných fyziologických procesech a mohou sloužit jako základní struktura pro vývoj nových aktivních molekul.

## **ABSTRACT**

---

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology and Toxicology**

**Student:** Tereza Vyoralová

**Supervisor:** PharmDr. Alejandro Carazo Ph.D.

**Title of the diploma thesis:** Study of the expression and toxicity of catechol derivatives in breast cancer cell lines

Estrogens have several important functions in the human organism and are also involved in the formation and development of breast cancer. These effects are mediated by binding to estrogen receptors (ER) and show complex spectrum of effects such as regulation of reproduction, menstrual cycle, brain function, bone density or mobilization of cholesterol. In addition the presence and quantification of ER in breast cancer is currently used as one of the most important predictive biomarkers in patients suffering from this disease. The occurrence and activity of ER correlates with the response of breast cancer to hormonal treatment and with the patient's prognosis. Despite intensive research, breast cancer is still ranked among the cancers with the highest lethality.

Catechols are organic compounds that are naturally present in food as pollutants, but also can be found in the human body, where they play an important role as precursors of neurotransmitters. Due to the presence of phenolic groups in their structure, catechols are structurally similar to polyphenols. Polyphenol-type compounds are known to have positive effects in reducing the incidence of breast cancer. However, their potential effect in the development and progression of breast cancer has not yet been completely explored.

The aim of this thesis was to study the cytotoxic activity of nine selected substances derived from the basic structure of catechol in breast tumour cell line MCF7/S0.5 and its fulvestrant-resistant derivative MCF7/182R-6. Subsequently, the level of influence of these substances on the gene expression of the estrogen-

responsive genes trefoil factor 1 (TFF1) and estrogen receptor 1 (ESR1) was tested. The results show that the test substances are well tolerated in both cell lines, even at the highest concentration tested. The study of gene expression indicated the ability of these derivatives to activate ER and increase the activity of the target genes by direct interaction with the receptor, but probably also by indirect activity. In particular, the substance 4-chloropyrocatechol (4-CPC) showed a strongly increased expression of TFF1 and similar activity for ESR1 in the MCF7/S0.5 cell line when compared to estradiol. Therefore, it was selected for more detailed study at six different concentrations. In the MCF7/182R-6 cell line, catechol activity was quite different. Compared to the parenteral cell line, TFF1 expression was significantly reduced, but for ESR1, expression results were similar. These results prove that the tested substances are able to interact with ER. Considering these results, catechol derivatives may be studied in more depth as promising agents in ER-mediated physiological processes and may serve as scaffolds for the development of new active molecules.

## **SEZNAM ZKRATEK**

---

3,5-DC	3,5-dichlorokatechol
3-AC	3-aminokatechol
3-IP	3-isopropylkatechol
3M12B	3-methykatechol
4,5-DC	4,5-dichlorokatechol
4-CPC	4-chloropyrokatechol
4-EC	4-ethylakatechol
4-FC	4-fluorokatechol
4-NC	4-nitrokatechol
AF	Aktivační funkce
AP-1	Aktivační protein 1
BRCA	Geny karcinomu prsu (Breast cancer genes)
CAR	Chimerní antigenní receptor (Chimeric antigen receptor)
cDNA	Komplementární DNA (Complementary DNA)
Ct	Prah cyklu (Cycle threshold)
DBD	DNA vázající doména (DNA binding domain)
DES	Diethylstilbestrol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Deoxyribonukleotidtrifosfáty
dsDNA	Dvouvláknová DNA (Double-stranded DNA)
dUTP	Deoxyuridintrifosfát
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru (Epidermal growth factor receptor)
ER	Estrogenní receptor
EREs	Na estrogeny reagující elementy (Estrogen response elements)
ESR1	Estrogenní receptor 1
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv ve Spojených státech (Food and Drug Administration)



GnRH	Gonadotropin uvolňující hormon (Gonadotropin-releasing hormone)
GPER1	Estrogenový receptor 1 spojený s G-proteinem (G-Protein-Coupled Estrogen Receptor 1)
HER2	Humánní epidermální receptor 2
LABA	Dlouhodobě působící beta agonisté (Long acting beta agonist)
LBD	Ligand vázající doména (Ligand binding domain)
LTED	Buňky s dlouhodobým nedostatek estrogenů (Long-term estrogen-deprived cells)
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
mRNA	Messengerová RNA
NR	Nukleární receptor
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PMS	Fenazin methosulfát (Phenazine methosulfate)
PR	Progesteronový receptor
PXR	Receptor pregnanu X (Pregnane X receptor)
q-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce / polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-Time PCR)
RT	Reverzní transkripce
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (Reverse transcription PCR)
SABA	Krátkodobě působící beta agonisté (Short acting beta agonist)
SDS	Dodecylsírán sodný
SERD	Selektivní downregulátor estrogenních receptorů (Selective estrogen receptor degrader)
SERM	Selektivní modulátor estrogenních receptorů (Selective Estrogen Receptor Modulators)
ssDNA	Jednovláknová DNA (Single-stranded DNA)
TFF1	Trefoil factor 1
UNG	Uracil-N glykosyláza
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular endothelial growth factor)

## **OBSAH**

---

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>2</b>
2.1	Estrogeny a estrogení receptor .....	2
2.1.1	Estrogeny .....	2
2.1.2	Estrogení receptor .....	5
2.1.3	Estrogení signalizace .....	8
2.1.4	Role estrogenů a estrogení signalizace v lidském těle .....	11
2.2	Karcinom prsu .....	14
2.2.1	Incidence a rizikové faktory onemocnění .....	14
2.2.2	Biomarkery karcinomu prsu .....	14
2.2.3	Terapie karcinomu prsu .....	15
2.3	Buněčné linie využívané ke studiu estrogeního receptoru .....	18
2.4	Katecholy .....	21
2.5	Deriváty katecholu .....	22
2.5.1	Přehled derivátů katecholu .....	22
2.5.2	Deriváty katecholu vybrané pro účely této práce .....	22
<b>3</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Metodická část</b> .....	<b>26</b>
4.1	Kultivace buněk .....	26
4.1.1	Podmínky buněčné kultivace .....	26
4.1.2	Pasážování buněk .....	26
4.1.3	Stanovení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky .....	27
4.1.4	Nasazení buněk do mikrotitrační destičky .....	28
4.2	Stanovení cytotoxické aktivity buněk .....	29
4.2.1	Princip a základní metody stanovení cytotoxické aktivity buněk .....	29
4.2.2	Metodický postup .....	30
4.3	Genová exprese .....	32
4.3.1	Izolace mRNA .....	32
4.3.2	Polymerázová řetězová reakce .....	34
4.3.2.1	Charakteristika metody .....	34
4.3.2.2	Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí .....	34
4.3.2.3	Thermo Fisher QuantStudio™ 6 .....	35
4.3.2.4	Fáze polymerázové řetězové reakce .....	39

4.3.2.5	Polymerázová reakce v reálném čase.....	40
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>42</b>
5.1	Stanovení cytotoxické aktivity.....	42
5.2	Genová exprese .....	45
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>58</b>

# 1 ÚVOD

---

Estrogeny jsou skupina steroidních hormonů, které hrají významnou roli v patogenezi hormonálně dependentního karcinomu prsu. Je známo, že mechanismy estrogení signalizace jsou velmi rozmanité. Své účinky estrogeny uplatňují mj. vazbou na estrogení receptory (ER), které vedou k aktivaci transkripčních drah a následně ke kontrole exprese genů. Inhibice estrogení signalizace je již v dnešní době běžně využívána k terapii karcinomu prsu.

Karcinom prsu je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění postihující zejména ženské pohlaví. Každoročně na celém světě přibývá velké množství případů tohoto onemocnění. Je třeba mít na paměti, že karcinom prsu je heterogenní onemocnění, kde jednotlivé druhy nádorů vykazují odlišnou odpověď na léčbu. Základem úspěšné léčby je včasná diagnostika a včasné zahájení léčby. Ke stanovení vhodné léčby se v současnosti využívají prediktivní biomarkery karcinomu prsu, a to zejména estrogení receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), progesteronový receptor (PR) a humánní epidermální receptor 2 (HER2). Bohužel, u většiny používaných léků se po čase léčby vyvíjí rezistence, proto je důležité nalezení nových a účinných terapeutických přípravků.

Katecholy jsou organické sloučeniny, od kterých je odvozeno velké množství derivátů, a to jak přírodního, tak syntetického původu. Látky s katecholickým skeletem jsou přítomny i v lidském organismu, a to například jako endogenní sloučeniny typu neurotransmiterů a jejich prekurzorů nebo jako metabolity estrogenu. Díky přítomnosti dvou fenolických skupin ve struktuře vykazují podobnost s polyfenoly, u kterých je znám jejich účinek na snížení incidence karcinomu prsu.

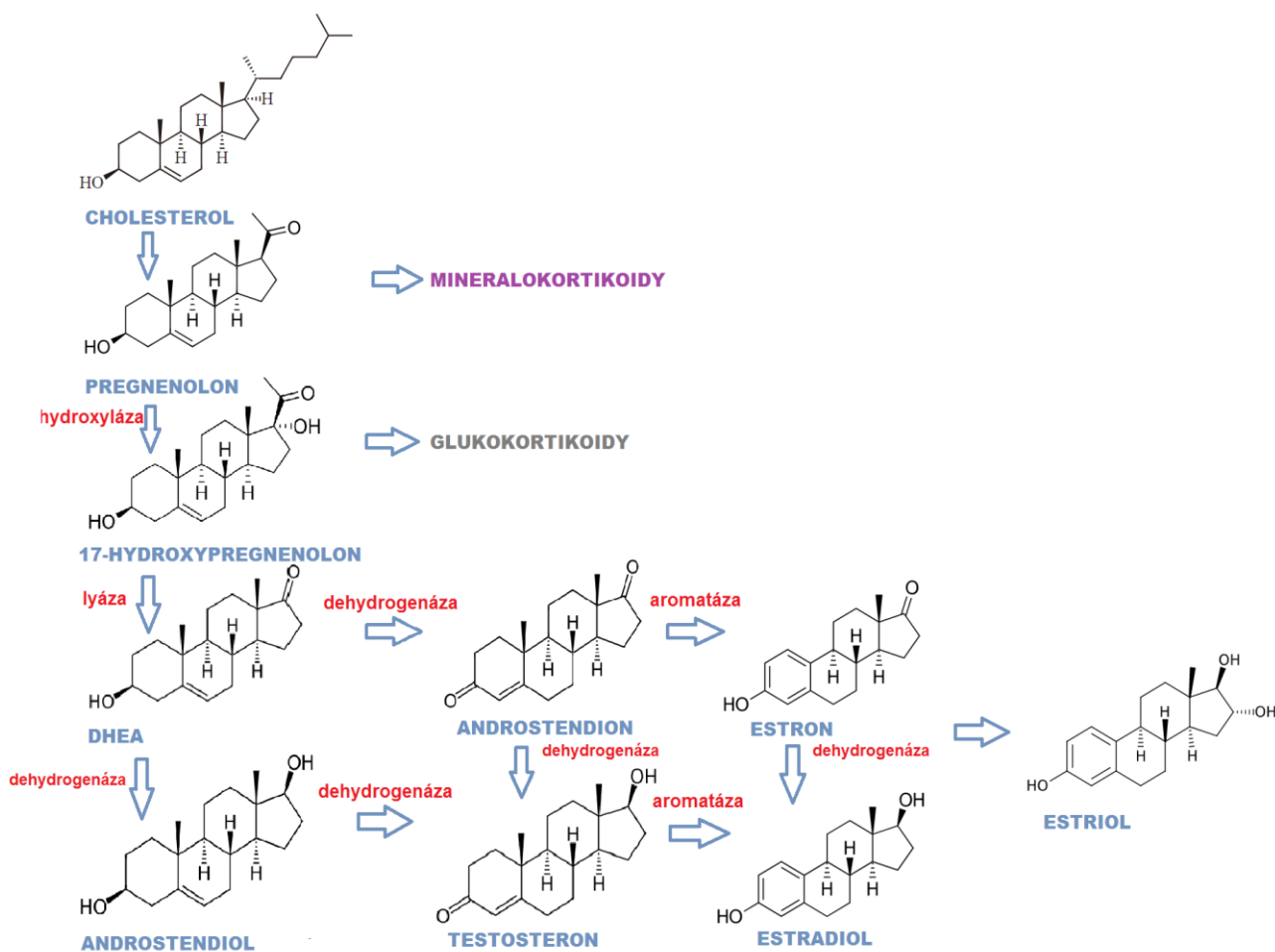
Tato diplomová práce se zabývá studiem cytotoxického vlivu vybraných látek odvozených od základní struktury katecholu ve dvou nádorových buněčných liniích. V buněčné linii MCF7/S0.5, dále pak v derivátu této buněčné linie, v buněčné linii MCF7/182R-6, jež je rezistentní na fulvestrant. Ve stejných dvou buněčných liniích bude následně studována interakce látek s ER za využití dvou estrogen responsivních genů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

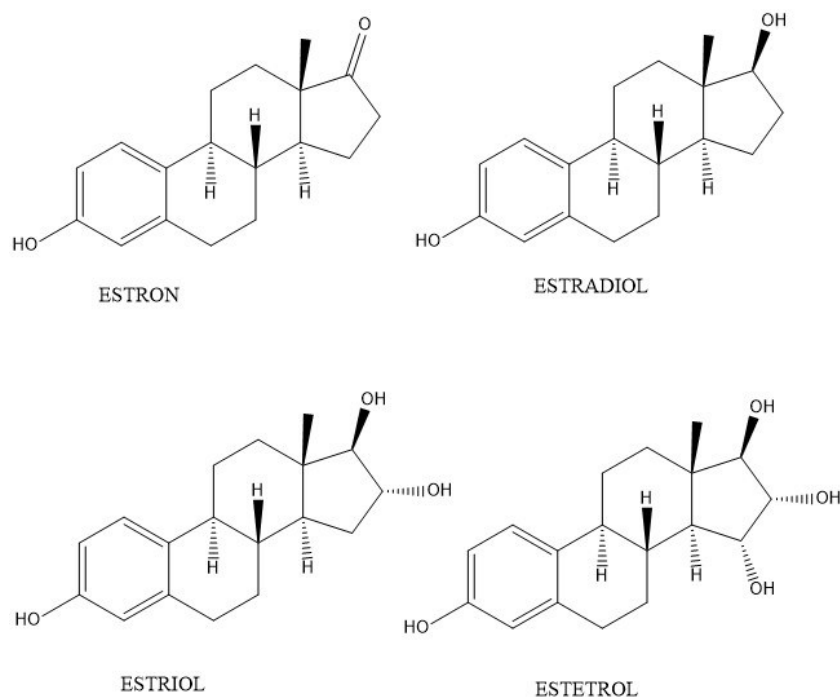
### 2.1 ESTROGENY A ESTROGENNÍ RECEPTOR

#### 2.1.1 Estrogeny

Estrogeny jsou skupina steroidů, které tvoří primární ženské pohlavní hormony, ale v menší míře se vyskytují i v těle mužů. Dle chemické struktury jsou řazeny mezi steroidní hormony, které vznikají metabolickou přeměnou z cholesterolu (**Obr. 1**). Produkce estrogenů probíhá primárně ve vaječnících, ve žlutém tělisku a placentě. V menším množství se nachází i v játrech, tukové tkáni nadledvinkách a prsech. Jejich základní struktura je tvořena 18 uhlíky, a to třemi cyklohexanovými a jedním cyklopentanovým kruhem. Mezi hlavní endogenní estrogeny řadíme estron, estradiol, estriol a estetrol (**Obr. 2**) (Björnström et al., 2005, Fuentes et al., 2019).

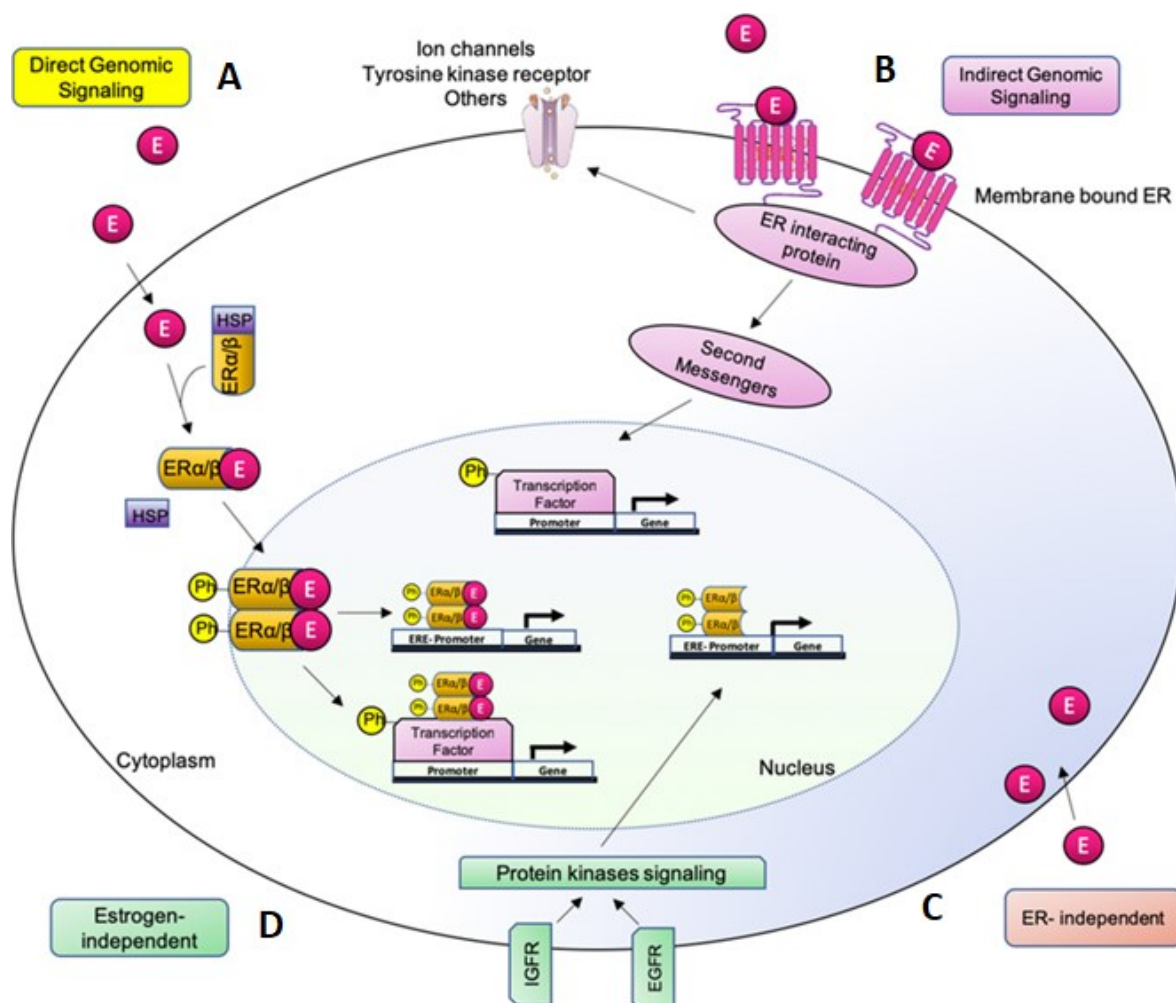


**Obrázek 1:** Metabolismus steroidních hormonů v lidském těle



**Obrázek 2:** Hlavní endogenní estrogény – struktura estronu, estradiolu, estriolu a estetrolu

Své účinky estrogény uplatňují mj. vazbou na specifické estrogenní receptory (ER), které vedou k aktivaci transkripčních procesů a signalizují dráhy, které vedou ke kontrole exprese cílových genů. Vliv estrogenů na genovou expresi je kontrolován striktně regulovanými komplexními mechanismy. Účinky mohou být zprostředkovány jednak přímou vazbou komplexů estrogenních receptorů na specifické sekvence v genových promotorech v DNA, a to buď přímo, nebo nepřímo (genomický efekt), případně mechanismy, které nepotřebují přítomnost estrogenu nebo ER (negenomický efekt) (*Fuentes et al., 2019*). Tyto dráhy jsou znázorněny na **Obr. 3**.



**Obrázek 3:** Přehled mechanismů účinku estrogenů. A: přímá genomická signalizace – estrogen se váže na ER, komplex dimerizuje a translokuje do jádra, což vede k transkripčním změnám genů reagujících na estrogen s/bez estrogen responsivních elementů; B: Nepřímá genomická signalizace – membránový receptor vyvolá cytoplazmatické změny jako např. modulaci membránových iontových kanálů, aktivaci kaskád či transkripčních faktorů; C: Mechanismus nezávislý na ER – estrogen má antioxidační účinky nezávislé na ER; D: Mechanismus nezávislý na estrogenech – na ligandu nezávislé genomické účinky. Převzato z: (Fuentes et al., 2019).

V buňkách existují různé cesty metabolizace estrogenů. Metabolizace neslouží pouze k jejich eliminaci, ale dochází při ní také ke vzniku různých metabolitů. Prvním krokem metabolismu je hydroxylace katalyzovaná členy superrodiny enzymů cytochromu P450, zejména izoformy CYP1A1, CYP1B1 a CYP1A2. Vzhledem k

vysoké expresi těchto enzymů v jaterní tkáni dochází k velkému podílu metabolismu právě zde. Izoforma CYP1B1 je ve vysoké míře exprimována v cílových tkáních estrogenů, včetně mléčné žlázy, dělohy a vaječníků. Hydroxylace estradiolu je dále následována konverzí na 2-hydroxyestron, 4-hydroxyestron, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol a 16 $\alpha$ -hydroxyestron. Tyto látky jsou známé jako tzv. katechol estrogy, vzhledem k přítomnosti farmakologických vlastností jak katecholaminů, tak estrogenů. Katechol estrogenům je v dnešní době věnována značná pozornost díky malým estrogením účinkům, antiproliferativním vlastnostem a schopnosti řídit syntézu estrogenů (*Fuentes et al., 2019, Tsuchiya et al., 2005*).

### **2.1.2 Estrogenní receptor**

Estrogenní receptor je jeden z členů superrodiny nukleárních receptorů (NR). NR jsou skupinou transkripčních faktorů, které regulují genovou expresi prostřednictvím různých mechanismů. Mezi členy superrodiny NR patří jednak receptory pro steroidní hormony – estrogy, glukokortikoidy, ale i receptory pro nesteroidní ligandy – mj. hormony štítné žlázy či kyselina retinová. Dále zde řadíme receptory vázající různé produkty metabolismu lipidů, jako jsou mastné kyseliny a prostaglandiny. Do superrodiny NR se řadí také tzv. sirotčí receptory, u nichž nejsou známé regulační ligandy. Existují i falešné sirotčí receptory, u nichž původně nebyl znám regulační ligand (např. receptor pregnanu X – PXR, konstitutivní androgenní receptor – CAR) (*Glass et al., 2000, Carazo Fernández et al., 2015, di Masi et al., 2009*).

Estrogenní receptor (ER, NR3A) byl objeven v roce 1958 v laboratoři Dr. E. Jensena, který přišel na to, že reprodukční ženské tkáně jsou schopné přijímat estrogen z cirkulace. Později se ukázalo, že estrogen vázající receptory jsou schopné migrace z cytoplasmy do jádra, kde mohou ovlivňovat genovou transkripci přímou interakcí s DNA (*Jensen et al., 1967, Jensen et al., 1968*). O více než 20 let později byl izolován první estrogenní receptor (dnes známý jako ER1 nebo  $\alpha$ , NR3A1) z lidské buněčné linie karcinomu prsu MCF-7 (*Green et al., 1986*). Druhý estrogenní receptor (dnes známý jako ER2 nebo  $\beta$ , NR3A2) byl popsán o deset let později (*Kuiper et al., 1996*). Receptory se často prezentují ve formě různých izoform a ty se liší zejména v počtu strukturálních domén, ze kterých se skládají. Receptor ER $\alpha$  je u lidí kódován genem estrogen receptor 1 (ESR1), umístěným na chromozomu 6. Naopak ER $\beta$  je



kódován genem estrogen receptor 2 (ESR2), umístěným na chromozomu 14 (*Fuentes et al., 2019*).

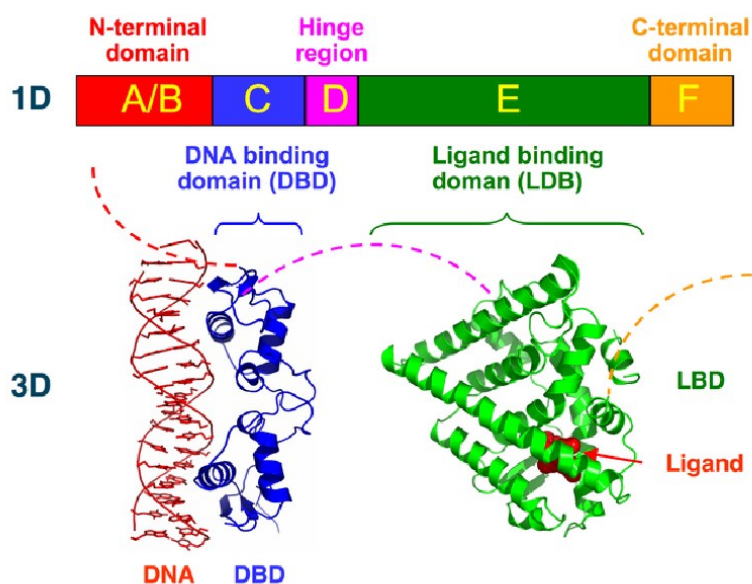
Nedávno byl objeven nový typ estrogenového vazebného proteinu – Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER1) (*Filardo et al., 2012*). Na rozdíl od nukleárních receptorů ER $\alpha$  a ER $\beta$  se jedná o membránový estrogenový receptor, který je zodpovědný za rychlou estrogenní signalizaci. Ve srovnání s jadernými estrogenovými receptory je vazebná afinita GPER1 k estradiolu podstatně nižší a disociace z receptoru naopak velmi rychlá a dokončená během několika minut. Navzdory rozsáhlému významu estrogenní signalizace jsou známy pouze tyto tři typy receptorů (**Tabulka 1**), které zprostředkovávají téměř všechny estrogenní účinky (*Vrtačnik et al., 2014, Fuentes et al., 2019*).

**Tabulka 1:** Typy estrogenních receptorů

CHARAKTERISTIKA	ER $\alpha$	ER $\beta$	GPER1
<b>TYP</b>	Nukleární receptor pro steroidní hormony		Receptor spřažený s G-proteinem
<b>STRUKTURA</b>	C-terminální doména, DNA-vázací doména, pantová oblast, ligand-vázací doména, N-terminální doména		7 transmembránových $\alpha$ -helických oblastí, 4 extracelulární a 4 cytosolické segmenty
<b>POČET ISOFOREM</b>	3	5	1
<b>VELIKOST</b>	595 aminokyselin	530 aminokyselin	375 aminokyselin
<b>DISTRIBUCE V LIDSKÝCH TKÁNÍCH</b>	děloha, nadvarlata, prsní tkáň, játra, ledviny, bílá tuková tkáň, prostata, vaječníky, kostra, mozek	tlusté střevo, slinné žlázy, cévní endotel, plíce, močový měchýř, prostata, vaječníky, kostry, mozek	CNS, PNS, děloha, vaječníky, mléčné žlázy, spermatogoniální buňky, GIT, slinivka, ledviny, játra, nadledviny

Lidské estrogenní receptory mají typickou strukturu, kterou sdílejí všichni zástupci rodiny steroidních receptorů. Receptory ER $\alpha$  a ER $\beta$  se skládají ze šesti domén. Aminoterminální doména A/B se nachází na N-konci a podílí se na transaktivaci genové transkripce. Obsahuje tzv. zinkový prst, který zprostředkovává vazbu na cílové sekvence. Oblast C odpovídá DNA vázací doméně neboli DBD (DNA binding domain), která se podílí na dimerizaci estrogenových receptorů a vazbě na

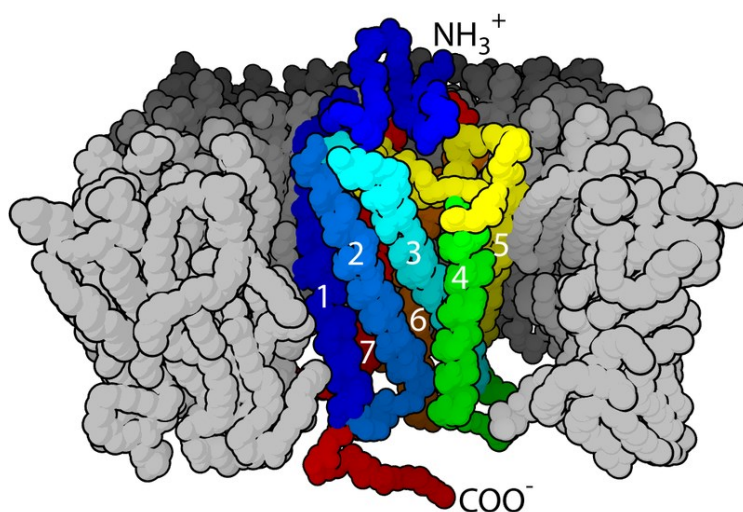
specifické sekvence chromatinu tzv. estrogen response elements (EREs) (Scheidereit et al., 1986; Truss et al., 1993). D doména je pantová oblast (hinge region), která spojuje doménu C a E a je schopná vázat chaperonové proteiny. Nachází se zde tzv. lokalizační signál, který je po navázání estrogenů odkryt a umožní translokaci komplexů receptor-ligand do jádra. V oblasti karboxylového terminálu E/F, známé také jako ligandová vazebná oblast (LBD – ligand binding domain), se nachází estrogenové vazebné místo pro ligandy (**Obr. 4**). Tyto ligandy mohou působit jako agonisté a vázat koaktivátory, které podporují expresi cílových genů, anebo jako antagonisté, kteří vážou korepresory a brání expresi genů. Funkce domény F není zcela jasná a má proměnlivou délku. Dále jsou součástí struktury receptoru dvě aktivační funkce – AF1, AF2, které mohou fungovat buď nezávisle, nebo synergicky, v závislosti na buněčném kontextu (Kumar et al., 2011).



**Obrázek 4:** Základní struktura estrogenních receptorů. Jednorozměrné (1D) zobrazení aminokyselinové sekvence skládající se ze šesti receptorových domén (A/B, C,D,E a F); trojrozměrné (3D) zobrazení DNA, DNA vázající domény a ligand vázající domény jaderných receptorů, struktura N-terminální domény, pantové oblasti a C-terminální domény je znázorněna přerušovanými čarami, Převzato z: *Nuclear Receptor Structure - Nuclear receptor - Wikipedia*.

Struktura membránové receptoru GPER1 je velice rozdílná od struktury již popsaných receptorů ER $\alpha$  a ER $\beta$ . Jedná se o receptor spřažený s G-proteinem a jeho sktruktura se skládá ze 7 transmembránových  $\alpha$ -helických oblastí, 4 extracelulárních

a 4 cytosolických segmentů (Sommer et al., 2001) (Obr. 5). Tento receptor je doposud nejméně prostudován.



**Obrázek 5:** Transmembránový receptor spřažený s G-proteinem. Transmembránové helixy 1-7, šedivě vyznačené fosfolipidy membrány. Převzato z: *Receptor spřažený s G-proteinem struktura – Receptor spřažený s G-proteinem - Wikipedia.*

### 2.1.3 Estrogenní signalizace

Jak již bylo zmíněno výše, estrogen dependentní signalizaci lze rozdělit na genomickou a nengenomickou, a to na základě výsledku buněčných dějů – modulace genové exprese nebo aktivace signalizačních kaskád (Vrtačnik et al., 2014).

Přímá genomická signalizace je také známá jako klasický mechanismus estrogenní signalizace. Nukleární receptory ER $\alpha$ , ER $\beta$  zde hrají roli ligandem aktivovaného transkripčního faktoru. Po vazbě estrogenu dochází ke konformační změně a k dimerizaci receptoru. Může se jednat o homodimerizaci či heterodimerizaci. Tento komplex je následně translokován do jádra, kde se váže na chromatin v blízkosti EREs (Vrtačnik et al., 2014, Fuentes et al., 2019).

Receptor ER $\alpha$  má nejméně tři a ER $\beta$  pět různých izoform. Tyto izoformy mohou mít velmi různorodý vliv na estrogenní signalizaci a regulaci cílových genů. Na rozdíl od „wild-type“ ER $\alpha$  obě jeho izoformy jsou kratší, jelikož postrádají N-terminální doménu. Tyto izoformy mají schopnost heterodimerizovat s „full-length“ ER $\alpha$ , a snižovat tak jeho aktivitu. Nejkratší izoforma ER $\alpha$ , ER $\alpha$ 36 funguje také jako membránově

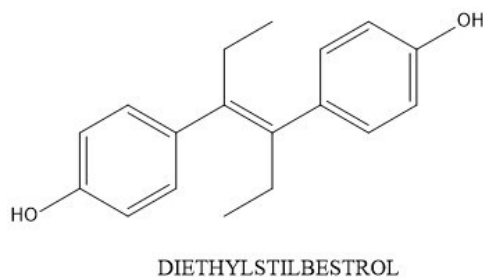
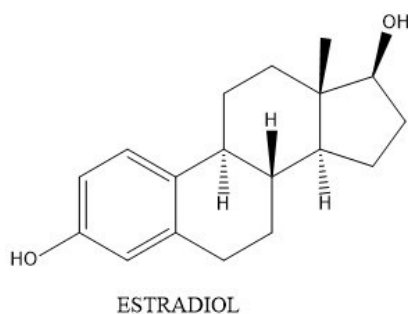
lokalizovaný ER schopný interakce s GPER1. Čtyři kratší izoformy ER $\beta$  se liší svou ligand-vázací oblastí, což má za následek sníženou schopnost vázání ligandů. ER $\beta$  izoformy, které nejsou schopny vázat ligandy či koaktivátory a nemají transkripční aktivitu, dimerizují přednostně s ER $\alpha$ , a tlumí tak ER $\alpha$  signalizaci (Vrtačnik et al., 2014).

Transkripce několika genů, které neobsahují ERE v jejich promotorových oblastech, může být také regulována estradiolem bez přímé vazby estrogenových receptorů na DNA. Ve skutečnosti zhruba jedna třetina estrogen reagujících genů postrádá sekvence podobné ERE (Marino et al., 2006). V nich jsou mechanismy, jimiž estrogen ovlivňuje expresi genů, souhrnně známy jako nepřímá genomická signalizace neboli transkripční „cross-talk“. Jsou založeny na aktivaci genové exprese estrogenovými receptory, které se neváží přímo na DNA. Komplexy estrogenových receptorů působí prostřednictvím interakcí protein-protein s jinými transkripčními faktory a reakčními prvky. Tímto způsobem estrogeny nepřímým způsobem ovlivňují aktivaci nebo potlačení exprese cílového genu. Typickým příkladem genomické akce nezávislé na ERE je interakce ER s komplexem transkripčního faktoru aktivačního proteinu 1 (AP-1). AP-1 je klíčovým transkripčním faktorem procesů jako je buněčná diferenciace, proliferace a apoptóza (Björnström et al., 2005, Vrtačnik et al., 2014, Fuentes et al., 2019).

Již dlouho je známo, že určité estrogen-dependentní změny jsou příliš rychlé na to, aby mohly být spojovány s transkripcí cílových genů a následnou syntézou proteinů. Negenomické působení estrogenu často zahrnuje aktivaci signálních transdukčních mechanismů s následnou produkcí intracelulárních sekundárních messengerů, regulaci cAMP a aktivaci proteinkinázových signalizačních kaskád, které vedou k nepřímým změnám v expresi genů. Je nejčastěji spojena s podmnoužinou estrogenních receptorů vázaných na membrány, např. s GPER1 a některými variantami ER $\alpha$  a ER $\beta$ . Molekulární mechanismy, které jsou základem negenomické estrogenové signalizace jsou rozmanité, početné a závisí na řadě podmínek, jako je např. dostupnost signálních transdukčních molekul (Björnström et al., 2005, Vrtačnik et al., 2014, Fuentes et al., 2019).

Estrogenní signalizaci ovlivňují i tzv. endokrinní disruptory. Jedná se o exogenní hormon-aktivní látky, jejichž společným rysem je chemická příbuznost s endogenním estrogenem (Kujanová et al., 2007). Tyto látky jsou schopny v životním

prostředí interagovat s endokrinním systémem člověka a zvířat a interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem nebo rozkladem přirozených hormonů, jež jsou v těle odpovědné za homeostázi, reprodukci, vývoj a chování (Crisp *et al.*, 1997). Do této skupiny řadíme velké množství látek, které lze obecně rozdělit na látky přírodního původu, a to fytoestrogeny (izoflavonoidy, lignany, stilbeny), mykoestrogeny a látky chemického původu, jako jsou ftaláty, alkylfenoly, bisfenol A a farmaceutické preparáty (Pfitzner, 2010). Jako příklad lze uvést syntetický nesteroidní estrogen diethylstilbestrol (DES) (**Obr. 6**), který byl syntetizován v roce 1938 (Dodds *et al.*, 1938) a používán jako hormonální kontracetivum, také k prevenci potratu u těhotných žen. V roce 1971 však byly zjištěny jeho teratogenní účinky a účinky na rozvoj karcinomů prsu a pochvy u žen. Dnes se využívá např. při terapii karcinomu prostaty (Schrager *et al.*, 2004).



**Obrázek 6:** Srovnání struktury estradiolu a diethylstilbestrolu. Důležitým faktem při vazbě na ER a vyvolání estrogenních účinků je zachování obou hydroxylových skupin ve struktuře a podobná vzdálenost mezi nimi.

#### 2.1.4 Role estrogenů a estrogenní signalizace v lidském těle

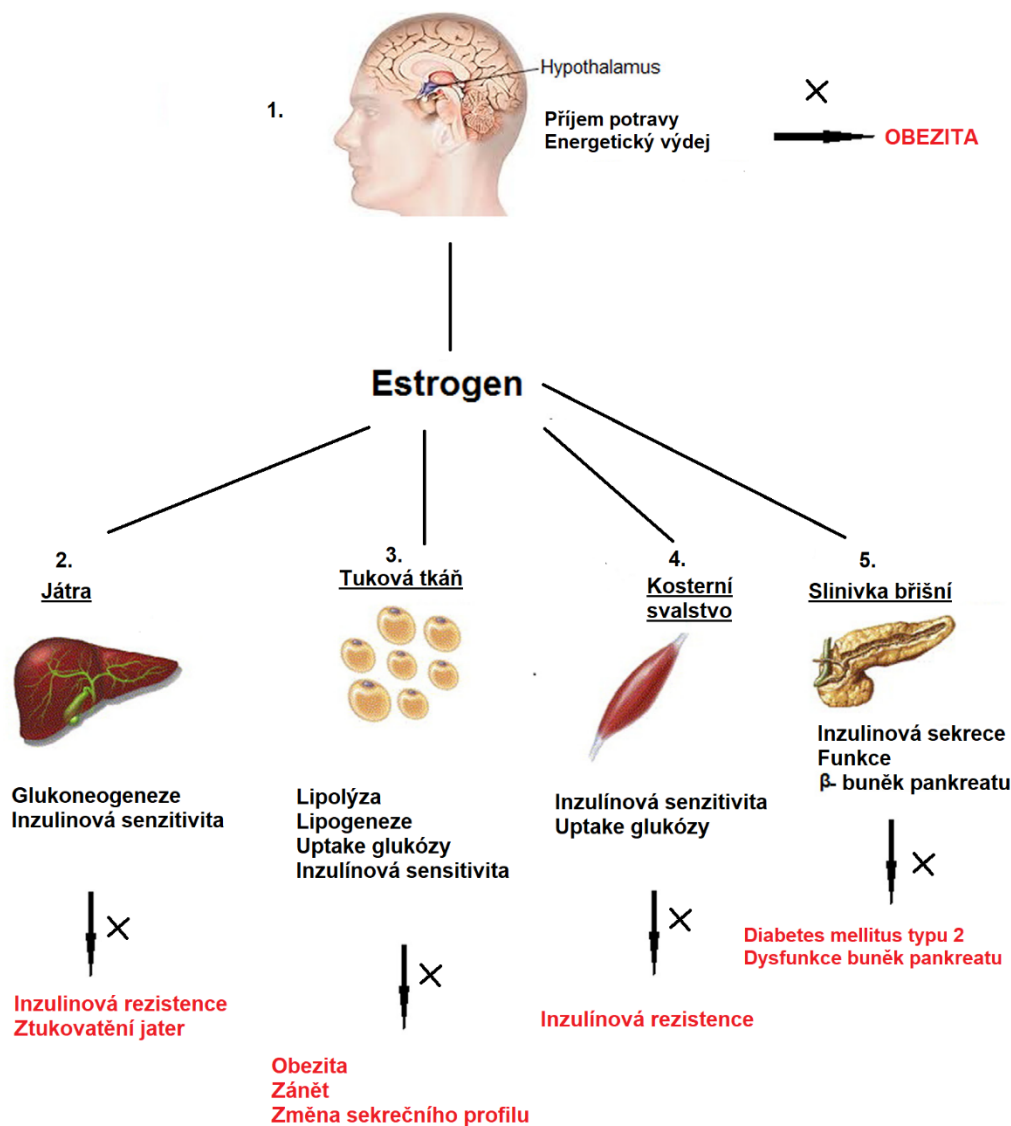
Estrogeny jako takové vykazují v lidském organismu široké spektrum fyziologických účinků. Podílejí se zejména na regulaci menstruačního cyklu, reprodukce, kostní denzity, funkce mozku a mobilizace cholesterolu. Dále ovlivňují rozvoj sekundárních pohlavních znaků (prsni tkáně a pohlavních orgánů) a podílejí se na kontrole zánětu (*Liang et al., 2013*). Během těhotenství pomáhají estrogeny produkované placentou připravit mléčnou žlázu k produkci mléka (*Hall et al., 2011*). Estrogeny také hrají důležitou roli v mužské fyziologii a nelze na ně pohlížet pouze jako na ženské pohlavní hormony (*Vrtačnik et al., 2014*). Nižší hladiny estrogenů produkovaných u mužů jsou nezbytné pro zrání spermií, erektilní funkci a udržení zdravého libida (*Fuentes et al., 2019*).

Kromě vlivu estrogenů na normální buňky a normální fyziologii lidského těla, hrají také důležitou roli v několika patologických procesech. Abnormální signalizace ER vede k rozvoji celé řady onemocnění jako je např. rakovina, metabolické a kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní onemocnění či osteoporóza (*Jia et al., 2015*).

Je známo, že ER $\alpha$  má určitý vliv na rozvoj a progresi karcinomu prsu. (*Droog et al., 2013*). Exprese a role ER $\beta$  u karcinomu prsu je zatím nejasná a informace v odborné literatuře jsou rozporuplné. Některé studie uvádějí, že exprese ER $\beta$  v nádorové prsní tkáni je nižší v porovnání s tkání normální, což indikuje protektivní roli ER $\beta$  vůči karcinomu prsu. Jiné práce ukázaly, že ER $\beta$  může vést k potlačení aktivity ER $\alpha$ , a je tak dobrým prognostickým indikátorem (*Zhao et al., 2007*). Naopak jiné studie hlásí opačné účinky a tvrdí, že exprese ER $\beta$  indukuje buněčnou proliferaci (*Saji et al., 2002*).

S expresí ER je spojen také ovariální karcinom. Většina pacientek s karcinomem ovaria nadměrně exprimuje ER $\alpha$  a/nebo ER $\beta$ . Míra exprese ER $\alpha$  je úzce spojena s estrogen-dependentním růstem, invazí a odpovědí na endokrinní terapii (*Li et al., 2014*). Naopak se snižující se hladinou ER $\beta$  či poměrem ER $\beta$ /ER $\alpha$  klesá i riziko ovariální karcinogeneze, což naznačuje, že na vzniku karcinomu ovaria se může podílet ztráta exprese ER $\beta$  (*Chan et al., 2014*). S expresí ER souvisí také karcinom prostaty či karcinom tlustého střeva (*Jia et al., 2015*).

Jak bylo uvedeno výše, estrogény ovlivňují metabolické procesy v organismu, a to zejména homeostázu glukózy a lipidů. Energetickou homeostázu regulují prostřednictvím centrálních i periferních tkání. Deficit estrogenu vede k metabolické dysfunkci predisponující k obezitě, metabolickému syndromu či diabetu mellitu typu 2 (**Obr. 7**) (Jia et al., 2015).



**Obrázek 7:** Vliv ER na metabolismus glukózy a lipidů. 1. hypotalamus: řídí příjem potravy, energetický výdej a homeostázu hmotnosti, zejména prostřednictvím ER $\alpha$ ; 2. játra: regulace glukózové a lipidové homeostázy jater; 3. tuková tkáň: estrogenní signalizace vedoucí k indukci lipolýzy (např. v důsledku aktivace hormon senzitivní lipázy) a potlačením lipogeneze (např. v důsledku snížení aktivity lipoproteinové

lipázy), zvýšení exprese inzulिनových receptorů a vychytávání glukózy; 4. kosterní svalstvo: regulace vychytávání glukózy a zvýšení inzulिनové senzitivity; 5. β buňky pankreatu: regulace sekrece inzulínu a celkové glykémie; deficit estrogenů vede k narušení zmíněných procesů. Upraveno z: (*Jia et al., 2015*).



## 2.2 KARCINOM PRSU

### 2.2.1 Incidence a rizikové faktory onemocnění

Karcinom prsu je poměrně časté a velmi závažné onemocnění. Globální výskyt případů se pohybuje přes dva miliony ročně a nese jedno z nejvyšších počtů úmrtí v souvislosti s rakovinou u žen. Na rozdíl od většiny druhů rakoviny, jejichž nárůst začíná na konci páté dekády života, výskyt rakoviny prsu začíná růst obvykle ve třetí dekádě života, a to nejspíše kvůli účinkům hormonů vaječnicků na tkáň prsu (*Samavat et al., 2015, Mokbel et al., 2019*).

Některé rizikové faktory pro vznik rakoviny prsu jsou neměnné, například věk, mutace genů rakoviny prsu 1 a 2 - BRCA1 (breast cancer gen 1) a BRCA2 (breast cancer gen 2), rodinná anamnéza, reprodukční anamnéza či ozařování hrudníku. Jiné jsou do určité míry ovlivnitelné, jako je např. hormonální terapie, obezita a konzumace alkoholu (*Hulka et al., 2001*). Řada známých rizikových faktorů souvisí s vysokými hladinami endogenních estrogenů v organismu. Kvůli tomuto zjištění vzbudil v posledních dvou desetiletích účinek estrogenů na rozvoj karcinomu prsu velkou pozornost (*Samavat et al., 2015*).

### 2.2.2 Biomarkery karcinomu prsu

Karcinom prsu představuje vysoce heterogenní skupinu onemocnění a je důležité, aby se každému pacientovi zvolil co nejvhodnější typ léčby. Ke stanovení typu léčby se využívají prediktivní biomarkery (*Weigel et al., 2010*).

Jeden z nejdůležitějších biomarkerů karcinomu prsu je exprese ER. Ačkoliv obě formy estrogenního receptoru – ER $\alpha$  i ER $\beta$  vážou estradiol s vysokou afinitou, zprostředkovávají různou biologickou aktivitu. Zatímco ER $\alpha$  stimuluje proliferaci buněk nádorové tkáně, ER $\beta$  jej inhibuje (*Roger et al., 2001*). Míra přítomnosti ER $\alpha$  je proto používána k získání indexu citlivosti karcinomu na hormonální léčbu. ER pozitivní nádory tvoří asi 80 % karcinomů prsu. Takové nádory využívají jako hlavní růstový stimul estradiol a receptor ER $\alpha$  je tak přímým cílem endokrinní terapie (*Adhami et al., 2018, Weigel et al., 2010*).

Spolu s expresí ER je často měřena i exprese PR, která představuje další důležitý biomarker pro prsní karcinom. Exprese PR je závislá na přítomnosti ER.

Nádory, které exprimují PR bez přítomnosti ER nejsou běžné (méně než 1 % nádorů) (Weigel et al., 2010).

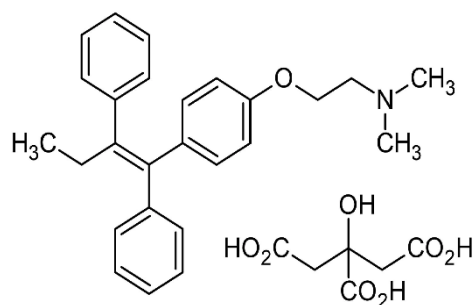
ER a PR nejsou jedinými používanými biomarkery. Dalším prediktivním biomarkerem je humánní epidermální receptor 2 (HER2). Téměř 7 % ER pozitivních pacientů jsou i HER2 pozitivní. Nadměrná exprese genu HER2 je detekovatelná v přibližně 20 % případů. Onkogen HER2 byl poprvé identifikován jako indikátor pacientovy prognózy. V případě nadměrné exprese HER2 je u pacientek pravděpodobnější, že budou trpět relapsem a budou mít tendenci ke kratšímu přežití (Pegram et al., 2000). Díky vývoji monoklonální protilátky trastuzumabu, která je cílena právě na HER2, se dnes stal amplifikační status HER2 rovněž vysoce prediktivním biomarkerem (Adhami et al., 2018, Weigel et al., 2010).

Důležitou roli hrají také tzv. BRCA tumor supresorové geny, které se nacházejí v organismu ve dvou typech BRCA1 a BRCA2. Vrozená mutace v BRCA genech znamená výrazně zvýšené riziko karcinomu prsu či ovárií (Tung et al., 2018).

### **2.2.3 Terapie karcinomu prsu**

Nejčastěji předepisovaný lék na hormon-dependentní karcinom prsu je Tamoxifen. Tato molekula byla schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) již v roce 1977 (Jordan et al., 1994) (**Obr. 8**). Jedná se o léčivo ze skupiny selektivních modulátorů estrogenních receptorů (SERM). Tamoxifen vykazuje komplexní spektrum farmakologických účinků v tkáních, které exprimují ER. Za antiproliferativní působení tamoxifenu je zodpovědný jeho metabolit hydroxytamoxifen, který díky kompetitivní vazbě na estrogenní receptor vede k potlačení transkripce DNA zprostředkované estradiolem. V důsledku toho tamoxifen inhibuje expresi estrogenu regulovaných genů, včetně růstových a angiogenních faktorů vylučovaných nádorem, které mohou stimulovat růst autokrinním nebo parakrinním mechanismem. Výsledkem je zpomalení buněčné proliferace a zmenšování velikosti nádoru (Jensen et al., 1999, Osborne 1998, Kelvin et al., 2012). Bylo zjištěno, že u ER pozitivního karcinomu prsu snižuje adjuvantní léčba tamoxifenem po dobu 5 let roční úmrtnost o 31 % a četnost recidivy téměř o 50 %. Oproti tomu pacienti s ER-negativním karcinomem nemají prospěch z adjuvantní léčby tamoxifenem, ale nějaký benefit z léčby můžeme pozorovat u méně časté skupiny nádorů prsu exprimující progesteronový receptor

(Weigel et al., 2010). Bohužel, u většiny pacientek s karcinomem prsu léčených antiestrogeny se časem vyvine rezistence na léčbu (Jensen et al., 1999).



Tamoxifen

### Obrázek 8: Struktura tamoxifenu

Další možností je inhibiční léčba, která je založena na inhibici enzymu aromatázy, také nazývané estrogen syntázy. Jedná se o enzym ze skupiny cytochromu P450, který se podílí na konečné přeměně androgenů na estrogény. Do skupiny léčiv inhibitorů aromatázy řadíme nastrozol, letrozol a steroidní inaktivátory aromatázy, jako jsou exemestan a formestan (Séralini et al., 2001).

Léčivem volby po tamoxifenu a inhibitorech aromatázy je antiestrogen fulvestrant. Jeho mechanismus účinku spočívá ve vazbě na ER a blokaci jeho účinku. Navíc fulvestrant vede k down regulaci ER v buňce a bývá označován jako tzv. selektivní down-regulátor estrogenních receptorů (SERD) (Osborne et al., 2004).

U některých pacientů může být využita tzv. farmakologická kastrace, která spočívá v podávání agonistů gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH) v nadfyziologických dávkách. Dochází ke stimulaci hypofýzy a zvýšené produkci gonadotropinů, následně k vyčerpání hypofýzy a poklesu jejich hladin (Petráková, 2011).

V současné době se u pacientů využívá také biologická léčba, která je, na rozdíl od cytostatik, namířena proti určitým strukturám v buňce. Příkladem biologické léčby jsou přípravky cílené proti HER2 genu. Jsou dostupné čtyři formy anti-HER2 terapie – trastuzumab, lapatinib, pertuzumab, ado-trastuzumab emtansin (Adhami et al., 2018, Weigel et al., 2010). Nově je pro léčbu karcinomu prsu schválena i protilátka

bevacizumab, která se váže na růstový faktor cévního endotelu (VEGF), a brání tak novotvorbě cév v nádorové tkáni (*Petráková, 2011*).

## 2.3 BUNĚČNÉ LINIE VYUŽÍVANÉ KE STUDIU ESTROGENNÍHO RECEPTORU

Buněčné linie exprimující ER jsou klíčovým prvkem molekulárního studia rakoviny prsu a jsou široce využívány v rámci jejího výzkumu. První buněčná linie byla objevena v roce 1951 Georgem Geyem. Byla izolována z maligního karcinomu děložního čípku pacientky Henrietty Lacksové, dle které nese i pojmenování – HeLa (Gey *et al.*, 1952). Tato buněčná linie se stala důležitým experimentálním nástrojem pro výzkum karcinomu prsu. První buněčná linie izolovaná přímo z karcinomu prsu – BT-20, byla objevena v roce 1958 (Lasfargues *et al.*, 1958). Od té doby bylo izolováno a používáno několik buněčných linií. Počet buněčných linií, které jsou dnes široce využívány ke studiu karcinomu prsu, je poměrně malý, přičemž více než dvě třetiny používaných buněčných linií tvoří MCF7, T47D a MDAMB231 (Dai *et al.*, 2017). V současné době celosvětově nejvíce prozkoumanou buněčnou linií lidského karcinomu prsu je buněčná linie MCF7 (Comsa *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2015).

Buněčná linie MCF7 byla poprvé objevena v roce 1973 Dr. Soulem a jeho kolegy. Byla pojmenována podle organizace Michigan Cancer Foundation (MCF) a reprezentovala sedmý pokus Dr. Soula o izolaci buněčné linie (Soule *et al.*, 1973). Linie byla izolovaná z pleurálního výpotku 69leté ženy s metastazujícím onemocněním. Dalším stěžejním objevem byl ve stejném roce popis ER v MCF7 buněčné linii karcinomu prsu. Následně bylo v roce 1975 prokázáno, že antiestrogeny inhibují růst buněk MCF7 (Comsa *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2015).

MCF7 je považována za málo agresivní a neinvazivní buněčnou linii s nízkým metastatickým potenciálem. Jeden z nejdůležitějších příspěvků buněk MCF7 v rámci výzkumu karcinomu prsu je její využití pro studium ER $\alpha$ . Tato buněčná linie je jednou z mála, která exprimuje podstatnou část ER napodobující většinu invazivních ER-pozitivních karcinomů prsu. Buňky MCF7 byly také stěžejní pro výzkum protilátek proti ER a pomohly objasnit buněčnou lokalizaci ER. Protilátka lze také využít např. při měření hladin ER v lidských nádorech prsu a následném rozhodování, zda aplikovat hormonální terapii či ne (Comsa *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2015). Přestože je buněčná linie MCF-7 využívána zejména pro studium ER, je důležité zmínit, že tyto buňky exprimují také androgenní, progesteronové a glukokortikoidní receptory (Lee *et al.*, 2015).

Přesný mechanismus, jak estrogen stimuluje buňky MCF7 k růstu, zůstává aktivní oblastí studia. První zprávy se zaměřovaly na estrogenem regulovanou signalizaci růstového faktoru, což je klíčový mechanismus, jak estrogen reguluje buněčný cyklus (*Osborne et al., 2011*). Novější studie ukázaly, že estrogen současně indukuje a potlačuje exprese velkého množství genů, což vyvolává komplexní síť změn, které koordinují změnu růstu buněk (*Lee et al., 2015*).

K výzkumu vlastností karcinomu prsu se získanou hormonální rezistencí byly vytvořeny speciální MCF7 buněčné linie, které se využívají ke studiu hormonální rezistence (**Tabulka 2**). *In vitro* studie využívající absenci estrogenů či chronické vystavení antiestrogenů vedly k vývoji hormon-rezistentních variant MCF7, které mohou být ER-pozitivní nebo ER-negativní. Při absenci estrogenu buňky MCF7 zvyšují expresi ER. Nepřítomnost estrogenů nejprve zpomalí růst buněk přibližně na dobu jednoho měsíce, poté se růst buněk obnoví. Několik laboratoří vytvořilo buňky s dlouhodobým nedostatek estrogenů – long-term estrogen-deprived cells (LTED). Tyto buňky exprimují vysoké hladiny ER a stávají se tak hypersensitivními na estrogení stimulaci. Studie zabývající se MCF7 LTED deriváty identifikovaly epigenetické a transkripční změny, které vedou ke změnám v signalizaci růstového faktoru (*Comsa et al., 2015, Lee et al., 2015*).

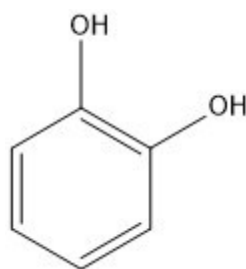
Příkladem linie rezistentní na antiestrogen je buněčná linie MCF7/182R-6, která byla vytvořena z klonu buněk MCF7/S0.5, které jsou přizpůsobené na nízkou spotřebu fetálního bovinního séra (*Mladěnka et al., 2020*). Tyto buňky přežily dlouhodobé působení antiestrogenu ICI 182, 780 v koncentraci 100 nM (*Lykkesfeldt et al., 1995*). Buněčná linie MCF7/182R-6 se využívá k objasnění molekulárních změn spojených s rezistentním růstem a nalezení vhodné léčby. Buňky MCF7/182R-6 jsou pěstovány za přítomnosti fulvestrantu k udržení jejich rezistence. Tato buněčná linie exprimuje ER $\alpha$ , ale v nižším množství oproti parenterálním buňkám MCF7, naopak PR MCF/182R-6 neexprimuje vůbec (*Jensen et al., 1999*).

**Tabulka 2:** Přehled MCF7 rezistentních buněčných linií

<b>Název buněčné linie</b>	<b>Typ rezistence</b>
MCF7/182R-6	Fulvestrant
MCF7/AnaR-4	Anastrozol
MCF7/ExeR-4	Exemestan
MCF7/LetR-1	Letrozol
MCF7/TAMR-7	Tamoxifen

## 2.4 KATECHOLY

Katecholy jsou organické sloučeniny, jejichž struktura se skládá z benzenového jádra, které má v ortho poloze navázané dvě hydroxy skupiny (**Obr. 9**). U lidí a savců mohou být katecholy přítomny jako metabolity při odbourávání benzenu, estrogenů nebo jako endogenní sloučeniny např. neurotransmitery a jejich prekurzory – adrenalin, noradrenalin, dopamin (*Schweigert et al., 2001*).



**Obrázek 9:** Obecná struktura katecholu

Katecholy mohou být použity v řadě rozmanitých aplikací. Využívají se například jako činidla pro fotografování, barvení kožešin, ve farmaceutickém průmyslu či pro výrobu pryže a plastů. Substituované katecholy jsou vedlejšími produkty v dužnině a olejích, a to zejména chloro a methyl deriváty. Jedná se také o meziproducty rozkladu aromatických sloučenin a ligninu mikroorganismy (*Schweigert et al., 2001*).

O působení katecholů v lidském organismu se v literatuře popisují protichůdné informace. Jednak mohou katecholy v buňkách působit jako antioxidanty zabraňující peroxidaci lipidů, ale na druhou stranu i jako pro-oxidanty způsobující poškození makromolekul mj. DNA a proteinů (*Li a Trush, 1994, Schweigert et al., 1999*). Katecholy mohou být zodpovědné za narušení funkce membrány. Za přítomnosti těžkých kovů a molekulárního kyslíku vedou k přetržení vláken DNA. Zlomy vláken DNA jsou způsobeny redoxní reakcí  $\text{Cu}^{2+}$  a katecholu. Bylo prokázáno, že katecholy působí i dalšími mechanismy, které vedou k poškození DNA. Jedním z příkladů mohou být strukturální chromozomové aberace (*Schweigert et al., 2000*). Katecholy vykazují inhibiční účinky na syntézu DNA v buněčné linii myšího lymfomu. Tyto účinky byly vysvětleny oxidativním poškozením a alkylací DNA (*Pellack-Walker et al., 1985, Schweigert et al., 2001*).



## 2.5 DERIVÁTY KATECHOLU

### 2.5.1 Přehled derivátů katecholu

Od obecné struktury katecholu je odvozeno velké množství derivátů rozmanité struktury. Najdeme mezi nimi jednak látky přírodního původu, ale i látky uměle syntetizované. Příkladem v přírodě se vyskytujícími derivátů katecholu jsou urushioly. Jejich struktura je odvozena od katecholu nahrazením vodíku v třetí pozici uhlovodíkovým řetězcem s 15 či 17 atomy uhlíku. Urushioly se nachází v rostlinách čeledi Anacardiaceae, zejména ve škumpě jedovaté. Působí v kůži jako silně dráždivý jedy a při kontaktu s kůží vyvolávají kontaktní dermatitidu (*Tilton, 2004*).

Velmi důležitou skupinou derivátů katecholu jsou katecholaminy. Jedná se o alkylaminoderiváty katecholu, které hrají důležitou roli v organismu mj. jako neurotransmitery a hormony (adrenalin, noradrenalin, dopamin). Mezi katecholaminy řadíme i řadu syntetických látek, které našly využití jednak jako léčiva např. krátce působící  $\beta$ -agonisté (SABA) a dlouhodobě působící  $\beta$ -agonisté (LABA), ale i jako látky zneužívané pro výrobu drog (např. MDMA).

Dalším příkladem jsou tzv. tea katechiny, které se nachází v zeleném čaji, který je produkován zejména v asijských zemích z listů rostliny *Camellia sinensis*. Předpokládá se, že právě katechiny přispívají velkou měrou k příznivým účinkům, které jsou čaji připisovány. Tea katechiny jsou účinnými antioxidanty a jejich působení se jeví jako velmi slibné v působení proti oxidačnímu poškození lipidů, proteinů a DNA. Bylo prokázáno, že katechiny vykazují antimikrobiální vlastnosti (*Higdon et al., 2003, Reygaert et al., 2018*).

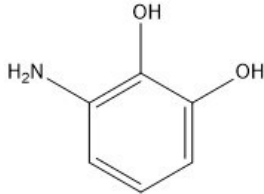
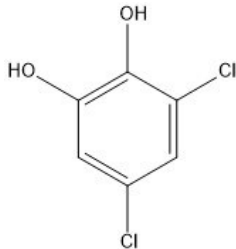
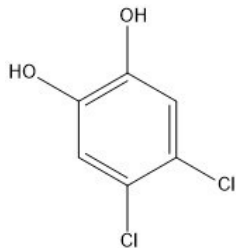
Díky přítomnosti katecholového jádra se předpokládá, že deriváty katecholu působí jako antioxidanty s protizánětlivým a antikarcinogenním účinkem (*Novotná et al., 2013*). Možný vliv těchto látek v rozvoji a progresi nádorových onemocnění není však doposud zcela prozkoumán.

### 2.5.2 Deriváty katecholu vybrané pro účely této práce

Pro účely této práce bylo testováno devět látek odvozených od obecné struktury katecholu. 3-aminokatechol je zástupce katecholaminů, jehož struktura vzniká substitucí katecholového jádra v poloze tři aminovou skupinou. 4-chloropyrokatechol

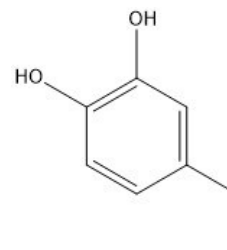
patří spolu s 3,5-dichlorokatecholem a 4,5-dichlorokatecholem mezi chlorokatecholy, které vz substitucí katecholu chlorem v příslušných pozicích. Dalšími vybranými zástupci jsou 4-ethylkatechol, 3-isopropylkatechol, 3-methylkatechol, jež vznikají substitucí vodíku katecholového jádra v poloze tři nebo čtyři příslušným alkylovým řetězcem. Posledními dvěma vybranými zástupci jsou 4-fluorokatechol a 4-nitrokatechol, jejichž struktura vzniká náhradou vodíku v poloze čtyři fluorem (4-fluorokatechol) či nitro skupinou (4-nitrokatechol). Většina uvedených derivátů má korozivní a dráždivé účinky na kůži a oči. Mohou vést k akutní toxicitě a k podráždění dýchacích cest. Vykazují také jisté riziko pro životní prostředí (**Tabulka 3**).

**Tabulka 3:** Vybrané deriváty katecholu, používané zkratky a vzorce látek

NÁZEV DERIVÁTU KATECHOLU, IUPAC-název	ZKRATKA	VZOREC
<b>3-aminokatechol,</b> 3-aminobenzene-1,2-diol	3- AC	
<b>3,5-dichlorokatechol,</b> 3,5-dichlorobenzene-1,2-diol	3,5-DC	
<b>4,5-dichlorokatechol,</b> 4,5-dichlorobenzene-1,2-diol	4,5-DC	

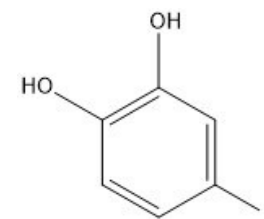
**4-ethylkatechol,**  
4-ethylbenzene-1,2-diol

4-EC



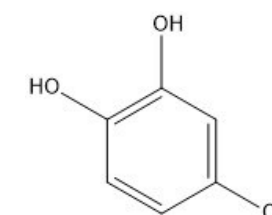
**4-fluorokatechol,**  
4-fluorobenzene-1,2-diol

4-FC



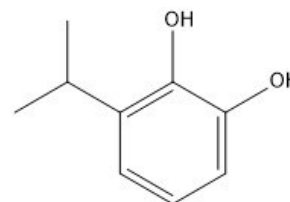
**4-chloropyrokatechol,**  
4-chlorobenzene-1,2-diol

4-CPC



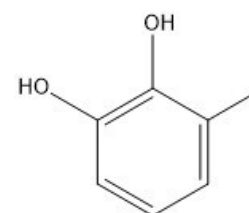
**3-isopropylkatechol,**  
3-isopropylbenzene-1,2-diol

3-IP



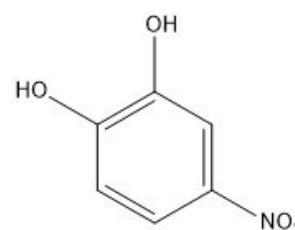
**3-metylkatechol,**  
3-methylbenzene-1,2-diol

3-M-12B



**4-nitrokatechol,**  
4-nitrobenzene-1,2-diol

4-NC



### **3 CÍL PRÁCE**

---

Cílem této diplomové práce je u devíti vybraných derivátů katecholu zhodnotit jejich cytotoxickou aktivitu ve dvou buněčných liniích karcinomu prsu MCF7 a následně studovat jejich vliv na genovou expresi ER.

## 4 METODICKÁ ČÁST

---

### 4.1 KULTIVACE BUNĚK

#### 4.1.1 Podmínky buněčné kultivace

Při kultivaci buněk *in vitro* se snažíme napodobovat podmínky v lidském organismu. Buňky jsou uchovávány v inkubátoru, který zajišťuje vhodné kultivační podmínky regulací teploty, vlhkosti a koncentrace CO<sub>2</sub>. Při buněčné kultivaci je nutno dodržet sterilní podmínky, které nám zajišťuje práce v laminárním boxu. Buňky se kultivují v kultivační nádobě spolu s médiem, které zásobuje buňky potřebnými živinami. Médium je komerčně dostupné, ale je třeba jej doplnit na finální podobu. Pro účely této práce bylo využito médium DMEM/F-12 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). K médiu se přidává fetální bovinní sérum (FBS), které podporuje růst buněčné kultury (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Typ fetálního bovinního séra FBS-CS se vyrábí filtrací přes absorpční filtr s aktivním uhlím, což vede ke snížení koncentrace steroidních hormonů v séru, a je tak vhodnější pro studium hormonální aktivity. K médiu se dále přidávají antibiotika (Penicilin/Streptomycin 10 000U/10mg/mL, St. Louis, MO, USA), které předcházejí kontaminaci a následné smrti buněčné kultury a insulin pro buněčnou kulturu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (**Tabulka 4**). Buňky v průběhu růstu vylučují do média metabolický odpad, a proto je nutná jeho pravidelná výměna 2-3 x týdně.

**Tabulka 4:** Složení kultivačního média pro buněčnou kulturu MCF7

		Původní koncentrace	Finální koncentrace
<b>DMEM/F-12</b>	500 mL	-	-
<b>FBS CS</b>	50 mL	-	10%
<b>Antibiotika</b>	5 mL	-	1%
<b>Insulin</b>	1.5 µL	2 mg/mL	6 ng/mL

#### 4.1.2 Pasážování buněk

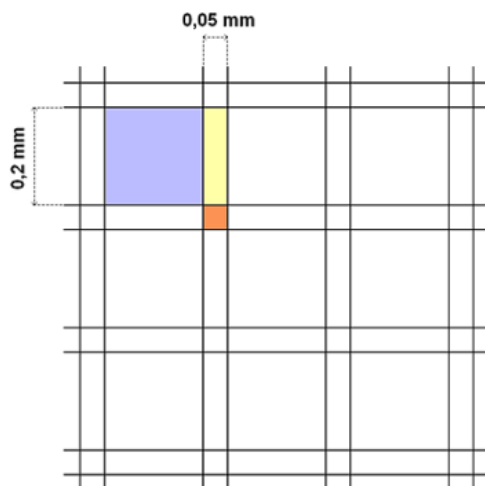
Pasážování buněk představuje uvolnění adherentních buněk od povrchu kultivační nádoby i od sebe navzájem a přenesení do nádoby s novým kultivačním

médiem. Pasážování je nutno provést tehdy, pokud buňky pokrývají přibližně 75-80 % povrchu kultivační nádoby. Je vhodné, aby byl nárůst buněk před pasážováním zkontrolován pomocí optického mikroskopu, a aby byly nachystány všechny potřebné pomůcky do laminárního boxu.

Z kultivační lahvičky se odsaje kultivační médium a přidá se 2-3 mL pufru PBS, který slouží k opláchnutí buněk. Poté se pufr odsaje a přidá se 1-2mL reagentu tryPLE™, který vede k enzymatické disociaci buněk od sebe navzájem i z povrchu kultivační lahvičky. Je důležité, aby tryPLE pokrýval kompletně celý povrch lahvičky. Následně se lahvička s buňkami ponechá po dobu přibližně 5 minut v inkubátoru. Vizuální kontrolou pod mikroskopem či proti světlu se ověřuje, zda jsou buňky odloučeny od stěny nádoby a „plavou“ volně v médiu. Do lahvičky se následně přidává přibližně 3 ml nahřátého média k neutralizaci tryPLU. V tomto bodě jsou buňky buďto nasazeny k experimentaci nebo dále kultivovány. Určitý poměr buněk je vždy přemístěn do nové lahvičky, do které se přidává přibližně dalších 7 mL média. Na lahvičku je napsán typ buněk, poměr a číslo pasáže. Buňky je třeba před umístěním do inkubátoru zkontrolovat pod mikroskopem. Pro tuto buněčnou linii se tento proces dle potřeby opakuje přibližně 1x týdně.

#### **4.1.3 Stanovení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky**

Do Bürkerovy komůrky se pipetuje 10  $\mu$ L suspenze buněk. Buňky se počítají v 16 malých čtvercích 0,20x0,20 mm v horní a dolní části komůrky. Za hranici čtverce se považuje prostřední linka z trojitě čáry. Z buněk, které leží na okraji čtverce, se počítají ty, které se i jen dotýkají levého nebo horního okraje, a naopak se nepočítají ty buňky, které se i jen dotýkají pravého nebo dolního okraje (**Obr. 10**). Následně se vypočítá počet buněk v 1ml suspenze (**Rovnice 1**).



**Obrázek 10:** Počítací síť Bürkerovy komůrky, převzato z: (Šafaříková, 2014).

**Rovnice 1:** Výpočet množství buněk na mililitr:

$$x = \frac{a \times 1000}{n \times V}$$

x = počet buněk v 1 mL suspenze

a = napočítaný počet buněk

n = počet počítaných malých čtverců

V = objem počítaného útvaru

#### 4.1.4 Nasazení buněk do mikrotitrační destičky

Po stanovení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky, se pro naše účely do 96-jamkové mikrotitrační destičky přidá 80 000 buněk na jamku, do 48-jamkové destičky pak 240 000 buněk na jamku. Následně se do 96-jamkové destičky přidá 100  $\mu$ l média, do 48-jamkové destičky 200  $\mu$ l média. Buňky se kultivují 48 h v inkubátoru a poté se mikrotitrační destička využije ke stanovení buněčné cytotoxicity nebo genové exprese.

## 4.2 STANOVENÍ CYTOTOXICKÉ AKTIVITY BUNĚK

### 4.2.1 Princip a základní metody stanovení cytotoxické aktivity buněk

Pro stanovení cytotoxické aktivity buněk existuje několik typů metod, které nám umožňují měřit životaschopnost buněk, jejich proliferaci, inhibici růstu a úmrtí. Jedna z nejčastěji používaných metoda je založena na redukci solí tetrazolia na barevné formazany, která probíhá díky mitochondriálnímu metabolismu. Tato metoda nám umožňuje zjistit rozdíl ve viabilitě mezi jednotlivými experimentálními skupinami buněk exponovaných na danou látku (*Promega corporation, 2001, Aslantürk, 2018*)

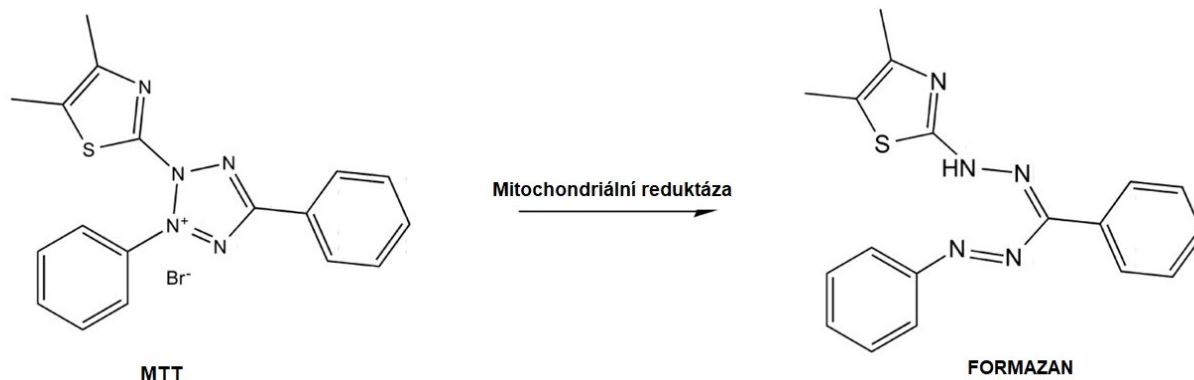
V minulosti se pro stanovení nejčastěji používala sloučenina tetrazolia - XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid. Bohužel XTT má omezenou rozpustnost a špatnou stabilitu v roztoku. Navíc postupy využívající XTT vyžadují denní přípravu čerstvých roztoků (*Scudiero et al., 1988*).

Dnes nejčastěji používanou látkou je MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid). Metoda za použití MTT je snadná na provedení, bezpečná a má vysokou reprodukovatelnost. Nevýhodou MTT je, že výsledkem jeho redukce je krystalická sraženina formazanu, která vyžaduje rozpuštění krystalů za použití organického rozpouštědla před zaznamenáním hodnot absorbance (*Aslantürk, 2018, Scudiero et al., 1988*).

Modifikací MTT je nová sloučenina tetrazolia – žlutá sůl MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium]M která se rovněž dehydrogenázami dýchacího řetězce redukuje na fialově zbarvený formazan (**Obr. 11**) (*Aslantürk, 2018*).

Princip reakce je založený na schopnosti buněk přeměnit sůl tetrazolia na zbarvenou sloučeninu formazanu s nejvyšším detekčním absorpčním maximem při 490 nm. Soli tetrazolia jsou kvartérní amoniové sloučeniny, jejichž přeměna probíhá pomocí aktivity dehydrogenáz a kofaktorů NADH A NADPH, které se nachází v mitochondriích buněk. MTS Assay je rychlá a snadná metoda, při které jsou eliminovány kroky solubilizace, protože vzniklý formazan je rozpustný v tkáňovém kultivačním médiu. Komponenty pro zkoušku jsou dodávány jako hotové, stabilní, zmrazené, sterilní roztoky, které jsou připraveny přímo k použití (*Promega corporation, 2001, Aslantürk, 2018*)

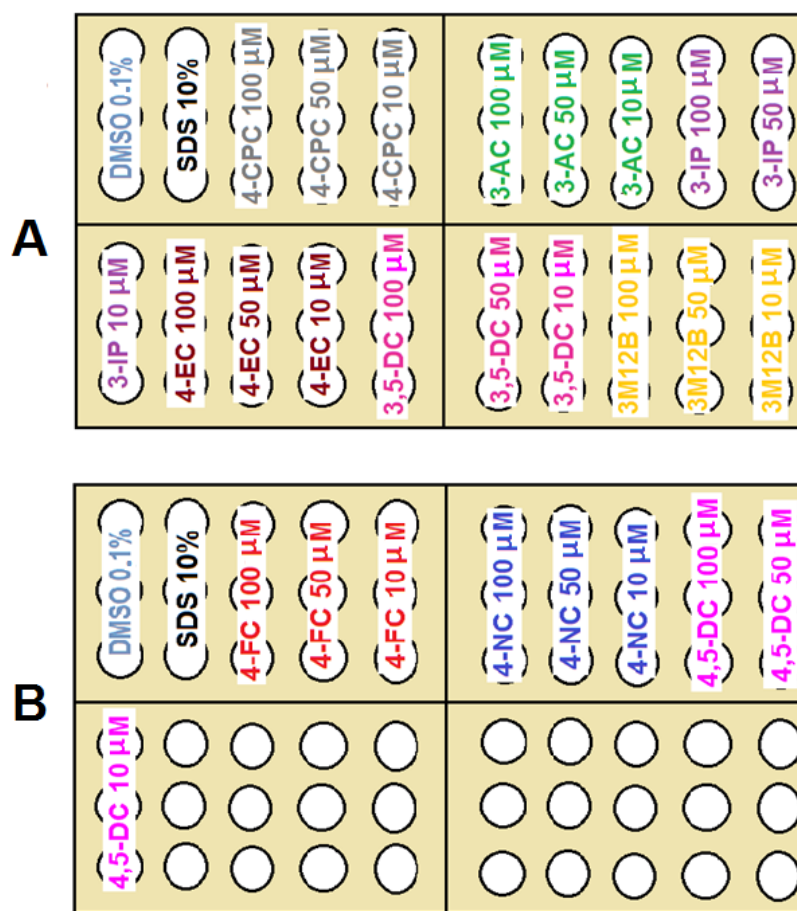




**Obrázek 11:** Redukce solí tetrazolia MTT (žlutý) na formazan (fialový) prostřednictvím mitochondriálního metabolismu.

#### 4.2.2 Metodický postup

Stanovení cytotoxické aktivity buněk bylo provedeno pomocí MTS Assay. Cytotoxická aktivita byla testována na dvou typech buněčných linií – MCF7/S0.5 a MCF7/182R-6 (rezistentní na fulvestrant). Po nasazení 96-jamkového plata buněk (80 000 buněk/jamka), které bylo ponecháno 48 h v inkubátoru, bylo z jednotlivých jamek odsáto médium. Následně byly přidány vzorky 9 testovaných látek ve třech koncentracích – 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M a 10  $\mu$ M v objemu 100  $\mu$ L/jamku. Látky se pipetovaly v triplicátech. V každém experimentu byl přidán dimethylsulfoxid 0.1 % (DMSO), jako vehikulum látek, dále jako pozitivní kontrola dodecylsírán sodný 10 % (SDS) (**Obr. 12**). Poté byla plata ponechána opět 48 h v inkubátoru. Po dvoudenní kultivaci bylo do jamek přidáno 20  $\mu$ l MTS činidla od firmy Promega (USA). Následně byla plata umístěna zpět do inkubátoru. Po 3 h byla měřena absorbance formazanu pomocí spektrofotometru při vlnové délce 490nm. Intenzita zabarvení odpovídá množství přítomných metabolizujících mitochondrií, tzn. množství vzniklého formazanu se snižuje s klesající viabilitou buněk.

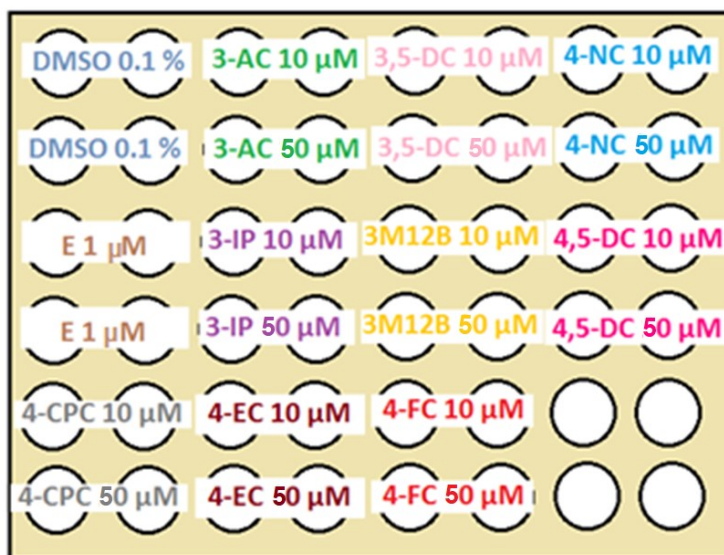


**Obrázek 12:** Vzor používaných 96-jamkových plat ke stanovení cytotoxicity.

## 4.3 GENOVÁ EXPRESE

### 4.3.1 Izolace mRNA

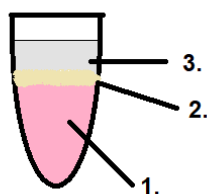
Izolaci mRNA předcházela buněčná kultivace. Do 48-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 240 000 buněk/jamku a přidáno 200  $\mu\text{L}$  média. Destička byla nechána v inkubátoru po dobu 48 h. Po uplynutí této doby bylo odsáto médium a přidáno 250  $\mu\text{L}$  zkoušené látky/jamčičku. Látky byly pipetovány ve dvou koncentracích (10  $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ ) a vždy v duplikátech (**Obr. 13**). Po uplynutí dalších 48 h bylo odsáto kultivační médium a pipetováno TRIzol™ činidlo (ThermoFisher, cat. Number: AM9738) v objemu 150  $\mu\text{L}$  na jamičku. Před pokračováním dalších kroků byla destička se vzorky zamrzena (-20 °C). Po rozmrazení byly vzorky inkubovány při laboratorní teplotě do kompletního rozpuštění přibližně po dobu 5 minut.



**Obrázek 13:** Vzor designu 48-jamkového plata pro izolaci mRNA. Zkoušené látky byly pipetovány v duplikátech, ve dvou koncentracích 10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ .

Vzorky byly přemístěny do 1.5 ml zkumavek a byl přidán chloroform v množství, který odpovídalo polovině celkového množství přidaného TRIzol™ činidla. Vzorky byly protřepány ručně, vortexovány po dobu 15 sekund a inkubovány 2-3 minuty při pokojové teplotě. Poté byly umístěny do centrifugy (12 000 g, 15 min, 4 °C). Po zcentrifugování byly ve zkumavce patrné tři oddělené fáze (**Obr. 14**). Průhledná fáze obsahující genetický materiál byla odebrána do nových 1.5 ml zkumavek a bylo k ní

přidáno 400  $\mu$ l isopropanolu. Po zvortexování byly vzorky 10 min inkubovány při laboratorní teplotě a následně byly centrifugovány (12 000 g, 15 min, 4 °C). Po zcentrifugování se objevila peleta mRNA, která byla očištěna od supernatantu a omyta 800  $\mu$ l 70 % ethanolu. Poté byla provedena poslední centrifugace vzorků (7 500 g, 5 min, 4°C). Po vyjmutí z centrifugy byla odstraněna většina ethanolu, zbytek se nechal odpařovat po dobu 5-10 minut při pokojové teplotě. Následně bylo k peletě přidáno 20  $\mu$ l beznukleázové vody a vzorky byly zhomogenizovány. Z jednotlivých vzorků byly odebrány 2  $\mu$ l do 0,5 ml zkumavky, které sloužily k měření čistoty a koncentrace izolované mRNA pomocí spektrofotometru.



**Obrázek 14:** Izolace mRNA pomocí TRIzol™ činidla, jednotlivé fáze oddělené po centrifugaci: 1. růžová fáze TRIzol™ činidla, 2. bílá monovrstva trosek mezi fázemi obsahující celulární debris, 3. vodná průhledná fáze.

## **4.3.2 Polymerázová řetězová reakce**

### **4.3.2.1 Charakteristika metody**

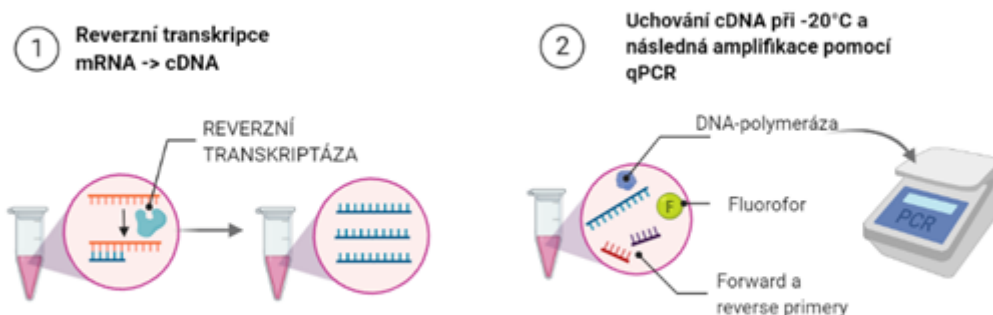
Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) je základní laboratorní metoda se širokým uplatněním, která byla zavedena americkým biochemikem Dr. Karym Banks Mullisem (*Mullis, 1990*). Od svého objevení se s postupem času tato metoda stala nedílnou součástí výzkumných laboratoří. PCR je široce využívána pro výzkum a diagnostiku nemocí, sekvenování genů či provádění sofistikovaných kvantitativních a genomických studií (*Garibyan et al., 2013*).

PCR je proces enzymatické replikace DNA v *in vitro* podmínkách. Cílem PCR je mnohonásobně amplifikovat vybraný úsek DNA, tzn. sekvenci genu, o kterou máme zájem. Zdrojem DNA mohou být různé tkáně či organismy včetně periferní krve, kůže, vlasů, slin, mikrobů atd. Reakce probíhá v termocykléru, který mění teplotu v požadovaných intervalech a detekuje signál sondy. Výhodou metody PCR je její jednoduchost a vysoká citlivost (*Garcia et al., 2005*).

Pokud je PCR použita k detekci přítomnosti nebo absence určitého produktu DNA, mluvíme o PCR kvalitativní, která se provádí např. za účelem klonování nebo identifikace patogenu. Naopak kvantitativní PCR nám detekuje množství vzorku specifické DNA či genu.

### **4.3.2.2 Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí**

Začlenění reverzní transkripce (RT) jako prvního kroku před PCR se používá tehdy, kdy je namísto DNA potřeba amplifikovat RNA (nejčastěji mRNA). Cílem RT-PCR je zjistit genovou expresi – aktivitu genu zájmu. Molekula mRNA se pomocí reverzní transkriptázy přepíše na molekulu cDNA, která se následně amplifikuje pomocí PCR a analyzuje (**Obr. 15**) (*Cavé et al., 2003*).



**Obrázek 15:** Reverse transcription PCR, upraveno z: *Biorender.com*.

#### 4.3.2.3 Thermo Fisher QuantStudio™ 6

##### 1. PŘÍPRAVA cDNA – REVERZNÍ TRANSKRIPCE

V ledu byl připraven mix pro reverzní transkripci ve zkumavce (**Tabulka 5**). Pro účely této práce byl využit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit od firmy ThermoFisher (Waltham, MA, USA). Všechny vzorky mRNA byly naředěné na stejnou koncentraci a pipetovány do stripu (3  $\mu$ L izolované mRNA) a následně bylo pipetováno 17  $\mu$ L připraveného mixu pro reverzní transkripci do konečného objemu 20. Byly nastaveny podmínky dané výrobcem – teplota a čas, pro správný průběh reverzní transkripce (**Tabulka 6**). Po skončení reakce bylo ke každému vzorku přidáno 100  $\mu$ L beznukleázové vody. Následně byly vzorky použity k PCR nebo zamrazeny při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabulka 5:** Složení mixu pro reverzní transkripci

MIX	Množství ( $\mu$ L)
Primer oligo (dT) nebo dNTP mix	1
5x RT pufr	4
RNAase inhibitor	1
Tetro Reverse Transkriptáza	1
DEPC-upravená voda	9

**Tabulka 6:** Podmínky reverzní transkripce – tři teplotní fáze

Čas	Teplota
10 min	25 °C
120 min	37 °C
5 min	85 °C

## 2. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE V REÁLNÉM ČASE

Nejprve byl připraven mix pro q-PCR – TaqMan Fast Advanced Master mix ThermoFisher (Waltham, MA, USA) (**Tabulka 7,8**). Jako cílové geny byly použity dva estrogen responsivní geny, a to estrogen receptor 1 (ESR1), který kóduje ER $\alpha$  a trefoil factor 1 (TFF1).

TFF1 je gen, který byl izolován z buněk karcinomu prsu. Původně byl TFF1 označován jako estrogen indukující rakovinu prsu (*Al-azzeah, 2001*), později pak jako peptid spojený s rakovinou prsu (*Rodrigues et al., 2003*). Je známo, že exprese genu TFF1 je přítomna až u 50 % nádorů prsu. Pozitivita karcinomu na TFF1 je spojena se stavem estrogenových receptorů a odpovědí na hormonální léčbu (*Foekens et al., 1990, Cappelletti et al., 1992*).

Pro hodnocení výsledků je nutno použít i housekeeping neboli referenční gen. Jedná se o gen, který je stabilně exprimován v cílové tkáni a proti kterému se určuje úroveň genové exprese. Vždy je třeba vybrat takový gen, který má podobný prahový cyklus (cycle of treshold, Ct) jako gen cílový (*Kozera a Rapacz, 2013*). Pro naše účely byl vybrán  $\beta$ -actin, který vykazuje stabilní expresi v tkáni karcinomu prsu (**Tabulka 9**).

Připravený mastermix byl před použitím krátce zvortexován a následně rozpipetován do PCR amplifikační destičky v množství 15 $\mu$ l. Dále bylo přidáno 5 $\mu$ l cDNA testovaných vzorků a směs byla rozsuspendována. Amplifikační destička (**Obr. 16**) byla zalepena folií, aby bylo zabráněno odpařování vzorku a krátce zcentrifugována. Následně byla umístěna do termocykléru.

**Tabulka 7:** Složení mixu pro q-PCR

Složení	Funkce
Taq DNA polymeráza	Prodlužování nukleotidového řetězce
Uracil-N glykosyláza (UNG)	Prevence falešně pozitivní amplifikace odstraněním začleněného uracilu
Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs) s deoxyuridintrifosfátem (dUTP)	dUTP pro aktivaci UNG
ROX barvivo	Interní referenční standart pro normalizaci fluorescenčního signálu
Optimalizovaný reakční pufr	Zvýšení účinnosti i specificity PCR

**Tabulka 8:** TaqMan Fast Advanced Mastermix Termofisher

MASTER MIX:	Množství na 1 vzorek (μl)
PCR voda	7,0
TaqMan Fast Advanced Mastermix	7,0
TaqMan primers	1,0

**Tabulka 9:** Primery a sondy Taq-Man. Cílové geny TFF1a ESR1, housekeeping gen β-actin.

TFF1 forward	TTGTGGTTTTTCCTGGTGTCA
TFF1 reverse	CCGAGCTCTGGGACTAATCA
TFF1 probe	CCAGTGTGCAAATAAGGGCT
ESR1 forward	AGCACCTGAAGTCTCTGGA
ESR1 reverse	GATGTGGGAGAGGATGAGGA
ESR1 probe	ACTTTGATCCACCTGATGGC
β-actin forward	GGAAATCGTGCGTGACATTAAG
β-actin reverse	AGCTCGTAGCTCTTCTCCA
β-actin probe	CTGGACTTCGAGCAAGAGATGGCC



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	DMSO 0.1 %	E <sub>10</sub> μM	4-CPC	3-AC	3-IP	4-EC	3,5-DC	4-FC	4-NC	3M12B	4,5-DC		⇒ <b>Bactin</b>
B	DMSO 0.1 %	E <sub>10</sub> μM	4-CPC	3-AC	3-IP	4-EC	3,5-DC	4-FC	4-NC	3M12B	4,5-DC		
C	DMSO 0.1 %	E <sub>10</sub> μM	4-CPC	3-AC	3-IP	4-EC	3,5-DC	4-FC	4-NC	3M12B	4,5-DC		⇒ <b>ESR1</b>
D	DMSO 0.1 %	E <sub>10</sub> μM	4-CPC	3-AC	3-IP	4-EC	3,5-DC	4-FC	4-NC	3M12B	4,5-DC		
E	DMSO 0.1 %	E <sub>10</sub> μM	4-CPC	3-AC	3-IP	4-EC	3,5-DC	4-FC	4-NC	3M12B	4,5-DC		⇒ <b>TFF1</b>
F	DMSO 0.1 %	E <sub>10</sub> μM	4-CPC	3-AC	3-IP	4-EC	3,5-DC	4-FC	4-NC	3M12B	4,5-DC		
G													
H													

**Obrázek 16:** Vzor amplifikační destičky pro q-PCR. Používané geny: β-actin, ESR1, TFF1 – pipetovány vždy ve dvou řadách pod sebe. Používané látky: 4-CPC, 3-AC, 3-IP, 4-EC, 3,5-DC, 4-FC, 4-NC, 3M12B, 4,5-DC – pipetovány pro každý gen v duplikátech pod sebe v koncentraci 10 μM nebo 50 μM. Kontroly: DMSO 0.1 %, E 10 μM – pipetovány pro každý gen v duplikátech pod sebe.

Před zahájením q-PCR bylo nutné nastavit vhodné podmínky pro správný průběh reakce. V rámci celé PCR byla přísně regulovaná teplota a čas (**Tabulka 10**).

**Tabulka 10:** Podmínky q-PCR

	Teplota	Čas
<b>Holding stage</b>	50 °C	2 min
	95 °C	2 min
<b>Cycling stage (40x)</b>	95 °C	1 s
	60 °C	20 s

#### 4.3.2.4 Fáze polymerázové řetězové reakce

PCR je cyklický proces řízené denaturace dvouřetězcové DNA (*dsDNA*) a následné renaturace řetězců se specifickými oligonukleotidy. V rámci cyklu se opakují tři základní fáze –denaturace teplotové DNA, annealingu primerů a elongace nových řetězců DNA (**Obr. 17**). Podmínky reakce závisí na použitém MasterMixu a jsou specifikovány výrobcem.

##### 1. FÁZE DENATURACE

Dochází k zahřátí reakční směsi na teplotu 95 °C po dobu 10–60 s. Při této teplotě se rozpadají vodíkové vazby mezi vlákny DNA, tzn. z molekuly *dsDNA* vzniká *ssDNA* (*Ghannam et al., 2021*).

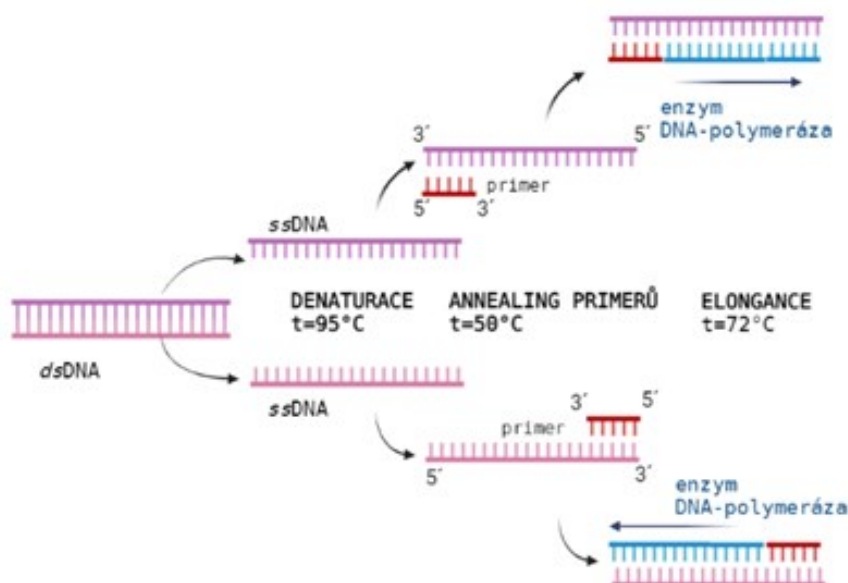
##### 2. HYBRIDIZACE (ANNEALING) PRIMERŮ

Primery, které obsahují cílovou sekvenci DNA, se komplementárně spojují s oběma vlákny jednořetězcové DNA. Hybridizace probíhá při teplotě 45-72 °C. Při vyšší teplotě by se primery málo hybridizovaly a produktu by se nevytvořilo dostatečné množství. Naopak při teplotě nižší by primery mohly nasedat i na sekvence DNA, které jsou komplementární jen z části a mohlo by docházet ke tvorbě nespecifického produktu (*Garibyan et al., 2013*). V našich podmínkách annealing primerů probíhal při teplotě 60 °C po dobu 20 s.

##### 3. ELONGACE DNA

Jedná se o syntetickou část cyklu, která probíhá při teplotě 72 °. Dochází k prodlužování nukleotidového řetězce pomocí enzymu DNA-polymerázy – ve směru 5' - 3' (*Ghannam et al., 2021*).

Dále následuje několik cyklů – obvykle 20–40. PCR je reakcí exponencionální, tzn. množství DNA se po každém cyklu zdvojnásobí. V průběhu amplifikace dochází k vyčerpávání složek reakce. Po určitém počtu cyklů dochází k tzv. fázi plató, kdy se koncentrace produktu již prakticky nemění. Výsledkem PCR je vytvoření dostatečného množství kopií sledovaného úseku DNA (*Ghannam et al., 2021*).



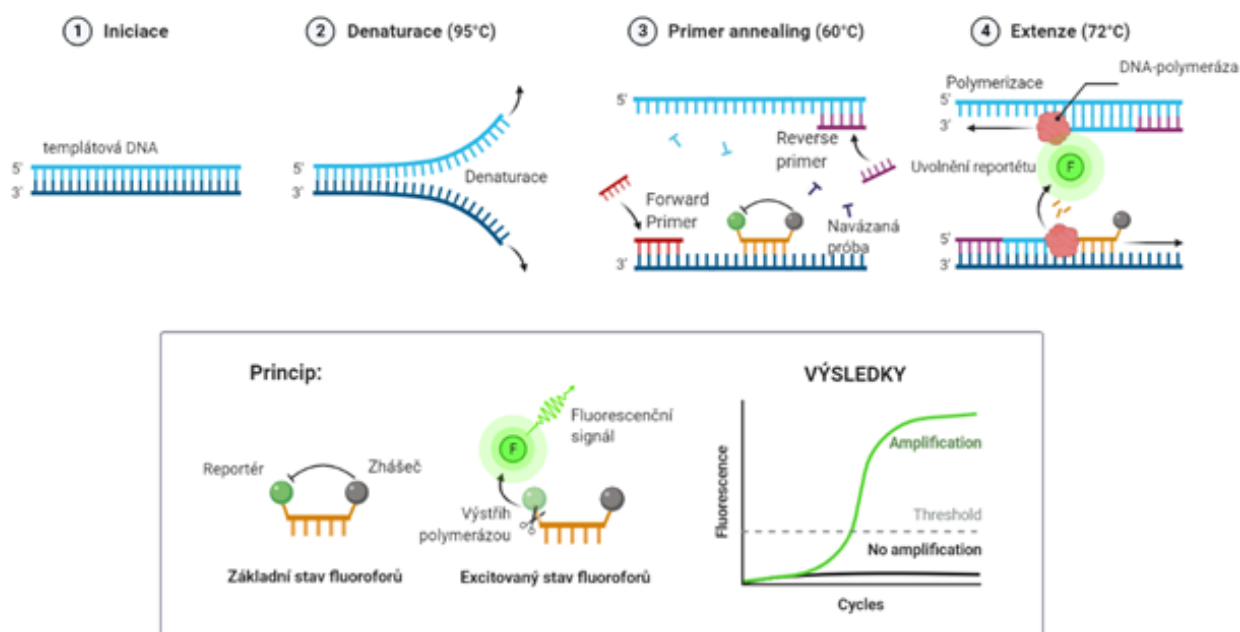
**Obrázek 17:** Fáze PCR: Denaturace, annealing primerů, elongace řetězce, upraveno z: *Biorender.com*.

#### 4.3.2.5 Polymerázová reakce v reálném čase

Real time PCR neboli polymerázová reakce v reálném čase (q-PCR) je zřejmě nejlepší metodou kvantitativní PCR. Při q-PCR dochází k měření množství nasyntetizované DNA po každém PCR cyklu. Používané přístroje jsou založeny na fluorescenčních metodách (*Takai et al., 2000*).

Detekce amplikonu může být specifická nebo nespecifická. Mezi nespecifické detekce se řadí mj. interkalační barviva, které se reverzibilně vážou na dsDNA (např. SYBR green, ethidium bromid). Dalším příkladem nespecifické detekce jsou LUX primery, Quencher labeled primers nebo amplifluor. Specifická detekce amplikonu je založena na použití lineárních nebo strukturních sond. V reakci byla použita lineární sonda „TaqMan“, která nese fluorescenční značení, tzv. reportér, a zároveň skupinu pohlcující fluorescenci, tzv. zhášec. Při reakci DNA – polymeráza syntetizuje vlákno od primeru ve směru 5'-3' (5'-3' dvouřetězcová exonukleázová aktivita DNA polymerázy). Postupně se přibližuje k sondě, která je hybridizovaná na templát DNA. U „TaqMan“ sondy je sloučena fáze annealingu a extenze do jediného kroku. Ve fázi extenze dochází k hydrolyze sondy, k odpojení zhášec od reportéru a následně k

irreverzibilní emisi fluorescenčního záření. Detekovaná fluorescence je následně pomocí PCR softwaru vyhodnocována a kvantifikována. Obecně platí, že čím vyšší je emitované záření, tím vyšší je koncentrace produktu (**Obr. 18**) (Takai et al., 2000, Ghannam et al., 2021).



**Obrázek 18:** Reverse transcription PCR (RT-PCR), upraveno z: *Biorender.com*.

K hodnocení výsledků reakce byla využita tzv. relativní kvantifikace, jejímž principem je porovnání relativní změny genové exprese v testovaném vzorku oproti kontrolnímu genu. Tento gen vykazuje stabilní expresi v cílových buňkách. Pro výpočet stanovení lze využít několik metod, z nichž nejčastěji využívanou je tzv.  $\Delta\Delta Ct$ . Tato metoda je vhodná při splnění podmínek shodné (či alespoň podobné) účinnosti primerů pro cílový i referenční gen. (**Rovnice 2**) (Schmittgen et al., 2008).

**Rovnice 2:** Rovnice pro hodnocení PCR pomocí metody  $\Delta\Delta Ct$ :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ vzorek} - \Delta Ct \text{ kontrola}$$

Kde  $\Delta Ct$ :

$$\Delta Ct = Ct \text{ cílový gen} - Ct \text{ referenční gen}$$

$$\text{Relativní exprese} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

## 5 VÝSLEDKY

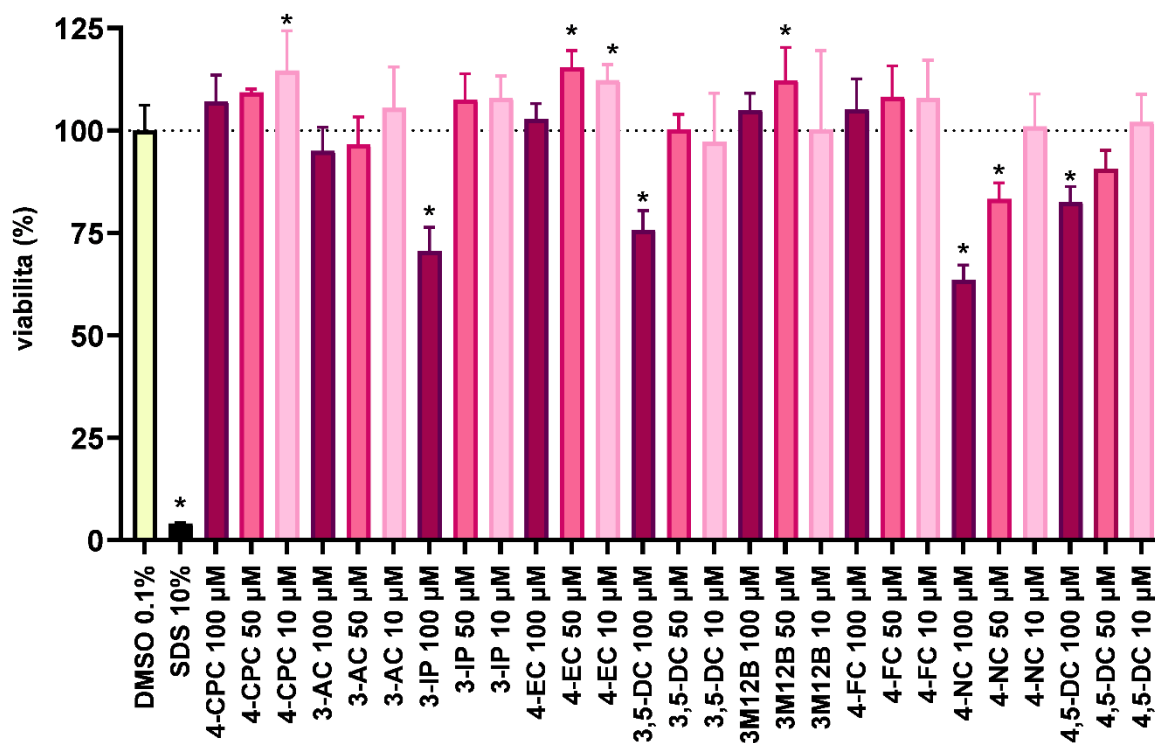
---

### 5.1 STANOVENÍ CYTOTOXICKÉ AKTIVITY

V první části této práce byl stanoven cytotoxický účinek vybraných látek. Cytotoxická aktivita byla zkoumána v buněčných liniích karcinomu prsu, a to nejprve v parenterální buněčné linii MCF7/S0.5, poté v přímém derivátu této buněčné linie, v linii rezistentní na fulvestrant MCF7/182R-6.

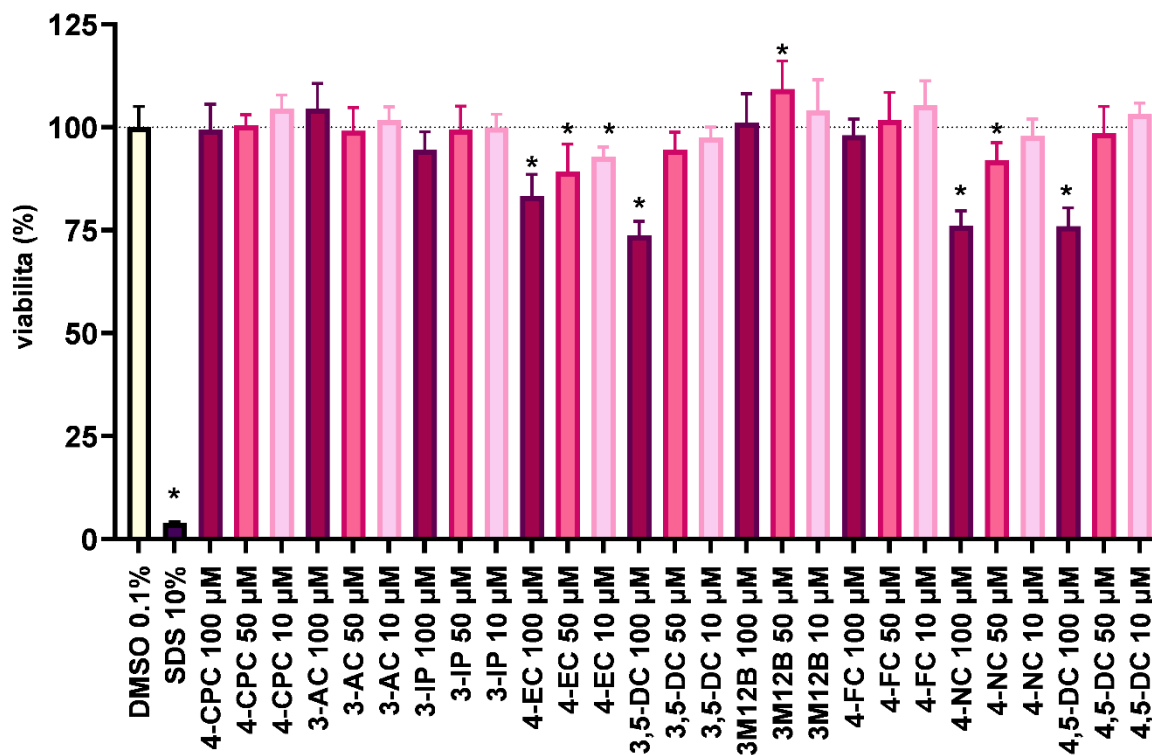
Cytotoxický účinek byl zkoumán za použití metody MTT assay. Při hodnocení výsledků byl využit DMSO 0.1 %, který byl používán jako vehikulum látek při jejich rozpouštění a při hodnocení stanovoval 100 % viabilitu buněk. Dále pak pozitivní kontrola SDS 10 %, jenž vedla k usmrcení buněk. Látky byly testovány v koncentracích 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ .

V buněčné linii MCF7/S0.5 pouze čtyři testované látky (3-IP, 3,5-DC, 4-NC a 4,5-DC) vykazovaly cytotoxickou aktivitu. Ve všech případech byla nejvyšší cytotoxicita pozorována v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  s viabilitou buněk okolo 70 %. V koncentraci 50  $\mu\text{M}$  již cytotoxicita těchto látek nebyla patrná, s výjimkou látky 4-NC, kde byla zjištěna viabilita okolo 80 %, ale v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  již tato látka nebyla cytotoxická. Ostatní deriváty nevykazovaly cytotoxické účinky v žádné z testovaných koncentracích. U některých látek, jako například u látky 4-CPC a 4-FC byl dokonce pozorován mírný proliferativní účinek (**Obr. 19**).



**Obrázek 19:** MTS Cell Viability Assay MCF7/S0.5. Graf vyjadřuje viabilitu buněk v % u jednotlivých testovaných látek. Údaje jsou vyjádřené jako průměr ± SD z devíti nezávislých experimentů. Statistický test one-way ANOVA, \*  $p < 0.05$ .

V buněčné linii MCF7/182R-6 byl stejně jako v buněčné linii MCF7/S0.5 cytotoxický účinek zjištěn u čtyř z testovaných látek, a to rovněž u 3,5-DC, 4-NC a 4,5-DC, navíc u látky 4-EC. Naopak látka 3-IP v této buněčné linii cytotoxicky nepůsobila. Jak se dalo předpokládat, nejvyšší cytotoxicita byla i zde pozorována v koncentraci 100 μM, kde se viabilita buněk pohybovala okolo 75 %. V koncentraci 50 μM cytotoxickou aktivitu vykazovaly pouze dvě látky, a to 4-EC a 4-NC. Jejich viabilita se v této koncentraci pohybovala přibližně okolo 90 %. V nejnižší testované koncentraci vykazoval cytotoxicitu již pouze 4-EC s viabilitou lehce nad 90 %. U látek 4-CPC, 3-AC, 3-IP, 3M12B a 4-FC nebyl pozorován cytotoxický vliv v žádné z testovaných koncentrací. U látky 3M12B byl dokonce pozorován mírný proliferativní účinek (**Obr. 20**).



**Obrázek 20:** MTS Cell Viability Assay MCF7/182R-6. Graf vyjadřuje viabilitu buněk v % u jednotlivých testovaných látek. Údaje jsou vyjádřené jako průměr ± SD z devíti nezávislých experimentů. Statistický test one-way ANOVA, \* p < 0.05

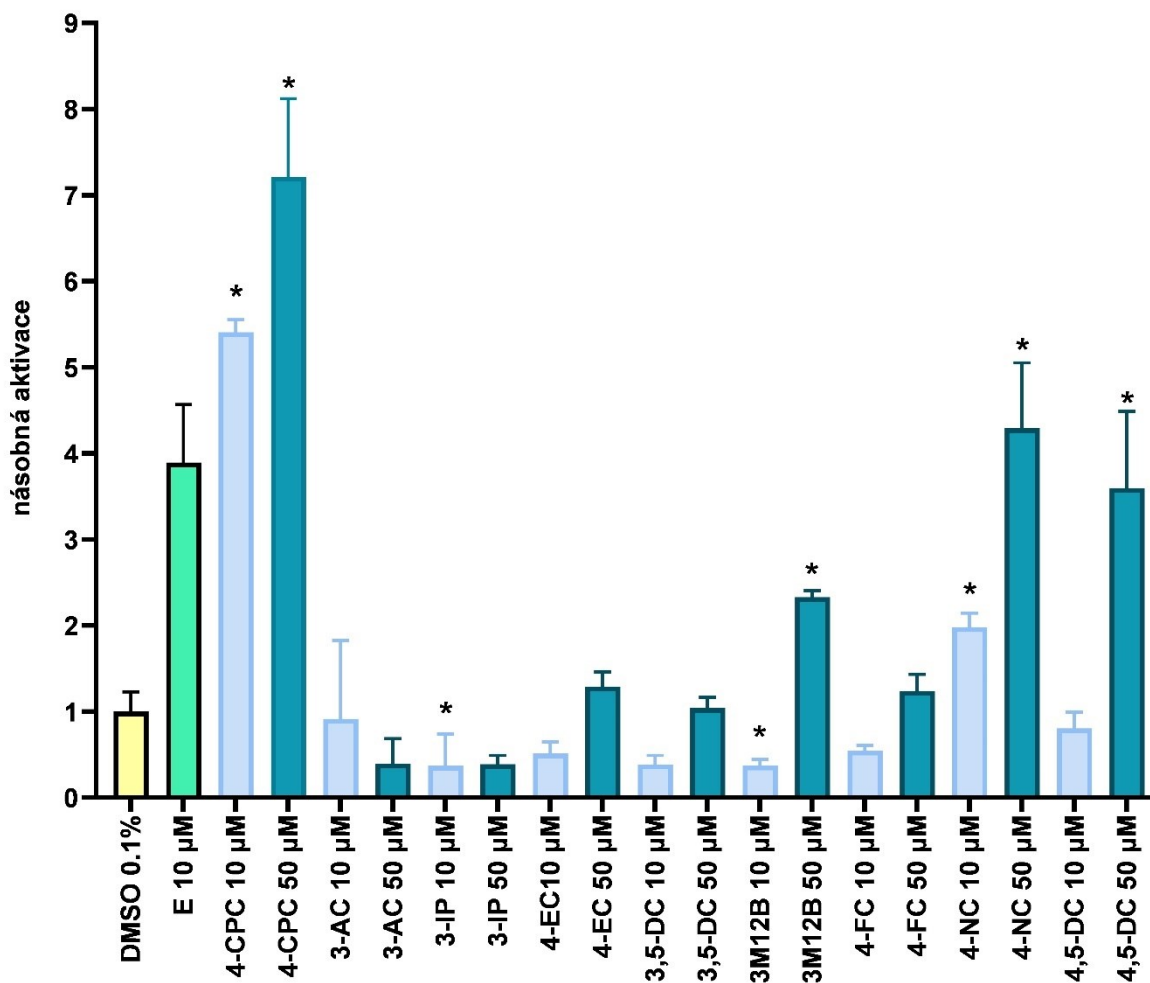
## **5.2 GENOVÁ EXPRESE**

V druhé části této práce byla studována genová exprese estrogen responsivních genů pomocí q-PCR, které předcházela RT. Pro hodnocení interakce testovaných látek s receptorem byly vybrány dva ER cílové geny, a to trefoil faktor 1 (TFF1) a estrogen receptor alpha (ESR1, ER $\alpha$ ). K hodnocení výsledků reakce byla využita tzv. relativní kvantifikace, jejímž principem je porovnání relativní změny genové exprese v testovaném vzorku oproti kontrolnímu genu, který vykazuje stabilní expresi v buňkách. V našem případě byl využit jako referenční gen  $\beta$ -actin.

Stejně jako stanovení buněčné cytotoxicity, i studium genové exprese bylo zkoumáno v obou zmíněných buněčných liniích karcinomu prsu, MCF7/S0.5 a MCF7/182R-6. Všechny látky byly testovány ve dvou koncentracích, a to v koncentraci 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M. Tyto koncentrace byly vybrány pro první screening z důvodu nízké či žádné toxicity. Ke kontrole sloužil DMSO 0.1 %, který byl použit jako vehikulum látek při jejich rozpouštění. Genová exprese byla porovnávána vůči estradiolu, přirozenému endogennímu ligandu ER, v koncentraci 10  $\mu$ M.

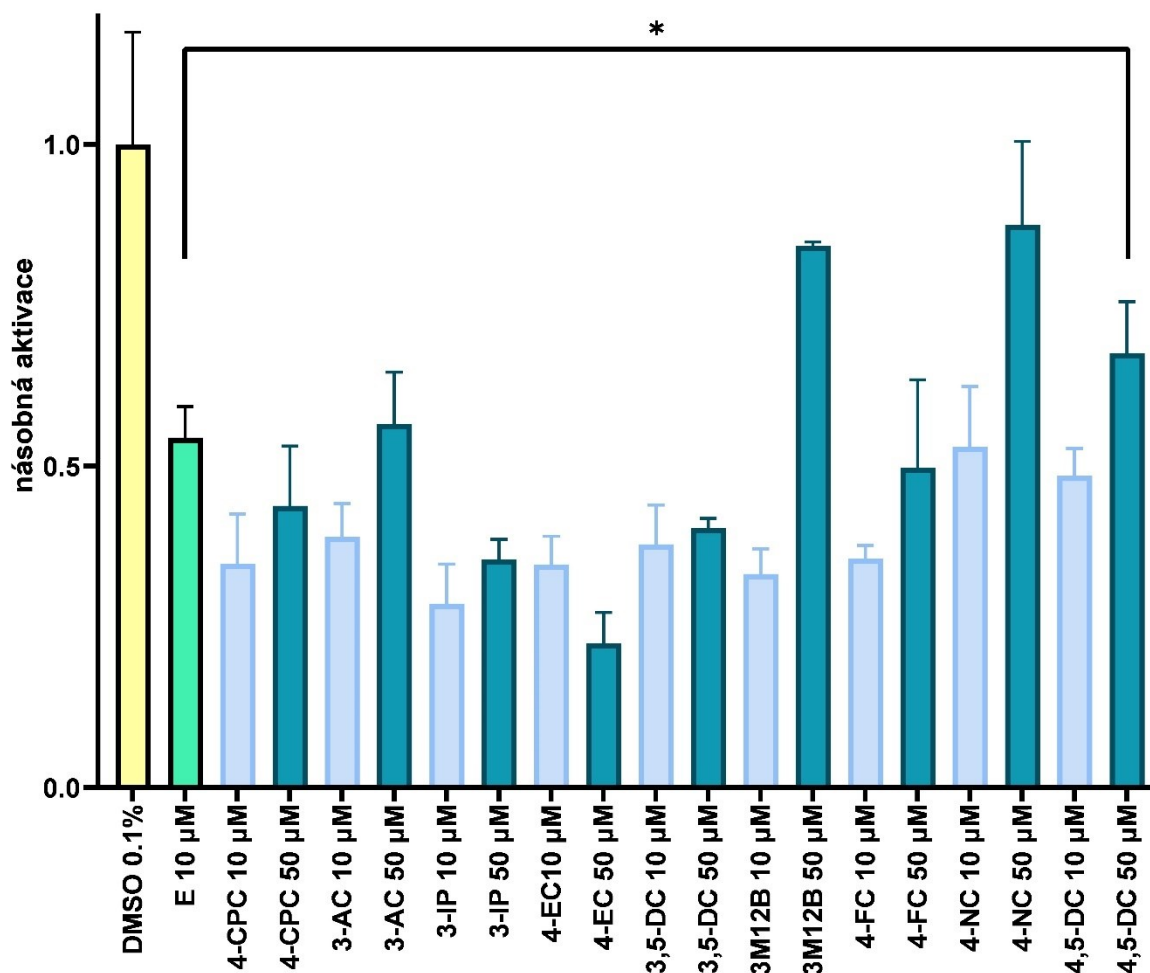
V obou buněčných liniích bylo téměř u všech testovaných látek patrné zvýšení násobné aktivace se zvyšující se koncentrací látek. Nejvyšší aktivace genu TFF1 v buněčné linii MCF7/S0.5 byla naměřena u látky 4-CPC, jenž dosáhla hodnoty násobné aktivace 7.2 a 5.4, a to v koncentraci 50  $\mu$ M a 10  $\mu$ M. Naopak estradiol v koncentraci 10  $\mu$ M dosahoval pouze násobné aktivace 4. Významná aktivace genu TFF1 byla patrná i u látky 4-NC, a to v obou testovaných koncentracích. Násobná aktivace 4-NC v koncentraci 50  $\mu$ M byla porovnatelná s pozitivní kontrolou estradiolem, ale v koncentraci 10  $\mu$ M byla zhruba poloviční. O něco nižší násobnou aktivaci oproti estradiolu vykazovaly látky 4,5-DC a 3M12B, ale pouze v koncentraci 50  $\mu$ M. Snížená aktivita oproti vehikulu, tzn. násobná aktivace nižší než jedna, byla pozorována u látek 3-AC a 3-IP, a to v koncentraci 10  $\mu$ M i 50  $\mu$ M. V koncentraci 10  $\mu$ M byla násobná aktivace nižší než u vehikula patrná i u látek 4-EC, 3,5-DC, 4,5-DC a 3M12B. S výjimkou látky 3-AC, pro všechny látky platilo, že vyšší testovaná koncentrace vykazuje silnější aktivaci cílového genu (**Obr. 21**).





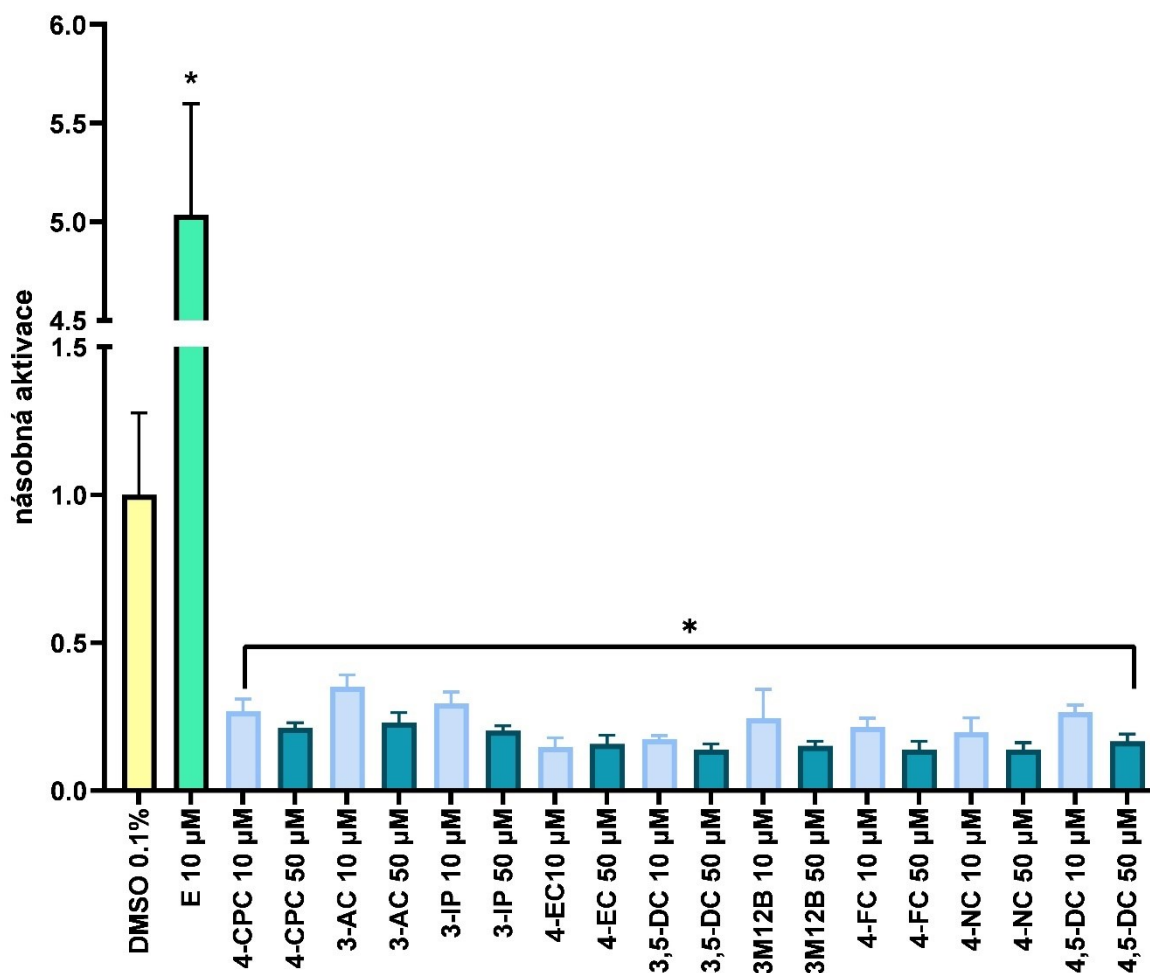
**Obrázek 21:** RT-qPCR pro gen TFF1 v buněčné linii MCF7/S0.5. Nejvyšší násobné aktivace dosahuje 4-CPC v obou testovaných koncentracích. Použitý statistický test one-way ANOVA, \* $p < 0.05$ . Výsledky jako průměry hodnot $\pm$ SD alespoň ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátech a vyjádřeny ve formě násobné aktivace oproti DMSO.

U genu ESR1 všechny testované látky ukázaly v buněčné linii MCF7/S0.5 represivní aktivaci, a to v obou testovaných koncentracích. Pozitivní kontrola estradiol vykazovala oproti vehikulu pouze poloviční aktivitu, a jen látky 3M12B, 4-NC, 3,5-DC měly o něco vyšší expresi. Porovnatelné násobné aktivace s estradiolem dosáhly látky 4-FC a 3-AC. Ostatní látky vedly oproti estradiolu k nižší aktivaci genu ESR1. I zde bylo u všech látek, s výjimkou 4-EC, patrné zvýšení hodnot násobné aktivace se zvyšující se koncentrací testovaných látek (**Obr. 22**).



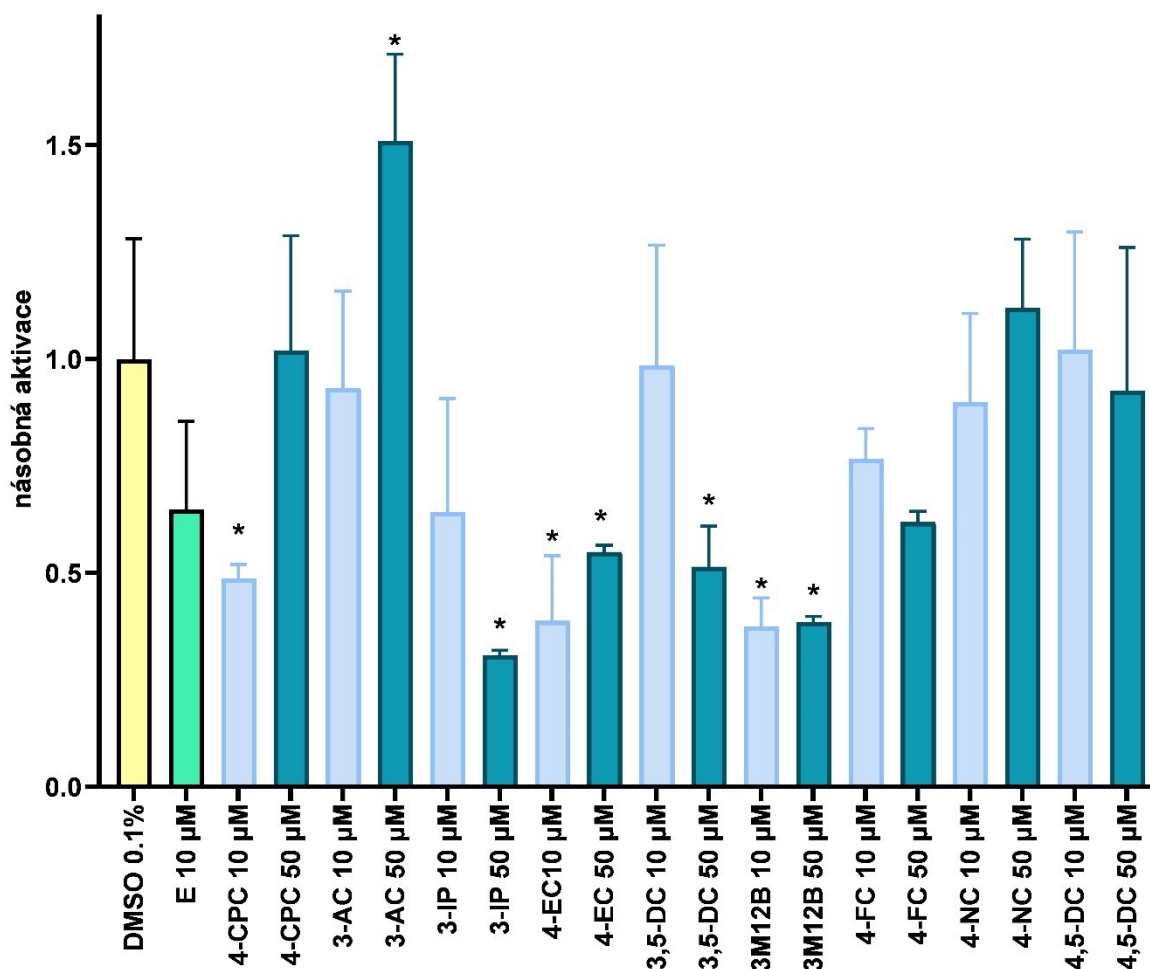
**Obrázek 22:** RT-qPCR pro gen ESR1 v buněčné linii MCF7/S0.5. Nejvyšších hodnot násobné aktivity dosáhly látky 3M12B, 4-NC a 4,5-DC v koncentraci 100 µM. Použitý statistický test one-way ANOVA, \* $p < 0.05$ . Výsledky jako průměry hodnot  $\pm$ SD alespoň ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátech a vyjádřeny ve formě násobné aktivity oproti DMSO.

Dalším krokem této práce bylo studium genové exprese v buněčné linii MCF7/182R-6. Výsledky studia aktivity genu TFF1 v této buněčné linii ukazují vysokou násobnou aktivaci estradiolu, která dosahuje hodnoty 5. U všech zkoušených katecholů byl pozorován významně represivní účinek. Nižší testované koncentrace měly lehce slabší represivní účinky než koncentrace vyšší (**Obr. 23**).



**Obrázek 23:** RT-qPCR pro gen TFF1 v buněčné linii MCF7/182R-6. Nejvyšších hodnot násobné aktivace dosáhla látka 3-AC v koncentraci 10 µM. Použitý statistický test one-way ANOVA, \* $p < 0.05$ . Výsledky jako průměry hodnot $\pm$ SD alespoň ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátech a vyjádřeny ve formě násobné aktivace oproti DMSO.

Exprese ESR1 v buněčné linii MCF7/182R-6 byla z velké části v souladu s daty u TFF1. S výjimkou látky 3-AC, která v koncentraci 50 µM dosáhla násobné aktivace 1.51, měly všechny látky srovnatelnou aktivitu s DMSO, anebo nižší. To je případ látek 3-IP, 4-EC a 3M12B. U látky 3-IP, 3,5-DC, 4-FC a 4,5-DC byly patrné vyšší hodnoty násobné aktivace v koncentraci 10 µM v porovnání s koncentrací 50 µM (**Obr. 24**).

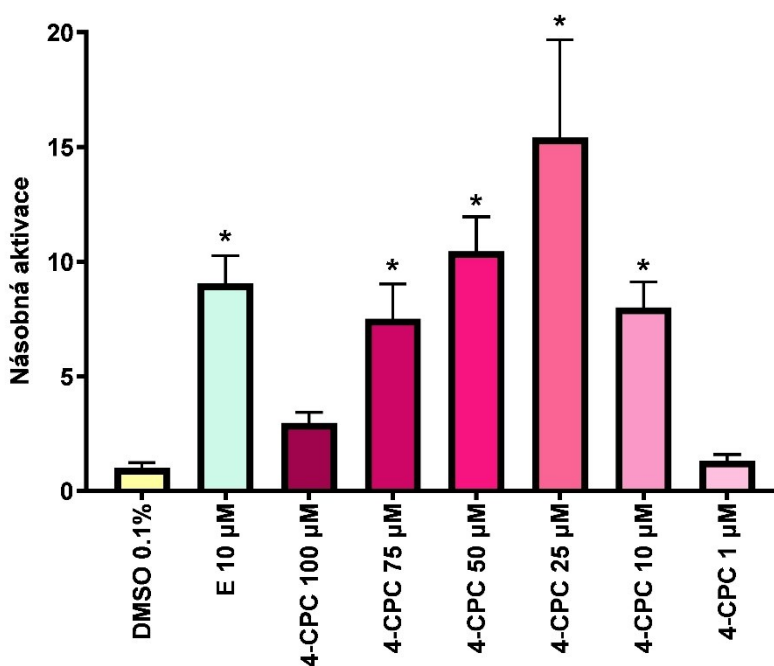


**Obrázek 24:** RT-qPCR pro gen ESR1 v buněčné linii MCF7/182R-6. Nejvýznamnější násobné aktivace opět dosáhla látka 3-AC v koncentraci 50 µM. Použitý statistický test one-way ANOVA, \* $p < 0.05$ . Výsledky jako průměry hodnot $\pm$ SD alespoň ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátech a vyjádřeny ve formě násobné aktivace oproti DMSO.

Z uvedených grafů je patrné, že hodnoty exprese studovaných genů závisí na koncentraci testovaných látek, kdy s rostoucí koncentrací by měly hodnoty násobné aktivace růst. Tato skutečnost platí pro většinu testovaných látek. Na základě těchto výsledků byla vybrána látka 4-CPC k podrobnějšímu studiu její aktivity, a to pouze v buněčné linii MCF7/S0.5. Tato látka vykazovala nejsilnější aktivaci genu TFF1 v této buněčné linii a zároveň nebyla pro buňky toxická v žádné z testovaných koncentracích.

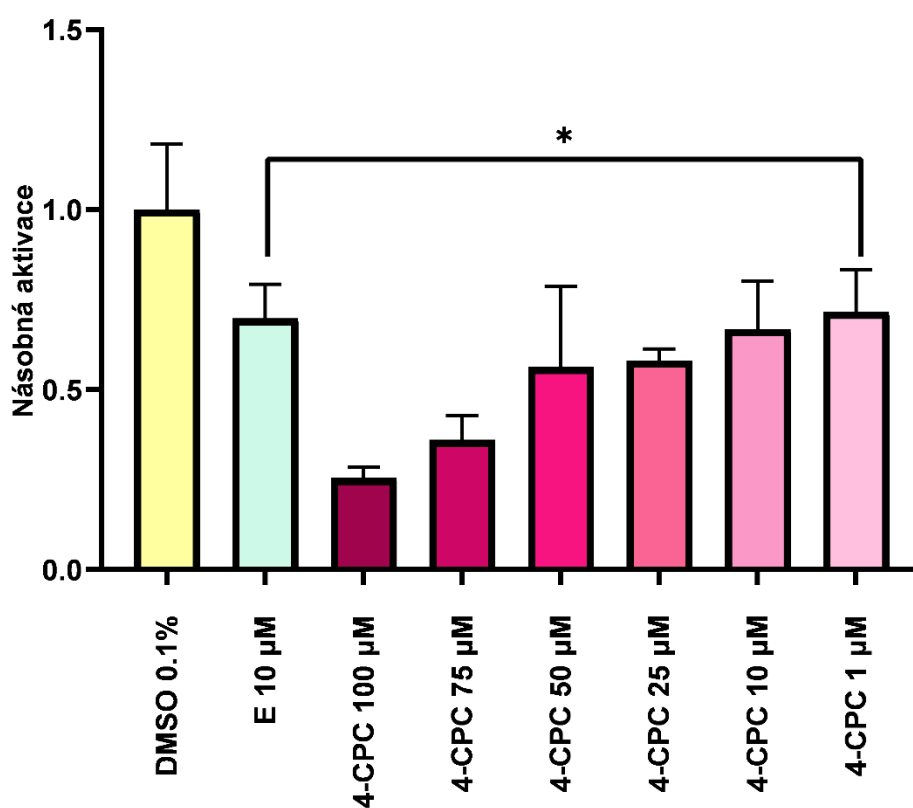
V následujících experimentech, byla zkoumána koncentrační závislost v šesti různých koncentracích (100  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ) a jejich aktivita byla opět porovnávána vůči estradiolu v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ .

Tyto experimenty vykazovaly u genu TFF1 zajímavý profil aktivace. V testovaných koncentracích byl pozorován „pyramidní“ profil výsledků. Nejvyšší aktivita genu TFF1 byla patrná v koncentraci 25  $\mu\text{M}$ , kdy násobná aktivace dosáhla hodnoty 15. Tato koncentrace ovlivňuje expresi genu TFF1 silněji než estradiol, který v těchto experimentech vykazoval lehce vyšší aktivitu oproti předchozím experimentům, ale dosahoval pouze přibližně 10-ti násobnou aktivaci. Zajímavé je, že vyšší testované koncentrace 4-CPC nevykazovaly silnější aktivaci než koncentrace 25  $\mu\text{M}$ , ačkoliv byla pozorována jasná aktivace genu. Na druhou stranu, jak se dalo předpokládat, nižší testované koncentrace ukázaly nižší aktivaci genu (**Obr. 25**). Výsledky v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  jsou v souladu s předchozími získanými daty.



**Obrázek 25:** RT-qPCR pro gen TFF1 v buněčné linii MCF7/S0.5. Koncentrační křivka látky 4-CPC. Nejvyšší násobná aktivace byla naměřena u látky v koncentraci 25  $\mu\text{M}$ . Použitý statistický test one-way ANOVA, \* $p < 0.05$ . Výsledky jako průměry hodnot $\pm$ SD alespoň ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátech a vyjádřeny ve formě násobné aktivace oproti DMSO.

Studium koncentrační závislosti aktivity 4-CPC bylo provedeno také pro gen ESR1. Výsledky ukázaly, že se snižující se koncentrací látky se exprese genu zvyšuje, ale pořád je patrný represivní efekt. Všechny testované koncentrace vykazovaly nižší regulaci genu v porovnání s vehikulem. V koncentraci 1  $\mu\text{M}$  dosáhl 4-CPC nejvyšší aktivaci genu, a to srovnatelnou s estradiolem 10  $\mu\text{M}$ . Exprese genu se postupně snižovala se zvyšující se koncentrací. Nejvyšší testovaná koncentrace 100  $\mu\text{M}$  vykazovala násobnou aktivaci okolo 0.25 (**Obr. 26**). Také v tomto případě jsou získané výsledky pro estradiol a 4-CPC v koncentraci 50  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  v souladu s předchozími získanými daty.



**Obrázek 26:** RT-qPCR pro gen ESR1 v buněčné linii MCF7/S0.5. Koncentrační křivka látky 4-CPC. Z grafu je patrné zvýšení hodnot násobné aktivace se snižující se koncentrací látky. Použitý statistický test one-way ANOVA, \* $p < 0.05$ . Výsledky jako průměry hodnot  $\pm$ SD alespoň ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátech a vyjádřeny ve formě násobné aktivace oproti DMSO.

## 6 DISKUZE

---

Katecholy jsou organické sloučeniny, které jsou přítomny i v lidském organismu, kde mj. vystupují jako prekurzory neurotransmiterů typu katecholaminů (*Schweigert et al., 2001*). Do organismu se dostávají i z jiných zdrojů jako např. z potravy či nápojů (ovoce, zelenina, čaj, káva) (*Freestone et al., 2007*). Díky přítomnosti dvou fenolických skupin vykazují tyto látky určitou strukturální podobnost s polyfenoly. Pro tento experiment bylo ke studiu interakce s ER vybráno devět látek odvozených od základní struktury katecholu. Jednalo se o látky 3-aminokatechol (3-AC), 3,5-dichlorokatechol (3,5-DC), 4,5-dichlorokatechol (4,5-DC), 4-ethylkatechol (4-EC), 4-fluorokatechol (4-FC), 4-chloropyrokatechol (4-CPC), 3-isopropylkatechol (3-IP), 3-methylkatechol (3M12B) a 4-nitrokatechol (4-NC).

Ke studiu aktivity těchto látek vůči ER byly vybrány nádorové buněčné linie MCF7, které přirozeně exprimují isoformu receptoru ER $\alpha$ , a to jednak parenterální linie MCF7/S0.5, která je adaptovaná na nízkou spotřebu fetálního bovinního séra (FBS), a její derivát rezistentní na fulvestrant MCF7/182R-6 (*Mladěnka et al., 2020*). Fulvestrant je analog estradiolu, který soupeří s endogenním estrogenem o vazbu na ER a zeslabuje jeho dimerizaci, čímž následně dochází k inhibici transkripce. Je využíván díky jeho silné inhibici růstu lidských buněk karcinomu prsu *in vitro* (*Curran et Wiseman, 2001*).

V obou buněčných liniích byla nejprve stanovena cytotoxicita všech vybraných derivátů katecholu. Vybrané koncentrace látek byly dostatečně vysoké, aby byla patrná případná toxicita. První dvě zkoumané koncentrace (100  $\mu$ M a 50  $\mu$ M) jsou mimořádně vysoké a je téměř jisté, že se nebudou v žádném případě vyskytovat v lidském organismu, ale vzhledem k bezpečnosti nabídnou důležitou informaci o látkách. I když se jedná o *in vitro* metodu, testování těchto látek poskytne cenné informace o potencionálních nepříznivých účincích při výskytu v lidském organismu. V obou buněčných liniích výsledky ukazují, že se zvyšující se koncentrací většiny testovaných látek se jejich cytotoxicita zvyšuje.

4-NC byl v koncentraci 100  $\mu$ M jednou z látek s nejvyšší zjištěnou cytotoxicitou, a to v obou buněčných liniích. S jeho snižující se koncentrací se viabilita buněk zvyšovala a v nejnižší testované koncentraci již cytotoxická aktivita nebyla patrná.

Vyšší citlivost buněk byla, v porovnání s buňkami rezistentními na fulvestrant, prokázána v linii MCF7/S0.5. Podobné chování vykazovaly další tři látky, a to 4,5-DC, 3,5-DC a 3-IP, avšak v nižší míře než 4-NC. Získané hodnoty ve viabilitě v linii MCF7/S0.5 se shodují s již dostupnými daty, kde autoři popsali cytotoxický účinek katecholů v nejvyšších testovaných koncentracích, naopak v nízkých koncentracích již cytotoxicita nebyla patrná (*Hrubša et al., 2022*). Data o viabilitě buněk rezistentních na fulvestrant v literatuře nebyla zatím popsána a tato získaná data jsou tak prvními vůbec.

Variabilních výsledků bylo získáno u 4-EC, který v buněčné linii MCF7/182R-6 vedl k signifikantní cytotoxicitě ve všech třech testovaných koncentracích, ale vždy s viabilitou přesahující 80 %. Naopak v buněčné linii MCF7/S0.5 nebyl cytotoxický účinek patrný či vykazoval i mírný proliferativní efekt.

U ostatních zkoušených látek (4-CPC, 3-AC, 3M12B a 4-FC) nebylo prokázáno významné snížení životaschopnosti buněk ani v jedné z testovaných buněčných linií, dokonce byl u některých z nich pozorován mírný proliferativní účinek. Dalo by se tedy konstatovat, že testované látky jsou pro lidskou buňku bezpečné. Prokázaná bezpečnost katecholů se shoduje s předchozími studiemi, kde látky pyrokatechol, 4-methylkatechol, 4-vinylkatechol a 4-ethylkatechol v koncentraci 30  $\mu\text{M}$  ve třech různých testovaných buněčných liniích nebyly toxické a opět měly v některých případech spíše mírně proliferativní účinky (*Senger et al., 2016*).

Následně byla podrobně prozkoumána schopnost těchto látek ovlivnit genovou expresi dvou ER cílových genů. Ke studiu aktivity byly vybrány dva cílové estrogen responsivní geny, a to jednak gen TFF1, který je indukován přímou interakcí s receptorem a gen ESR1, jenž kóduje isoformu receptoru  $\alpha$  (*Yi et al., 2020, Chisamore et al., 2009*). Uvedené dva geny jsou běžně používané v literatuře ke zjištění interakce látek s estrogením receptorem. Můžou nám také pomoci ke zjištění, zda interakce s receptorem probíhá přímou interakcí či jiným způsobem.

Na základě výsledků cytotoxických experimentů byly k testování aktivity katecholů vybrané koncentrace 10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ . Ačkoliv jsou tyto koncentrace poměrně vysoké, výhoda spočívá v tom, že mohou rozlišit přímé a nepřímé ligandy a jak bylo prokázáno, nejsou pro tento model toxické. Ve všech experimentech byl jako pozitivní kontrola používán endogenní estrogen estradiol v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a 10 nM. Avšak



v práci jsou uvedeny jen výsledky s estradiolem 10  $\mu\text{M}$  pro lepší porovnání se stejnomolárními koncentracemi látek.

Signifikantní aktivaci genu TFF1 vykazovaly v buněčné linii MCF7/S0.5 jen 4 testované látky (4-CPC, 3M12B, 4-NC, 4,5-DC). Z nich pouze látky 4-CPC a 4-NC vykazovaly aktivaci genu v obou testovaných koncentracích. U všech látek, s výjimkou 3-AC, je patrná silnější exprese genu TFF1 v koncentraci 50  $\mu\text{M}$  v porovnání s koncentrací 10  $\mu\text{M}$ . Zajímavé je, že aktivita látky 4-CPC převyšovala v obou testovaných koncentracích významně aktivitu estradiolu. Tyto výsledky naznačují přímou a silnou interakci této látky s receptorem. U ostatních katecholů nebyla v této buněčné linii vyzorována aktivace genu TFF1. Některé katecholy dokonce vykazovaly represivní účinek. Vzhledem k tomu, že tyto deriváty jsou strukturálně velice podobné, rozdílné chování jednotlivých molekul je zajímavé.

Na stejném genu byla aktivita látek studována i v buněčné linii MCF7/182R-6. Tato buněčná linie byla vybrána pro porovnání toho, jak blokace ER ovlivňuje aktivitu testovaných látek u ER responzivních genů (*Mladěnka et al., 2020, Jensen et al., 1999*). Výsledky ukazují, že exprese genu TFF1 byla výrazně nižší, a to jak proti pozitivní kontrole estradiolu 10  $\mu\text{M}$ , tak oproti vehikulu DMSO 0.1 %. Všechny testované látky vykazovaly podobné výsledky, včetně látky 4-CPC. Represivní účinek byl vždy výraznější u nejvyšší testované koncentrace, avšak signifikantní rozdíly mezi koncentrací 10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  nebyly patrné. Fulvestrant je kompetitivní antagonist ER, který na rozdíl od tamoxifenu nevykazuje žádné agonistické účinky na ER a má k ER mnohem vyšší afinitu (*McKeage et al., 2004*). Výsledky tudíž naznačují, že se tyto katecholy chovají jako přímé ligandy ER. Navíc je známo, že tato buněčná linie exprimuje izoformu receptoru  $\alpha$  v nižším množství oproti parenterální linii (*Jensen et al., 1999*), což je další faktor, který může hrát určitou roli v dosažených výsledcích. Právě v důsledku odolnosti buněk MCF7/182R-6 vůči fulvestrantu může tato buněčná linie vykazovat určitý rezistentní vliv i na testované deriváty katecholů.

Následně byl zkoumán vliv látek na expresi genu ESR1. Estradiol vykazoval represivní efekt na aktivitu tohoto genu. Zmíněný fenomén se může jevit jako neobvyklý, nicméně byl již popsán v literatuře, kde se jako jeden z možných důvodů uvádí přítomnost proteinu Sin3A, která může vést k potlačení estrogenem indukované aktivace genu ESR1 (*Ellison-Zelski et al., 2009*). V buněčné linii MCF7/S0.5 dosáhly

všechny testované látky nižších hodnot násobné aktivace genu ESR1 v porovnání s vehikulem, což naznačuje přímou interakci látek s receptorem. U čtyř látek byla patrná silnější aktivace genu v porovnání s estradiolem, a to u látek 3-AC, 3M12B, 4-NC a 4,5DC, avšak pouze ve vyšší testované koncentraci. Látka 4-CPC zde vykazovala mírné snížení násobné aktivace oproti pozitivní kontrole.

V buněčné linii MCF7/182R-6 vedl 4-CPC v koncentraci 50  $\mu\text{M}$  k vyšším hodnotám násobné aktivace genu ESR1 oproti estradiolu a patřil zde mezi látky s nejvyšší naměřenou aktivitou. Nicméně, podobně jako u genu TFF1, i v této buněčné linii byla většina výsledků pod hodnotami vehikula, což naznačuje negativní odezvu látek podobně jako u estradiolu. Kromě ovlivnění aktivity genu ESR1 ve fulvestrant rezistentní buněčné linii, kde byla naměřena vyšší aktivita v nižší testované koncentraci, platí, že vyšší koncentrace vedly k vyšším hodnotám násobné aktivace.

Na základě získaných dat při studiu genové exprese a velmi nízké naměřené toxicity byl vybrán 4-CPC k podrobnějšímu studiu. Jeho aktivita byla testována jen v buněčné linii MCF7/S0.5 v šesti různých koncentracích. U obou genů byla sledována závislost násobné aktivace na koncentraci testované látky. Z výsledků je patrné, že se zvyšující se koncentrací látky roste násobná aktivace genu TFF1, ovšem jen do koncentrace 25  $\mu\text{M}$ . V této koncentraci násobná aktivace dosáhla dokonce vyšší hodnoty v porovnání s estradiolem, který v těchto experimentech vykazoval o něco vyšší aktivitu oproti experimentům předchozím. Ve vyšších testovaných koncentracích se již exprese genu TFF1 se zvyšující koncentrací snižovala, avšak násobná aktivace byla stále silná. Tento efekt je zajímavý a může naznačovat saturační efekt na expresi tohoto genu. Jen koncentrace 1  $\mu\text{M}$  vykazovala expresi podobnou vehikulu. V důsledku toho lze předpokládat i jiný mechanismus účinku této látky, než pouze přímou interakci s ER. Naopak u genu ESR1 je zřetelný mírný pokles násobné aktivace se zvyšující se koncentrací látky. Z již popsaného fenoménu represivní aktivace je patrné, že vysoké koncentrace měly silnější represivní účinek, a tento efekt byl snížen se snižující se koncentrací. Nejnižší testovaná koncentrace vykazovala výsledek podobný jako estradiol, což naznačuje vysokou efektivitu tohoto derivátu. Všechny testované koncentrace spolu s estradiolem vykazovaly nižší regulaci v porovnání s vehikulem. Jak již bylo zmíněno výše, represivní efekt estradiolu na ESR1 již byl v literatuře popsán (*Ellison-Zelski et al., 2009*). Z těchto výsledků plyne, že 4-CPC je silný a přímý ligand ER.

Z výše popsaných výsledků je patrné, že různá substituce katecholového jádra může vést k odlišným aktivitám látek. Díky přítomnosti dvou hydroxylových skupin na aromatickém jádře vykazují testované látky strukturní podobnost s polyfenoly, u kterých je již znám jejich vliv na snížení incidence rakoviny prsu (*Dayem et al., 2016, Scalbert et al., 2002*). O vlivu katecholů na rozvoj a progresi karcinomu prsu doposud není v literatuře mnoho informací dostupných. Z výsledků je patrné, že testované látky jsou silnými přímými ligandy ER, ale řada z nich nejspíše vykazuje i nepřímé účinky. Tudíž lze předpokládat, že testované látky mohou hrát potencionální roli v rozvoji karcinomu prsu. Na druhou stranu, interakce těchto látek s ER může být využita např. při stavech s nedostatkem estrogenů, které mohou negativně ovlivňovat mnoho orgánových systémů.

## **7 ZÁVĚR**

---

V této diplomové práci byla studována interakce devíti vybraných látek odvozených od základní struktury katecholu s ER a také jejich cytotoxicita. Bylo konstatováno, že pokles ve viabilitě buněk je závislý na koncentraci testovaných látek, a to tak, že se snižující se koncentrací látek, klesá i jejich cytotoxický účinek. Z výsledků lze soudit, že všechny testované látky můžeme považovat za bezpečné. Nejvyšší cytotoxická aktivita (viabilita 63,7 %) byla patrná u látky 4-NC, a to v obou zkoumaných buněčných liniích. Výsledky ovlivnění genové exprese byly poměrně variabilní, a to jak v závislosti na typu buněčné linie, tak i na typu cílového genu. Nejúčinnější molekulou byla látka 4-CPC, která v buněčné linii MCF7/S0.5 vykazovala silnější aktivaci genu TFF1 než estradiol a u genu ESR1 byla aktivace s estradiolem srovnatelná. Výsledky v buněčné linii, u kterých je aktivita ER blokována fulvestrantem, naznačují, že tyto látky interagují s receptorem přímým způsobem. Tato skutečnost by ovšem měla být potvrzena v doplňujících experimentech (LanthaScreen ER assay, Western-Blot atd.), které nebyly součástí této diplomové práce. Na první pohled výsledky ukazují, že tyto látky jsou silnými ligandy ER, a tudíž mohou, pokud se zjistí jejich výskyt v organismu, hrát roli v rozvoji karcinomu prsu. Nicméně funkce ER jsou rozmanité, a ne všechny jsou nežádoucí, jako je tomu např. u karcinomu prsu. Deficit estrogenů v lidském organismu postihuje mnoho orgánových systémů, především pak kardiovaskulární systém, urogenitální trakt, kostní hmotu a pravděpodobně i kognitivní funkce. Právě u těchto zmíněných stavů by mohly být využity potencionální agonistické účinky na ER testovaných látek, a to především v postmenopauzálním období u žen.

## **8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

---

- Abdal Dayem A, Choi HY, Yang GM, Kim K, Saha SK, Cho SG. The Anti-Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells: Molecular Mechanisms. *Nutrients*. 2016, 21;8(9):581.
- Adhami M, Haghdoost AA, Sadeghi B, Afshar RM. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. *Breast Cancer*, 2018, 25(2), 198-205.
- Al-azzeah ED. Gene regulation of the ruman Trefoil Factor Family (TFF) in gastrointestinal Cell lines. PhD Thesis. Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 2001.
- Aslantürk, ÖS. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*. 2018, 2, 64-80.
- Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. 2005; 19(4):833-42
- Cappelletti V, Coradini D, Scanziani E, Benini E, Silvestrini R, Di Fronzo G. Prognostic relevance of pS2 status in association with steroid receptor status and proliferative activity in node-negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 1992;28A(8-9):1315-8
- Carazo Fernández A, Smutny T, Hyrsová L, Berka K, Pavek P. Chrysin, baicalein and galangin are indirect activators of the human constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicol Lett*. 2015; 233(2):68-77.
- Cavé H et al. RT-PCR in clinical diagnosis. 2003, 61(6):635-44.
- Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015, 35(6):3147-54.
- Crisp T et al. Special report on environmental endocrine disruption., *Risk Assessment Forum*.1997, str.1.
- Curran M, Wiseman L. Fulvestrant. *Drugs*. 2001, 61(6), 807-813
- Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer*. 2017, 8(16):3131-3141.

- di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(5):297-343.
- Dodds E et al. OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds. *Nature* 141. 1938, 247–248.
- Droog M, Beelen K, Linn S, Zwart W. Tamoxifen resistance: from bench to bedside. *Eur J Pharmacol.* 2013; 717(1-3):47-57.
- Ellison-Zelski SJ, Solodin NM, Alarid ET. Repression of ESR1 through actions of estrogen receptor alpha and Sin3A at the proximal promoter. *Mol Cell Biol.* 2009, 29(18):4949-58.
- Filardo EJ, Thomas P. G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology.* 2012, 153(7), 2953–2962.
- Foekens JA, Rio MC, Seguin P, van Putten WL, Fauque J, Nap M, Klijn JG, Chambon P. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res.* 1990,1;50(13):3832-7.
- Freestone PP, Walton NJ, Haigh RD, Lyte M. Influence of dietary catechols on the growth of enteropathogenic bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2007, 119(3).
- Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019; 116: 135-170.
- Garcia JG, Ma SF. Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S429-32.
- Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 2013, 133(3):1-4.
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 1952, 12: 264-265
- Ghannam MG, Varacallo M. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. 2021 May 9. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022
- Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000;14(2):121-41.

- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986, 231(4742), 1150–1154.
- Hall JE. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2011.
- Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003; 43(1):89-143.
- Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(4):215.
- Hrubša M et al. Comparison of Antiplatelet Effects of Phenol Derivatives in Humans. *Biomolecules*. 2022; 12(1):117.
- Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. 2001; 38:103–116.
- Chan KK et al. Targeting estrogen receptor subtypes (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) with selective ER modulators in ovarian cancer. *J Endocrinol*. 2014; 221(2):325-36.
- Chisamore MJ, Cunningham ME, Flores O, Wilkinson HA, Chen JD. Characterization of a novel small molecule subtype specific estrogen-related receptor alpha antagonist in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*. 2009, 4(5):e5624.
- Jensen BL, Skouv J, Lundholt BK, Lykkesfeldt AE. Differential regulation of specific genes in MCF-7 and the ICI 182780-resistant cell line MCF-7/182R-6. *Br J Cancer*. 1999;79(3-4):386-392.
- Jensen BL, Skouv J, Lundholt BK, Lykkesfeldt AE. Differential regulation of specific genes in MCF-7 and the ICI 182780-resistant cell line MCF-7/182R-6. *Br J Cancer*. 1999; 79(3-4):386-92.
- Jensen EV, Desombre ER, Kawashima T, Suzuki T, Kyser K, Jungblut PW. Estrogen-binding substances of target tissues. *Science*. 1967, 158(3800), 529–530
- Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, & DeSombre ER. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968, 59(2), 632–638
- Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015, 29(4):557-68.

- Jordan VC, The development of tamoxifen for breast cancer therapy. In: Jordan VC, ed. Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison: University of Wisconsin Press, 1994, 3-26.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. J Appl Genet. 2013; 54(4):391-406.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci USA. 1996, 93(12), 5925–5930.
- Kujanová H., Sýkora V., Pitter P. Látky s estrogením účinkem ve vodách, Chem. Listy 101, 2007, 706–712.
- Kumar R et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. J Amino Acids. 2011, 812540
- Lasfargues EY, Ozzello L, Cultivation of human breast carcinomas. J Natl Cancer Inst. 1958, 21: 1131-1147.
- Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. J Natl Cancer Inst. 2015; 107(7):djv073.
- Li S, Li Y, Wen Z, Kong F, Guan X, Liu W. [Retracted] microRNA-206 overexpression inhibits cellular proliferation and invasion of estrogen receptor  $\alpha$ -positive ovarian cancer cells. Mol Med Rep. 2021; 24(3):640.
- Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. Cancer Res. 1994; 54(7 Suppl):1895-1898.
- Liang J, Shang Y. Estrogen and cancer. Annu Rev Physiol. 2013, 75, 225–240.
- Lykkesfeldt AE, Larsen SS, Briand P. Human breast cancer cell lines resistant to pure anti-estrogens are sensitive to tamoxifen treatment. Int J Cancer. 1995; 61(4):529-34.
- Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. Curr Genomics. 2006, 7(8), 497–508.
- Mladěnka P et al. Interaction of 2, 6, 7-trihydroxy-xanthene-3-ones with iron and copper, and biological effect of the most active derivative on breast cancer cells and erythrocytes. Applied Sciences. 2020, 10(14), 4846.
- Mokbel K, Mokbel K. Chemoprevention of Breast Cancer With Vitamins and Micronutrients: A Concise Review. In Vivo., 2019, 33(4):983-997.



- Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990; 262(4):56–61.
- Novotná B, Borská L, Fiala Z, Krejsek J. Využití biologické aktivity quercetinu v léčbě onkologických onemocnění. 2013, 7(5): 248-251
- Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Ann Rev. Med*. 2011; 62: 233 – 247.
- Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *British journal of cancer*. 2004, 2-6.
- Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 1998, 339.22: 1609-1618.
- Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treatment and Research*. 2000, 103 57–75.
- Pellack-Walker P, Walker JK, Evans HH, Blumer JL. Relationship between the oxidation potential of benzene metabolites and their inhibitory effect on DNA synthesis in L5178YS cells. *Mol Pharmacol*. 1985; 28(6):560-6.
- Pfitzner R. Hormonální léčiva a jiné endogenní disruptory, 2010, Bakalářská práce, PŘF Univerzita Karlova v Praze.
- Protocol A. General. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Promega corporation, USA, 2001.
- Reygaert WC. Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *Biomed Res Int*. 2018; 2018:9105261.
- Rodrigues S et al. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 2. 2003, 4488–4497.
- Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JA, Baldet P & Rochefort H, Decrease d expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Research*. 2001, 61: 2537–2541.
- Saji S, Omoto Y, Shimizu C, et al. Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res* 2002, 62(17):484-e53.

- Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* 2015; 356:231-43.
- Scalbert A , Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2002, 56(6), 276-282.
- Scudiero DA et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. 1988; 48(17):4827-33.
- Senger DR, Li D, Jaminet SC, Cao S. Activation of the Nrf2 Cell Defense Pathway by Ancient Foods: Disease Prevention by Important Molecules and Microbes Lost from the Modern Western Diet. *PLoS One.* 2016; 11(2):e0148042.
- Séralini G, Moslemi S. Aromatase inhibitors: past, present and future. *Mol Cell Endocrinol.* 2001, 178(1-2):117-31.
- Scheidereit C, Krauter P, von der Ahe D, Janich S, Rabenau O, Cato AC, Beato M. Mechanism of gene regulation by steroid hormones. *J Steroid Biochem.* 1986, 24(1), 19–24.
- Schmittgen T. D., Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols.* 2008, 3(6), 1101-1108.
- Schrager S, Potter BE. Diethylstilbestrol exposure. *Am Fam Physician.* 2004 May; 69(10):2395-400.
- Schweigert N, Belkin S, Leong-Morgenthaler P, Zehnder AJ, Eggen RI. Combinations of chlorocatechols and heavy metals cause DNA degradation in vitro but must not result in increased mutation rates in vivo. *Environ Mol Mutagen.* 1999; 33(3):202-10.
- Schweigert N, Zehnder AJ, Eggen RI. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ Microbiol.* 2001; 3(2):81-91.
- Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2001; 11(5):339-52.
- Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973, 51: 1409-1413.
- Šafaříková K. In vitro testování toxicity, proliferace a viability buněk, 2014

- Takai K, Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(11):5066-72.
- Tan YL et al. Ferrocenyl catechols: synthesis, oxidation chemistry and anti-proliferative effects on MDA-MB-231 breast cancer cells. 2012, 7537-7549.
- Tilton B. *Wilderness First Responder: How to Recognize, Treat, and Prevent Emergencies in the Backcountry.* Rowman & Littlefield. 2010.
- Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev.* 1993;14(4):459-79.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.* 2005; 227(2):115-24.
- Tung NM, Garber JE. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. *Br J Cancer.* 2018; 119(2):141-152.
- Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. 2014; 24(3):329-42.
- Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(4):R245-62.
- Yi J, Ren L, Li D, Wu J, Li W, Du G, Wang J. Trefoil factor 1 (TFF1) is a potential prognostic biomarker with functional significance in breast cancers. *Biomed Pharmacother.* 2020; 124:109827.
- Zhao C, Matthews J, Tujague M, et al. Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2007, 67(8):3955-62.

**Webová reference:**

- Petráková K. Možnosti systémové léčby zhoubného nádoru prsu. *Linkos* [online]. [cit. 2022-01-31]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinarni-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/moznosti-systemove-lecby-zhoubneho-nadoru-prsu/>