UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

STUDIUM EXPRESE A TOXICITY DERIVÁTŮ KATECHOLU V BUNĚČNÉ LINII MCF-7

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2023 Dominika Kleplová

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým autorským dílem. Veškerá použitá literatura a zdroje jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

Hradec Králové 2023

Dominika Kleplová

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Alejandru Carazovi, PhD. za odborný dohled, pomoc a cenné rady, jak při práci v laboratoři, tak i u vypracování diplomové práce. Také děkuji za trpělivost při vyhodnocování experimentů, zvláště PCR. Dále děkuji také Raúlu Alvovi, MSc. za pomoc při kultivaci buněčných linií. V neposlední řadě patří poděkování také mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Dominika Kleplová

Školitel: PharmDr. Alejandro Carazo, PhD.

Název diplomové práce: Studium exprese a toxicity derivátů katecholu v buněčné linii MCF-7

Estrogeny plní v lidském organismu mnoho důležitých funkcí. Působí vazbou na estrogenní receptory (ER) a tím regulují reprodukci, menstruační cyklus, kostní denzitu, metabolismus cholesterolu nebo mozkové funkce. Významnou úlohu mají také v rozvoji a vzniku karcinomu prsu, kde je množství exprimovaných ER využíváno jako velmi důležitý biomarker u pacientů, kteří tímto onemocněním trpí. Karcinom prsu je i navzdory neustále probíhajícímu výzkumu považován za nádor s nejvyšší úmrtností.

Katecholy jsou organické sloučeniny. V lidském organismu se mohou objevovat jako metabolity při degradaci benzenu a estrogenů anebo dalších endogenních sloučenin jako jsou neurotransmitery a jejich prekurzory. Je známo, že katecholy se v organismu účastní redoxních dějů, působí antioxidačně i toxicky, narušují funkci proteinů a způsobují zlomy v DNA. Předmětem výzkumu je jejich pozitivní vliv na terapii karcinomu prsu, nicméně ten není ještě zcela prozkoumán.

Předmětem této diplomové práce je studium cytotoxické aktivity u třinácti vybraných derivátů katecholu v prsní nádorové buněčné linii MCF-7/S0.5. V buněčné linii MCF-7/S0.5 byl ve druhé části experimentu testován vliv těchto látek v koncentraci 10 μM na genovou expresi estrogen responsivních genů Estrogen Receptor 1 (ESR1) a Trefoil Factor 1 (TFF1).

Výsledky ukazují, že vybrané deriváty katecholů nejsou toxické v relevantních koncentracích, ve kterých by se mohly nacházet v organismu. Nejnižší cytotoxickou aktivitu vykazovala látka 2-aminofenol (2-APh). U této látky se ve všech koncentracích projevily proliferativní účinky, které byly nejvyšší v koncentraci 100 μM a 50 μM, kde

původní hodnoty narostly až o 60 % oproti kontrolnímu vzorku (DMSO 0.1 %). V těchto koncentracích působily proliferativně také další deriváty. Cytotoxická aktivita se zvyšovala se snižující se koncentrací roztoků derivátů. V nejnižších koncentracích 10 μM a 1 μM se cytotoxicky projevily jen látky 4-MC a 3-MOC.

Experiment na genovou expresi, ukázal, že většina látek je schopna aktivovat ER, a tím zvýšit aktivitu cílových genů přímou i nepřímou interakcí jednotlivých látek s estrogenním receptorem. Především derivát pyrokatechol (PC) se ukázal být silným aktivátorem genu ESR1, kde v porovnání s estradiolem (který se projevil represivně) vykazoval několikanásobně vyšší aktivitu. U genu TFF1 byla potom exprese ve srovnání s estradiolem obdobná.

Deriváty katecholu mohou mít po důkladnějším prostudování místo, jak v prevenci vzniku nádorových onemocnění, tak při vývoj nových potenciálních látek použitelných v protinádorové terapii.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Dominika Kleplová

Supervisor: PharmDr. Alejandro Carazo, PhD.

Title of the Diploma thesis: Study of the expression and toxicity of catechol derivatives in MCF-7 cell line

Estrogens perform many important functions in the human body. They act by binding to estrogen receptors (ER) and thus regulate reproduction, the menstrual cycle, bone density, cholesterol metabolism or brain function. They also play an important role in the development and onset of breast cancer, where the amount of ER expressed is used as a very important biomarker in patients suffering from this disease. Despite ongoing research, breast cancer is considered to have the highest mortality rate.

Catechols are organic compounds. In the human body, they can occur as metabolites in the degradation of benzene and estrogens or other endogenous compounds such as neurotransmitters and their precursors. Catechols are known to be involved in redox processes in the body, to exert antioxidant and toxic effects, to interfere with protein function and to cause DNA strand breaks. Their positive effect on breast cancer therapy is the subject of research, but it has not yet been fully explored.

The subject of this thesis is to study the cytotoxic activity of thirteen selected catechol derivatives in the breast cancer cell line MCF-7/S0.5. In the second part of the experiment, the effect of these compounds at a concentration of 10 μM on the gene expression of estrogen responsive genes Estrogen Receptor 1 (ESR1) and Trefoil Factor 1 (TFF1) was tested.

The results show that the selected catechol derivatives are not toxic at the relevant concentrations at which they might be present in the body. The lowest cytotoxic activity was exhibited by 2-aminophenol (2-APh). This substance showed proliferative effects at all concentrations, which were highest at concentrations of 100 μM and 50 μM, where

the initial values increased by up to 60 % compared with the control (DMSO 0.1 %). Other derivatives were also proliferative at these concentrations. The cytotoxic activity increased with decreasing concentration of the derivative solutions. At the lowest concentrations of 10 μM and 1 μM, only 4-MC and 3-MOC were cytotoxic.

The gene expression study showed that most of the substances at the tested concentration of 10 μM were able to activate the ER and thus increase the activity of target genes by direct and indirect interaction of each substance with the estrogen receptor. In particular, the derivative pyrocatechol (PC) proved to be a potent activator of the ESR1 gene, showing several times higher activity compared to estradiol (which was repressive). The TFF1 gene was then expressed at similar levels compared to estradiol.

Catechol derivatives may have a place, after more careful study, both in cancer prevention and in the development of new potential agents useful in anticancer therapy.

SEZNAM ZKRATEK

2,4-DMeT	2,4-dimethoxytoluen
2-APh	2-aminofenol
2-MO-4-MePh	2-methoxy-4-methylfenol
3-FC	3-fluorokatechol
3-MC	3-methylkatechol
3-MOC	3-methoxykatechol
4-AC	4-aminokatechol
4-AL-DMB	4-allyl-1,2-dimethoxybenzen
4-EG	4-ethylguajakol
4-MC	4-methylkatechol
4-OH-TAM	4-hydroxy-tamoxifen
4-TBC	4-*terc*-butylkatechol
AF-1, AF-2	Aktivační funkce 1, 2
AP-1	Aktivační protein 1
BRCA1, BRCA2	Breast cancer gene 1, 2
cAMP	Cyklický Adenosinmonofosfát
CAR	Konstitutivní androgenní receptor
cDNA	Komplementární DNA
COMT	Catechol-O-methyltransferasa
CS-FBS	Charcoal-stripped Fetal Bovinne Serum
DBD	DNA-Binding Domain (DNA vázající doména)
DES	Diethylstilbestrol
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Deoxyribonukleotidová kyselina
E2	Estradiol
ER	Estrogenní receptor
EREs	Estrogen responsive elements (na estrogen reagující elementy)
ERα	Estrogenní receptor α
ERβ	Estrogenní receptor β
ESR1	Estrogenní receptor 1 (Estrogen Receptor 1)
ESR2	Estrogenní receptor 2 (Estrogen Receptor 2)
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA)
GF	Growth Factor (růstový faktor)
GPER1	G-protein Coupled Estrogen Receptor 1
HER2	Humánní epidermální receptor 2
LABA	Dlouhodobě působící β-agonisté
LBD	Ligand binding domain (ligand vázající doména)
LTED	Long-term estrogen deprived cells (buňky dlouhodobě zbavené estrogenu)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (koenzym biochemických procesů)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (koenzym biochemických procesů)
NLS	Nuclear localization signals (Jaderné lokalizační signály)
NR	Nuclear receptor (Jaderný receptor)
NTD	N-terminální doména
o-Cr	*o*-kresol

PC	Pyrokatechol
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)
PR	Progesteronový receptor
PXR	Pregnan X Receptor (Receptor pro pregnan X)
qPCR	Real-time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)
RNA	Ribonukleotidová kyselina
RT	Reverse transcription (reverzní transkripce)
RT-PCR	Reverse transcription PCR (Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí)
SABA	Krátkodobě působící β-agonisté
SDS	Dodecylsíran sodný
SERD	Selective Estrogen Receptor Degrader (Selektivní downregulátor estrogenních receptorů)
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulators (Selektivní modulátor estrogenních receptorů)
TAM	Tamsulosin
TFF1	Trefoil Factor 1

Obsah

1 ÚVOD 1

2 TEORETICKÁ ČÁST 2

2.1 Estrogeny 2

2.1.1 Metabolismus estrogenů 5

2.1.2 Estrogenový receptor 6

2.1.3 Struktura estrogenových receptorů 8

2.1.4 Mechanismus signalizačních drah 10

2.1.5 Role estrogenů v organismu 13

2.2 Karcinom prsu 14

2.2.1 Výskyt onemocnění 14

2.2.2 Rizikové faktory 14

2.2.3 Biologické markery karcinomu prsu 14

2.2.4 Léčba karcinomu prsu 15

2.2.5 Buněčné linie 17

2.3 Katecholy 19

2.3.1 Katecholové deriváty 20

2.3.2 Deriváty katecholu použité v této práci 20

3 CÍL PRÁCE 23

4 METODICKÁ ČÁST 24

4.1 Kultivace buněk 24

4.1.1 Podmínky pro kultivaci 24

4.1.2 Pasážování buněk 25

4.1.3 Počítání buněk v Bürkerově komůrce 25

4.1.4 Nasazení do mikrotitrační destičky 27

4.2 Stanovení cytotoxicity buněk 27

4.3 Genová exprese 30

4.3.1 Izolace mRNA 30
4.3.2 Polymerázová řetězová reakce 32
4.3.3 Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí 32
5 VÝSLEDKY 38
5.1 Výsledky cytotoxické aktivity v buněčné linii MCF-7/S0.5 38
5.2 Výsledky genové exprese 42
5.2.1 Výsledky pro gen Estrogen receptor 1 43
5.2.2 Výsledky pro gen Trefoil factor 1 44
6 DISKUZE 45
7 ZÁVĚR 49
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 50

1 ÚVOD

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony steroidní povahy, které svým působením ovlivňují mnoho funkcí v organismu. Tyto funkce jsou zprostředkovány pomocí mnoha mechanismů estrogenní signalizace, z nichž jedním je vazba na estrogenní receptory (ER) situované v buněčném jádře. Signalizační dráha vede od navázání ligandu estrogenu přes aktivaci transkripčních kaskád až ke kontrole genové exprese. Estrogeny hrají významnou roli při vzniku hormon-dependentního karcinomu prsu, proto jsou v běžné praxi využívána léčiva, která inhibují estrogenní signalizaci.

Karcinom prsu je jedno z nejčastějších nádorových onemocnění na světě a je řazen mezi nádory s největší úmrtností. Kromě známých rizikových faktorů, jako je např. věk, rodinná anamnéza nebo mutace genů BRCA1 a BRCA2, se na vzniku a rozvoji karcinomu prsu podílí také hladiny estrogenních hormonů v organismu. Jako důležité biomarkery pro diagnostiku karcinomu prsu a určení vhodné terapie jsou v dnešní době využívány především estrogenní receptory (ERα a ERβ), progesteronové receptory (PR) a humánní epidermální receptor 2 (HER2).

Katecholy jsou organické sloučeniny přírodního i syntetického původu, od kterých je odvozeno mnoho strukturně podobných látek. Katecholy se vyskytují i v lidském organismu v podobě katecholaminových neurotransmiterů, estrogenních metabolitů nebo jako meziprodukty biologických procesů. Vzhledem k přítomnosti hydroxylových skupin na základním benzenovém jádře, vykazují katecholy podobnost s polyfenoly, u kterých bylo prokázáno, že inhibují proliferaci nádorových buněk, a mají tak vliv na vznik karcinomu psu.

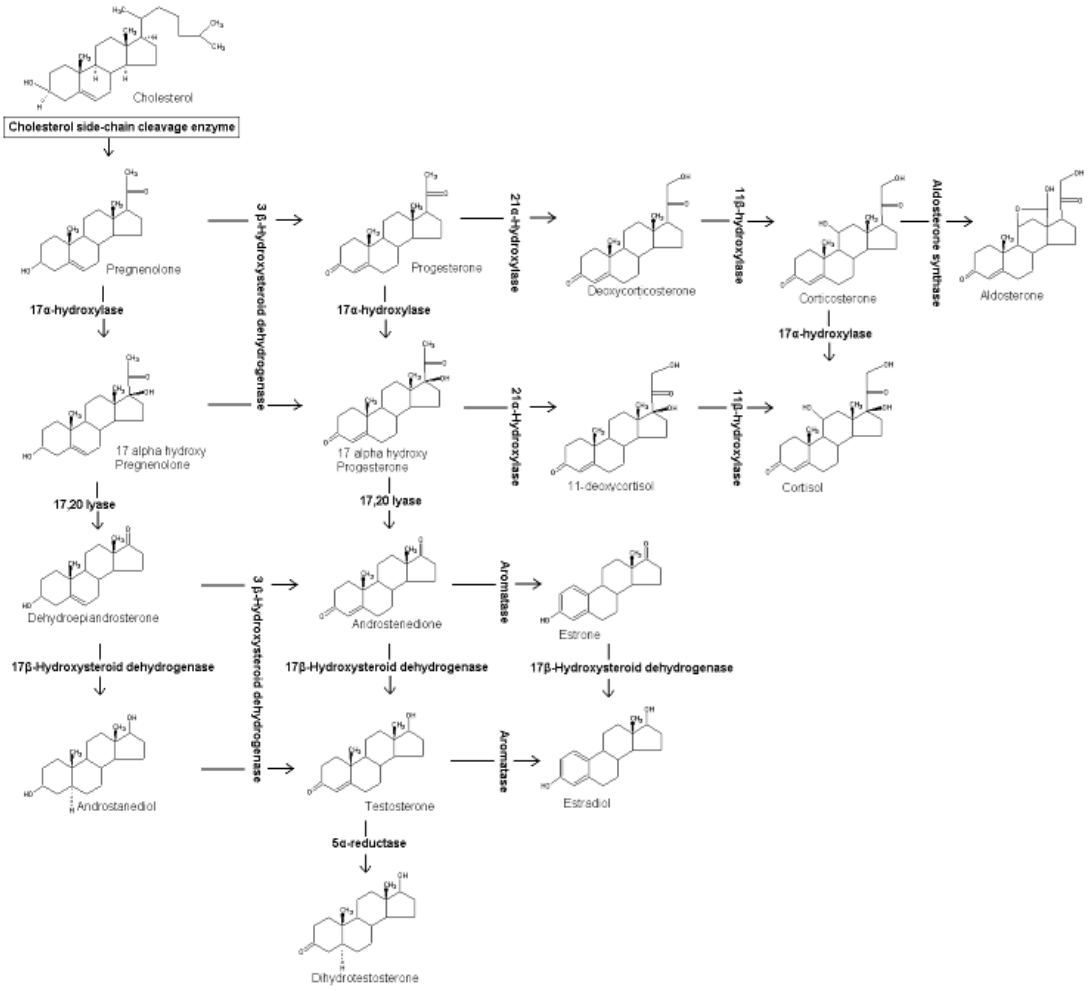
Tato diplomová práce je zaměřena na studium cytotoxické aktivity třinácti vybraných derivátů katecholu v buněčné nádorové linii karcinomu prsu MCF-7/S0.5. Ve druhé části je pak experiment zacílen na měření genové exprese u dvou estrogen responsivních genů Estrogen Receptor 1 (ESR1) a Trefoil Factor 1 (TFF1).

2 TEORETICKÁ ČÁST

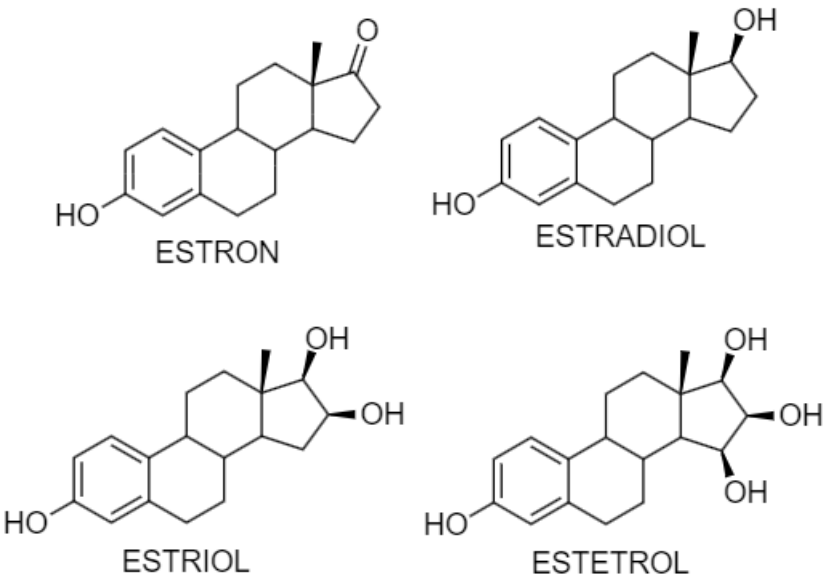
2.1 Estrogeny

Estrogeny jsou primární ženské pohlavní hormony, ale v malém množství je jejich přítomnost důležitá i u mužů. Jsou syntetizovány především ve vaječníkách, ve žlutém tělísku a v placentě. Dále v menší míře také v kůře nadledvin, tukové tkáni, prsech a varlatech. Jsou zodpovědné za řízení funkcí ženského reprodukčního systému a také za vývoj sekundárních pohlavních znaků, které se objevují během puberty a období pohlavní zralosti. U mužů má pak estrogen vliv na spermatogenezi, erekci a modulaci libida *(Schulester et al., 2016)*.

Jedná se o hormony steroidní povahy, prekurzorem pro jejich biosyntézu je cholesterol, konkrétně LDL-cholesterol **(Obr. 1)**. Základem chemické struktury je steroidní skelet tvořený 18 uhlíky. Rozlišujeme čtyři hlavní endogenní estrogeny – estron, estradiol, estriol a estetrol. **(Obr. 2)**. Ty se skládají z jednoho benzenového kruhu, fenolické hydroxylové skupiny na C3, a ketonové skupiny (estron), nebo jedné (estradiol), dvou (estriol) nebo tří (estetrol) hydroxylových skupin *(Fuentes et al., 2019)*.

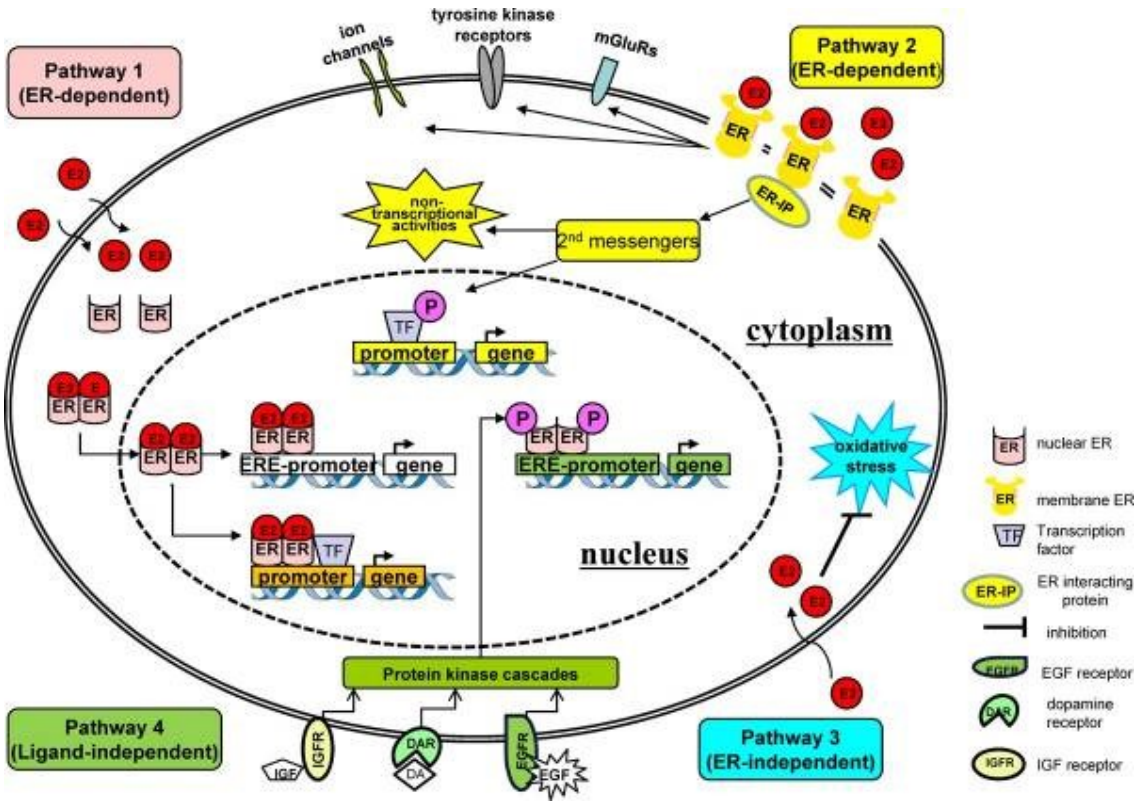


Obrázek 1: Biosyntéza steroidních hormonů v lidském těle. Konverze cholesterolu na gestageny, androgeny, a nakonec na estrogeny. Posledním krokem je enzymem aromatasou katalyzovaná přeměna androgenu na estron a estradiol. Převzato z: *https://s3.amazonaws.com/static.wd7.us/8/8f/Steroidogenesis.gif*.



Obrázek 2: Struktura endogenních estrogenů.

Estrogen působí díky vazbě na specifické estrogenové receptory (ER). Tento proces vede k aktivaci transkripčních procesů a signalizaci drah vedoucích ke stimulaci nebo represi, modulaci a regulaci exprese cílových genů. Díky rozdílům v buněčných a molekulárních procesech vedoucích k regulaci genové exprese, kdy se komplex estrogen-receptor přímo nebo nepřímo váže na DNA, rozlišujeme signální mechanismy na genomické a negenomické. Genomický efekt zahrnuje migraci komplexů do jádra buňky a přímou interakci se specifickými sekvencemi DNA, tzv. estrogen response elements (na estrogen reagující elementy, EREs). Negenomický efekt zahrnuje nepřímou regulaci genové exprese přes intracelulární buněčnou signalizaci *(Fuentes et al. 2019)*. Různé mechamismy účinku jsou znázorněny na **Obr. 3**



Obrázek 3: Mechanismy účinku estrogenů. 1) Estrogen se váže na ER v cytoplazmě a komplex dimerizuje a přestupuje do jádra. To vede k transkripčním změnám v genech odpovídajících na estrogen, buď s nebo bez estrogen responsivních elementů. (přímá genomická cesta) **2)** Estrogen se váže na membránové ER, což vede k cytoplazmatickým změnám, jako je např. regulace membránových iontových kanálů, systému druhých poslů a modifikace transkripčních faktorů nebo jiných membránových receptorů. (nepřímá genomická cesta) **3)** Estrogen působí antioxidačními účinky, nezávisle na ER. **4)** Mechanismus účinku nezávislý na estrogenu – růstové faktory (GF) aktivují proteinkinázové kaskády, to vede k fosforylaci (P) a aktivaci jaderných ER na estrogen responsivních elementech. (Převzato z *Cui et al. 2013*).

2.1.1 Metabolismus estrogenů

Fyziologicky dochází k exkreci estrogenů a jejich analogů močí, stolicí a/nebo žlučí. V cílových buňkách nacházíme různé cesty jejich metabolismu. Ten má na starosti superrodina enzymů cytochromu P450, především jeho isoformy CYP1A1, CYP1B1 a CYP1A2. Jejich působením dochází k hydroxylaci estronu a estradiolu na uhlících C2, C4 a C16. Vzhledem k vysoké expresi těchto enzymů v játrech se velká část estrogenů metabolizuje už tam. CYP1B1 dále najdeme také v prsních žlázách, děloze, ledvinách,

mozku a hypofýze. Po hydroxylaci je estradiol konvertován na tzv. katecholové estrogeny, které vykazují, vedle estrogenních vlastností, také vlastnosti katecholaminů. Váží se na dopaminové a α_1-adrenergní receptory v mozku a hypofýze. Patří mezi ně 2-hydroxyestron, 4-hydroxyestron, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol a 16α-hydroxyestron. Tyto mohou být dále metabolizovány pomocí enzymu katechol-O-methyltransferasy (COMT) na methoxy estrogeny *(Fuentes et al. 2019, Schneider et al. 1984)*.

Estrogeny a katecholové estrogeny mohou být také konjugovány s kyselinou glukuronovou a sulfátem během druhé fáze metabolismu za přítomnosti enzymů UDP-glukuronyltransferasy a sulfotransferasy

Schneider a kolegové v roce 1984 uvedli, že hydroxylace na C2 je v metabolismu důležitá, protože 2-hydroxylované katecholové estrogeny mají nízkou afinitu k ER a vykazují neestrogenní a anti-estrogenní účinky. Pomocí experimentů na buněčné linii nádorových prsních buněk MCF-7 také potvrdili, že 2-hydroxyestron potlačuje proliferaci nádorových buněk *(Schneider et al., 1984)*.

2.1.2 Estrogenový receptor

Estrogenový receptor patří do superrodiny nukleárních receptorů (NR). NR je soubor transkripčních faktorů, které jsou regulovány malými lipofilními ligandy a signálními dráhami v buňce. Nukleární receptory mají klíčovou roli v mnoha fyziologických procesech. Dysfunkce v těchto procesech může vést k patologickým stavům jako například obezita, ateroskleróza, rakovina nebo hyperlipidémie. NR lze dělit podle různých kritérií – mechanismus účinku, sekvenční homologie nebo afinity k ligandu. NR se také běžně dělí podle toho, zda je znám endogenní ligand. Takovéto receptory jsou pak buď hormonální/endokrinní receptory (endogenní ligandy s vysokou afinitou), falešné sirotčí receptory (endogenní ligandy s nízkou afinitou), nebo sirotčí receptory (jsou u nich prokázané ligandy, nebo afinitu k ligandům nevykazují). Mezi endokrinní receptory řadíme receptory pro steroidní hormony, hormony štítné žlázy, retinoidy, receptory pro různé lipidy a oxysteroly. Do skupiny falešných sirotčích receptorů, pro něž byl, původně neznámý, regulační ligand již nalezen můžeme zařadit např. konstitutivní androgenní receptor – CAR nebo receptor pro pregnan X – PXR *(Choi et al., 2023, Carazo Fernández et al., 2015, di Masi et al., 2009)*.

Estrogenový receptor objevil Elwood Jensen v roce 1958 jako první receptor, který byl kdy nalezen. Ukázal, že reprodukční ženské tkáně jsou schopny přijmout a navázat estrogen z oběhu. Později dokázal také schopnost ER migrovat do jádra a stimulovat tam genovou transkripci *(Jensen et al., 1967, Jensen et al., 1968)*. Green a spolupracovníci jako první naklonovali receptor pomocí RNA z lidských buněk karcinomu prsu z buněčné linie MCF-7 (tento receptor dnes známý jako estrogenový receptor α, ERα). O 10 let později popsal Dr. Jan-Ake Gustafsson estrogenový receptor β (ERβ) *(Kuiper et al., 1996)*. U lidí je estrogenový receptor α kódován genem estrogen receptor 1 (ESR1), je umístěný na chromozomu 6. Estrogenový receptor β je potom kódován genem estrogen receptor 2 (ESR2) a je umístěn na chromozomu 14 *(Fuentes et al., 2019)*.

V roce 2008 byl pojmenován ještě třetí druh estrogenového receptoru. Jedná se o tzv. membránový ER spřažený s G-proteinem (GPER1). Ten, jako je pro G-protein typické, je zodpovědný za rychlou reakci na estrogen, stimuluje nebo inhibuje různé efektorové dráhy, interaguje s mnoha dalšími proteiny a spouští kaskádu zprostředkovanou druhými posly. Oproti jaderným receptorům (ERα a ERβ), vykazuje GPER1 nižší vazebnou afinitu k estradiolu *(Filardo et al., 2012)*. **(Tabulka 1)**

Tabulka 1: Typy a rozložení estrogenních receptorů. Převzato a upraveno z: *Vrtačnik et al., 2014*

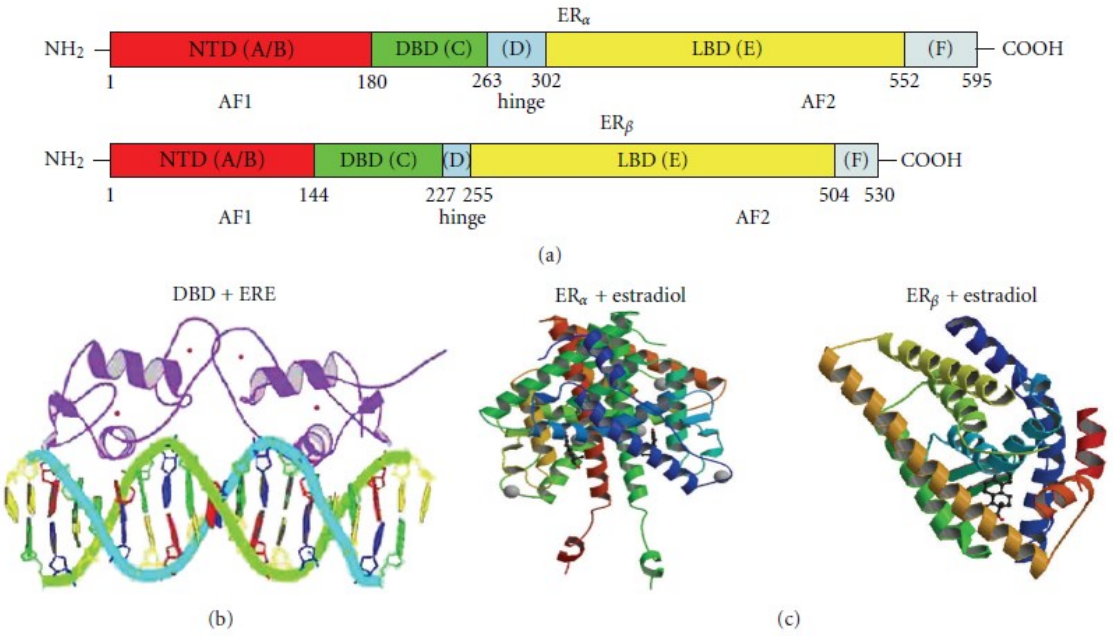
RECEPTOR	ERα	ERβ	GPER1
TYP RECEPTORU	jaderné receptory	jaderné receptory	receptory spřažené s G-proteinem
POČET IZOFOREM	3	5	1
VELIKOST	595 aminokyselin	530 aminokyselin	375 aminokyselin
RECEPTORY V LIDSKÝCH TKÁNÍCH	děloha, vaječníky, prsa, játra, ledviny,bílá tuková tkáň, prostata, varlata, nadvarlata, kostra, mozek	střevo, slinná žláza, endotel cév, plíce, močový měchýř, prostata, vaječníky, varlata, kostra, mozek	centrální a periferní NS, děloha,vaječníky, mléčná žláza, varlata, spermatogonie, GIT, slinivka břišní,ledviny, játra, nadledviny, hypofýza, kostní tkáň, KVS, buňky IS

2.1.3 Struktura estrogenových receptorů

Jak ERα, tak i ERβ, mají společné strukturní charakteristiky, které jsou zodpovědné za podobné funkční vlastnosti. Tyto receptory, podobně jako většina NR se skládají ze šesti domén A až F. **(Obr. 4)** Domény A/B se nachází na N-konci – tzv. aminoterminální. Doména C je u obou receptorů téměř identická. Jedná se o tzv. DNA vázající doménu (DNA-binding domain, DBD). Tato se podílí na dimerizaci estrogenových receptorů a na vazbě specifické sekvence chromatinu, tzv. EREs (na estrogen responzivní elementy). Pantová část (Hinge fragment) je doména D, ta obsahuje tzv. nuclear localization signals (NLS), což jsou obecně krátké peptidy, které napomáhají ke konformaci NR v přítomnosti receptoru *(Lu et al., 2021)*. Doména D propojuje doménu C s multifunkčním karboxyterminálním C-koncem (doména E), která se jinak nazývá ligand vázající doména (Ligand-binding domain, LBD). LBD je globulární oblast, na které se nachází estrogenové vazebné místo pro ligandy. Tyto ligandy jsou schopny vázat

koaktivátory a působit agonisticky, anebo vázat korepresory a mít funkci represivní, (pokud se naváže antagonista) (activation function, AF-2). Na úplném konci C-terminální části se nachází doména F, která moduluje genovou transkripci v závislosti. na specifitě ligandu a také má vliv na dimerizaci receptoru. Receptor obsahuje také tzv. aktivační oblasti AF1 a AF2 (activation function 1, 2), které mohou působit, buď nezávisle na sobě, nebo společně synergicky *(Yaşar et al., 2017, Kumar et al., 2011).*

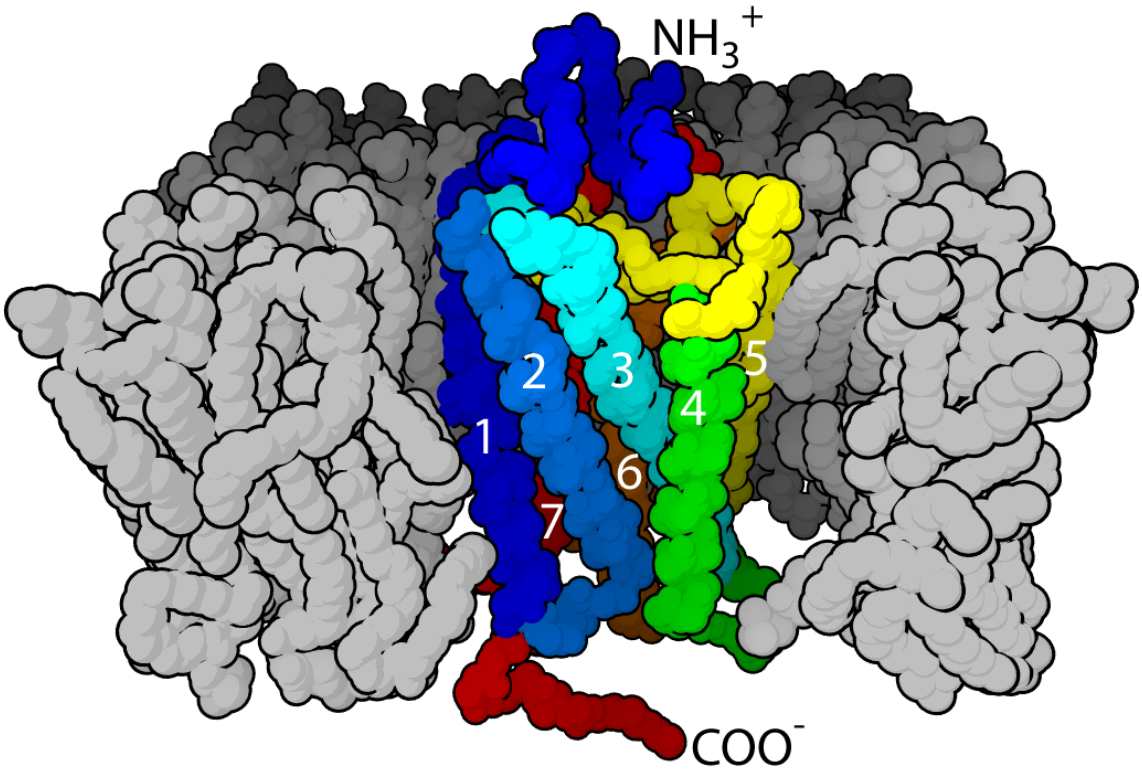
ERα a ERβ vykazují největší *sekvenční homologii* (podobnost) v DNA vázající doméně (95 % shodných aminokyselin) a v ligand vázající doméně (shodné z přibližně 55 %). Nejvíce se mezi sebou liší NTD. N-terminální doména ERβ je v porovnání s doménou ERα kratší a podobnost je zde přibližně jen 15 % *(Kumar et al., 2011).*



Obrázek 4: Organiazce struktury izoforem ERα a ERβ. **(a)** ukazuje organizaci dvou izoforem estrogenových receptorů ERα a ERβ**.** Jednotlivé domény jsou barevně rozlišeny. NTD – aminoterminální doména – červeně; DBD – DNA vázající doména zeleně; pantová část modře; LBD – ligand vázající doména – žlutě; oblast F se nachází na C-konci – šedě. **(b)** komplex DBD estrogenového receptoru s DNA-ERE (estrogen response element). Část **(c)** zobrazuje 3D struktury ERα (vlevo) a ERβ (vpravo). Převzato z: *Kumar et al., 2011*

GPER1 receptor se strukturně odlišuje od ERα a ERβ popsaných výše. Jak je pro receptory spřažené s G-proteinem typické, skládají se ze 7 transmembránových α-helixů, 4 extracelulárních segmentů a 4 cytosolických segmentů **(Obr. 5)** *(Fuentes et al., 2019).*

GPER1 je převážně exprimován na intracelulárních membránách např. v endoplasmatickém retikulu nebo Golgiho aparátu, zatímco na plazmatické membráně se u mnoha typů buněk nachází jen málo. Byl také nalezen v buněčném jádře, kde se předpokládá, že je nutný jako mediátor transkripce a buněčné migrace *(Prossnitz & Barton, 2023)*.



Obrázek 5: Receptor spřažený s G-proteinem. Transmembránové α-helixy označené 1-7, šedě vyznačené fosfolipidy tvořící membránu. Převzato z: *Receptor spřažený s G-proteinem struktura – Receptor spřažený s G-proteinem – Wikipedia.*

2.1.4 Mechanismus signalizačních drah

Jak bylo řečeno výše, díky rozdílům v buněčných a molekulárních procesech, rozlišujeme signální mechanismy genomické, kdy dochází k regulaci genové exprese, a negenomické – dochází k aktivaci signalizačních kaskád *(Fuentes et al., 2019, Vrtačnik et al, 2014)*.

Mechanismus přímé genomické signalizace je považován za klasický mechanismus estrogenní signalizace. Po navázání estrogenu na ERα a ERβ v cytoplasmě cílových buněk dojde k dimerizaci receptoru, translokaci vzniklého komplexu do jádra a k interakci s EREs *(Vrtačnik et al., 2014)*.

Každý z estrogenových genů se vyskytuje v několika izoformách. ERα má nejméně tři izoformy a ERβ minimálně 5 různých izoforem. Na rozdíl od ERα v plné délce, chybí dvěma kratším izoformám ERα N-koncová doména. Jelikož mají schopnost tvořit dimery s ERα o plné délce, mají schopnost potlačovat aktivitu ERα. Nejkratší izoforma ERα označovaná ERα36 působí také jako membránový ER, který je schopný interagovat s GPER1. Čtyři kratší izoformy ERβ se odlišují především svou ligand-vázající doménou. To má za následek zhoršenou schopnost vázat ligandy. Izoformy ERβ, které nejsou schopny vázat ligandy ani koaktivátory a nemají žádnou transkripční aktivitu, dimerizují přednostně s ERα, čímž tlumí signalizaci receptoru α. Tato skutečnost naznačuje, že různé izoformy ERα a ERβ mohou mít velmi rozdílný vliv na estrogenovou signalizaci a regulaci cílových genů *(Fuentes et al., 2019)*.

Zhruba jedna třetina genů, které jsou v lidském těle regulovány estrogenními receptory neobsahují sekvence podobné ERE. ER mohou genovou expresi regulovat bez přímé vazby na DNA pomocí modulace jiných transkripčních faktorů prostřednictvím vazby protein-protein. Typickým příkladem genomické akce, která nezávisí na ERE, je interakce ER s aktivačním proteinem 1 (AP-1). AP-1 je klíčovým transkripčním faktorem procesů, jako je proliferace, apoptóza a buněčná diferenciace. *(Björnström et Vrtačnik et al., 2014, Fuentes et al., 2019)*.

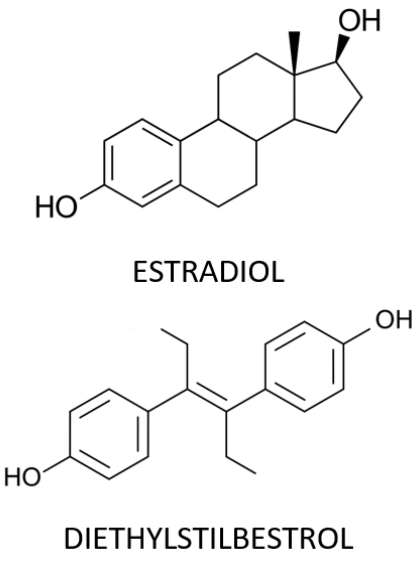
Některé estrogen-dependentní změny jsou až příliš rychlé na to, aby bylo možno je spojovat s transkripcí cílových genů a následnou syntézou proteinů. V tomto případě se jedná o negenomické působení estrogenu, které často zahrnuje aktivaci signálních transdukčních mechanismů a s navazující produkcí intracelulárních druhých poslů. Dále dochází k regulaci cAMP a k aktivaci proteinkinázových signalizačních kaskád vedoucích k nepřímým změnám v genové expresi. Často bývá spojena s podskupinou estrogenních receptorů, které se váží na membrány, jako jsou např. GPER1 anebo některé varianty ERα a ERβ. Molekulární mechanismy, které tvoří základ negenomické estrogenní signalizace jsou rozmanité a početné. Závisí na řadě podmínek, jako je například dostupnost signálních transdukčních molekul *(Björnström et Vrtačnik et al., 2014, Fuentes et al., 2019)*.

Estrogenní signalizace je ovlivňována i exogenními hormon-aktivními látkami, jejichž společným rysem je chemická příbuznost s endogenním estrogenem, jedná se o tzv. endokrinní disruptory (*Kujanová et al., 2007)*.

Jsou to látky, které interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem nebo rozkladem přirozených hormonů, jež jsou v těle odpovědné za homeostázu, reprodukci, vývoj a chování.

Skupinu těchto látek lze obecně rozdělit na látky přírodního původu a na látky chemického původu. Mezi látky přírodního původu patří fytoestrogeny (lignany, isoflavonoidy a stilbeny) a mykoestrogeny. Mezi látky chemického původu patří ftaláty, alkylfenoly, bisfenol A a farmaceutické preparáty *(Pfitzner, 2010)*.

Příkladem může být syntetický nesteroidní estrogen diethylstilbestrol (DES) **(Obr. 6)**, který byl široce užíván jako hormonální kontraceptivum, dále k prevenci potratu stimulací syntézy estrogenu a progesteronu v placentě, nebo k léčbě postmenopausálních symptomů. V roce 1971 však byly zjištěny jeho teratogenní účinky a účinky na rozvoj karcinomu prsu a pochvy u žen. Dnes se využívá například při terapii karcinomu prostaty *(Schrager et al., 2004, Rogers & Kavlock, 2008)*.



Obrázek 6: Porovnání struktury estradiolu a diethylstilbestrolu. Pro estrogenní účinek a vazbu na ER je důležité zachování hydroxylových skupin ve struktuře a podobná vzdálenost mezi nimi.

2.1.5 Role estrogenů v organismu

Estrogeny mají vliv na široké spektrum fyziologických funkcí. Regulují menstruační cyklus a reprodukci, kostní denzitu a funkci mozku. Vliv mají také na mobilizaci cholesterolu, vývoj prsní tkáně a pohlavních orgánů a kontrolují zánět. *(Liang et al., 2013)* Během těhotenství pomáhají estrogeny produkované placentou při přípravě mléčné žlázy na produkci mléka. Estrogeny nejsou pouze a výhradně ženské hormony, důležitou roli mají také v organismu mužů. Nízké hladiny estrogenů u mužů, produkovaných např. v játrech a nadledvinách, mají vliv na spermatogenezi, erektilní funkci a libido *(Schulster et al., 2016)*.

Estrogen má vliv nejen na normální buňky a fyziologické procesy v lidském těle, ale významnou roli hraje i v několika patologických procesech. Abnormální signalizace ER může vést k progresi onemocnění, jako jsou např. metabolické a kardiovaskulární choroby, osteoporóza nebo neoplázie. U karcinomu prsu má vliv na jeho rozvoj ERα, zatímco role ERβ je zatím nejasná. Podle některých studií je exprese ERβ v nádorové prsní tkáni, pokud ji porovnáme s tkání normální, nižší, což naznačuje protektivní roli ERβ vůči karcinomu prsu. Zatímco jiné studie ukázaly, že ERβ potlačuje aktivitu ERα, a je tedy dobrým prognostickým ukazatelem *(Zhao et al., 2007)*.

2.2 Karcinom prsu

2.2.1 Výskyt onemocnění

Rakovina prsu je velmi běžné onemocnění u žen, s incidencí přes více než 2 miliony nových případů ročně. Toto onemocnění má stále nejvyšší mortalitu mezi dalšími druhy karcinomů *(Mokbel, 2019)*.

2.2.2 Rizikové faktory

Faktory pro vznik karcinomu prsu lze dělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné patří například věk, rodinná anamnéza, reprodukční anamnéza, ozařování hrudníku, a mutace genů BRCA1 a BRCA2 (breast cancer gene 1 a 2). Naproti tomu, do určité míry ovlivnitelnými faktory jsou obezita, konzumace alkoholu a hormonální terapie nebo vysoká hladina endogenních estrogenů.

Vzhledem k tomu, že většina těchto rizikových faktorů je spojena s vysokou hladinou endogenních estrogenů, je jejich vlivu na vznik karcinomu prsu v posledních dvou dekádách věnována velká pozornost *(Samavat et al., 2015)*.

2.2.3 Biologické markery karcinomu prsu

Klíčovým biomarkerem karcinomu prsu je exprese ERα, neboť jeho přítomnost či absence v nádorových buňkách se významně promítá do prognózy onemocnění i způsobu léčby *(Voňka et al., 2019)*. Nádory pozitivní na ER využívají estradiol jako hlavní růstový stimul. Proto je ER přímým cílem terapie.

V nádorech se jako další biomarker vyskytuje progesteronový receptor (PR). Jeho přítomnost je však silně závislá na přítomnosti ER. Nádory, kde je exprimovám PR, ale ne ER, nejsou běžné, z celkové množství tvoří méně než 1 % nádorů (*Weigel et al., 2010)*.

Jako další biomarker je využíván receptor pro lidský epidermální růstový faktor (human epidermal growth factor receptor 2, HER2). V případech, kdy je HER2 v nadměrné expresi, hrozí u pacientek relapsy a kratší doba přežití. Díky vývoji monoklonální protilátky trastuzumabu cílící přímo na HER2, se tento stal rovněž vysoce prediktivním biomarkerem *(Mass et al. 2005)*. Roli při diagnostice karcinomu hrají také marker proliferace, antigen, Ki67 a proteiny claudin-3 (Cldn-3) a claudinin-4 (Cldn-4). Na

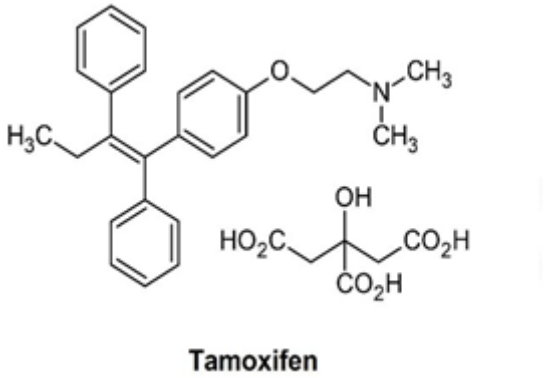
základě přítomnosti nebo nepřítomnosti těchto biomarkerů při diagnostice, se karcinom prsu rozlišuje na pět typů, přičemž každý odpovídá na jiný typ léčby *(Holliday & Speirs, 2011)*.

Dalšími, neméně důležitými faktory pro vznik onemocnění, jsou tzv. BRCA tumor supresorové geny nacházející se v organismu ve dvou subtypech BRCA1 a BRCA2. Vrozená mutace v BRCA genech představuje vyšší riziko pro vznik karcinomu prsu nebo ovarií *(Tung et al., 2018)*.

2.2.4 Léčba karcinomu prsu

Lékem první volby na hormon-dependentní karcinom prsu je tamoxifen (TAM). Molekula tohoto léku byla schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) již v roce 1977 *(Jordan et al., 1994)*.

Tamoxifen je léčivo patřící do skupiny selektivních modulátrů estrogenních receptorů (SERM). **(Obr. 7)** Vykazuje široké spektrum farmakologických účinků v ER exprimujících tkáních. Tamoxifen působí antiproliferativně díky účinku jeho metabolitu 4-hydroxytamoxifenu (4-OH-TAM). Ten kompetitivní vazbou na ER potlačuje transkripci DNA zprostředkovanou estradiolem. Tamoxifen takto inhibuje expresi estrogeny regulovaných genů, jakožto i angiogenních a růstových faktorů, které nádor vylučuje. Tyto faktory mohou totiž ovlivňovat růst nádoru parakrinním nebo autokrinním mechanismem. Výsledkem účinkování léku je potom zpomalení proliferace buněk a zmenšování velikosti nádoru *(Jensen et al., 1999, Ali et al, 2016)*. U ER pozitivního karcinomu prsu léčeného po dobu 5 let tamoxifenem se ročně snižuje úmrtnost o jednu třetinu a recidiva až o 50 %. Naopak pacienti s ER negativním karcinomem nemají prospěch z adjuvantní léčby tamoxifenem *(Patani et al., 2013)*. Velmi častým problémem pacientek při léčbě karcinomu prsu antiestrogeny je bohužel rezistence na léčbu, která se časem vyvine *(Jensen et al., 1999)*.



Obrázek 7: Struktura léčiva tamoxifen

Tamoxifen však není jedinou možností, jak léčit karcinom prsu. Dalšími možnostmi je použití inhibitorů aromatasy, léčiva fulvestrantu (antiestrogen), v současné době je využívaná biologická léčba. Další možností může být i tzv. farmakologická kastrace – hormonální suprese.

Fulvestrant patří mezi antiestrogeny, vazbou na ER inhibuje jeho účinek. Navíc ještě fulvestrant vede k down-regulaci ER v buňce a je proto označován jako Selektivní down-regulátor estrogenních receptorů (SERD) *(Osborne et al., 2004)*.

Inhibiční léčba spočívá v inhibici enzymu aromatasy, též nazývaným estrogen syntasa. Aromatasa (CYP19A1) je enzym z rodiny cytochromu P450, který má podíl na finální přeměně androgenů na estrogeny. Mezi léčiva z této skupiny řadíme anastrozol, letrozol, a dále exemestan a fomestan, což jsou steroidní inaktivátory aromatasy *(Séralini et al., 2001)*.

Biologická léčba, která je v dnešní době využívaná, míří přímo na buněčné struktury a na rozdíl od cytostatik působí pouze na buňky, které danou strukturu obsahují. K nejúčinnějším biologickým léčivům patří trastuzumab, který výrazně prodlužuje dobu přežití pacientek. Jedná se o monoklonální protilátku namířenou proti HER2 genu. Trastuzumab je účinný u nádorů, které nadměrně produkují HER2 gen. Jedná se o 15-20 % karcinomů prsu. V současné době je možné použít lapatinib – další biologický lék, který je namířen proti stejnému genu, ale má jiný mechanizmus účinku. Je tudíž účinný i u nádorů, u kterých selhala léčba trastuzumabem *(Petráková, 2011)*. Spojením trastuzumabu a léčiva emtansinu, který inhibuje mikrotubuly, vznikl tzv. ado-trastuzumab *(Al Rabadi et al., 2021)*. Dalším zástupcem je pertuzumab, který je výhodný v kombinaci s trastuzumabem, protože obě látky cílí na odlišnou oblast HER2. Pertuzumab se váže na

extracelulární dimerizační doménu II zatímco trastuzumab se váže na doménu IV *(Ishii et al., 2019)*.

2.2.5 Buněčné linie

Buněčné linie jsou důležitou a nedílnou součástí diagnostiky karcinomu prsu na molekulární úrovni. Mohou být široce využívány, především v *in vitro* studiích. Jak bylo zmíněno výše, na molekulární úrovni je rozlišováno pět fenotypů karcinomu prsu v závislosti na tom, jaký biomarker je nádorem více exprimován – luminální typ A, luminální typ B, basální, fenotyp s nízkou hladinou claudinu (Claudin-low) a HER2 fenotyp. Na základě toho byly v průběhu let vyvinuty různé buněčné linie, aby mohl být každý typ karcinomu studován **(Tabulka 2)** *(Holliday & Speirs, 2011)*.

Tabulka 2: Buněčné linie na základě fenotypu karcinomu prsu.

Fenotyp karcinomu prsu	Biomarkery	Buněčná linie
Luminální typ A	ER^+, $PR^{+/-}$, $HER2^-$	MCF-7, T47D, SUM185
Luminální typ B	ER^+, $PR^{+/-}$, $HER2^+$	BT474, ZR-75
Basální	ER^-, PR^-, $HER2^-$	MDA-MB-468, SUM190
Claudin-low	ER^-, PR^-, $HER2^-$	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER^-, PR^-, $HER2^+$	SKBR3, MDA-MB-453

Důležitým typem je buněčná linie MCF-7, která se využívá při experimentech týkajících se ER-pozitivního karcinomu prsu *(Comsa et al., 2015)*.

Buněčná linie MCF-7 je neinvazivní a málo agresivní, a je běžně považována za linii s nízkým potenciálem vytvářet metastázy. Při výzkumu karcinomu prsu jsou buňky MCF-7 využívány pro studium ERα, protože tato linie je jednou z mála, kde je exprimované značné množství ER, což napodobuje většinu invazivních lidských nádorů prsu. Dále mají buňky MCF-7 velký význam pro výzkum protilátek proti ER a pomohly objasnit buněčnou lokalizaci ER. Na základě výsledků výzkumu protilátek proti ER se rozhoduje o dalším vhodném postupu v léčbě – zda aplikovat hormonální terapii či ne.

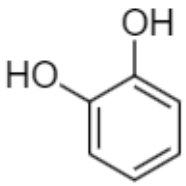
MCF-7 buňky jsou senzitivní na estradiol (E2) a závisí na něm jejich proliferace. V nepřítomnosti estrogenů se v buňkách zvýší exprese ER receptorů *(Comsa et al., 2015)*.

Výzkum se dále hojně zaměřuje na nádory se získanou rezistencí na terapii anti-estrogenními léčivy. MCF-7 buňky jsou vhodným kandidátem i pro studie rezistence k anti-hormonální terapii, protože jsou snadné na kultivaci a zůstává u nich zachována exprese ER. Linie jsou upravené jako rezistentní na určitá protinádorová léčiva – tamoxifen (linie MCF-7/TAMR-1), fulvestrant (MCF-7/182R-6) nebo anastrozol (MCF-7/AnaR-4) *(European Collection of Authenticated Cell Cultures)*.

MCF-7 buňky také zásadně ovlivnily studie hormonální rezistence. Vystavení buněk antiestrogenům nebo pomocí vysazení estrogenu vede k izolaci, buď ER-pozitivních, nebo ER-negativních hormon-rezistentních variant. Odebráním estrogenu zpočátku růst buněk zpomaluje, postupně se však růst obnoví, jedná se o tzv. long-term-estrogen-deprived buňky (LTED cells) *(Jeng et al., 1998)*.

2.3 Katecholy

Katecholy jsou organické sloučeniny. Struktura těchto sloučenin je složena z benzenového jádra, které je v *ortho*-poloze substituované hydroxylovými skupinami, díky čemuž vykazují strukturální podobnost s polyfenoly. **(Obr. 8)** Katecholy se v lidském organismu mohou objevovat jako metabolity při degradaci benzenu a estrogenů anebo dalších endogenních sloučenin jako jsou neurotransmitery a jejich prekurzory – adrenalin, noradrenalin, L-DOPA. V přírodě se vyskytují jako degradační meziprodukty aromatických sloučenin a lignanů, dále je najdeme například v kávě, čaji nebo tabákovém kouři *(Schweigert et al., 2001)*.



Obrázek 8: Obecná struktura katecholů

Co se týče toxicity katecholů, hrají zde důležitou roli redoxní děje, které jsou katalyzované těžkými kovy. S dvojmocnými a trojmocnými ionty, jako například mědí a železem, tvoří stabilní komplexy. Redoxní reakce katecholů, mědnatých kationtů a buněčného kyslíku vede až k řetězcovým zlomům v DNA. Při reakci vzniká z mědnatého kationtu kationt měďný, z katecholu semichinonový radikál, superoxid a peroxid. Ty nakonec zapříčiní štěpení řetězce DNA, což vede k nenapravitelným škodám *(Schweigert et al., 2000)*.

2.3.1 Katecholové deriváty

Existuje velké množství derivátů, které jsou odvozené od obecné struktury katecholu. Jedná se o látky jak přírodního, tak syntetického původu. Jedním z nejznámějších derivátů katecholu vyskytujících se v přírodě jsou urushioly, jejichž struktura se od obecné struktury katecholu liší náhradou vodíku ve třetí pozici uhlovodíkovým řetězcem s 15 nebo 17 atomy uhlíku.

Další skupinou jsou katecholaminy, které v organismu hrají důležitou roli jako hormony a neurotransmitery – dopamin, noradrenalin a adrenalin. Katecholaminy lze nalézt i mezi syntetickými látkami, jež jsou využívány jako léčiva, například krátce působící β-agonisté (SABA) a dlouze působící β-agonisté (LABA).

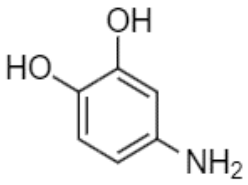
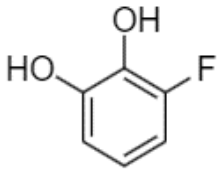
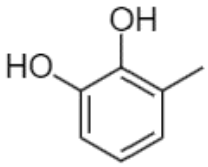
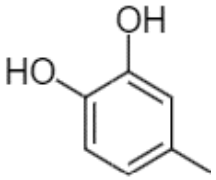
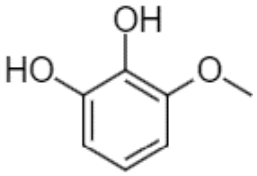
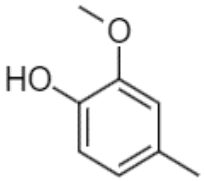
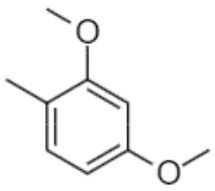
Jako další příklad bychom mohli uvést čajové katechiny, které jsou obsaženy v zeleném čaji. Tyto látky působí jako antioxidanty, díky vlivu na transkripční faktory a enzymovou aktivitu, a je vysoce pravděpodobné, že velkou měrou přispívají k příznivým účinkům v působení proti oxidačnímu poškození lipidů, proteinů a DNA *(Higdon et al., 2003).*

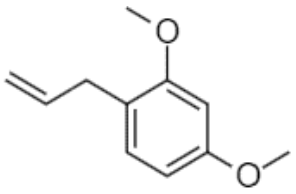
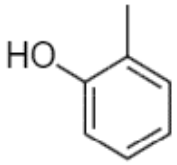
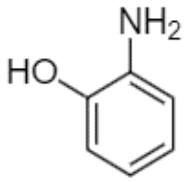
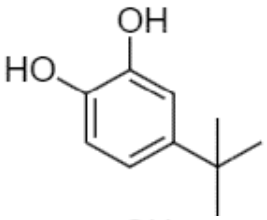
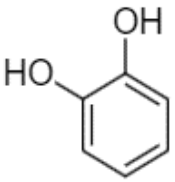
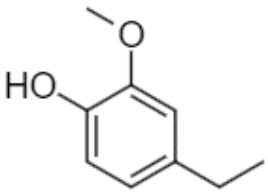
Čajové katechiny, především epigallokatechin-3-gallát, vykazují antikancerogenní účinky. Nicméně, jejich efekt na prevenci a terapii karcinomu prsu není stále jednoznačný *(Li et al., 2014).*

2.3.2 Deriváty katecholu použité v této práci

V této práci bylo použito třináct látek, které byly, až na jednu výjimku odvozeny od základní struktury katecholu. Tou výjimkou je pyrokatechol (PC), který má základní strukturu. Zástupci 3-methylkatechol (3-MC) a 4-methylkatechol (4-MC), stejně jako 4-terc-butylkatechol (4-TBC) jsou deriváty katecholu substituované na katecholovém jádře jednoduchým nebo rozvětveným alkylem, 3-methoxykatechol (3-MOC), 2-methoxy-4-methylfenol (2-MO-4-MePh), 2,4-dimethoxytoluen (2,4-DMeT) a 4-allyl-1,2-dimethoxybenzen (4-AL-DMB) jsou deriváty obsahující v polohách 2, 3 nebo 4 methoxy skupinu. 4-aminokatechol (4-AC) je zástupce sestávající z katecholového jádra substituovaného aminoskupinou v poloze 4. 2-aminofenol (2-APh) vzniká náhradou hydroxyskupiny v ortho-poloze za aminoskupinu, zatímco *o*-kresol (o-Cr) je na stejném uhlíku methylován. Zástupce 3-fluorokatechol (3-FC) je v poloze 3 substituován fluorem. Poslední z použitých derivátů je 4-ethylguajakol (4-EG), což je fenol substituovaný v poloze 2 methoxyskupinou a v poloze 4 je ethyl. **(Tabulka 3)**

Tabulka 3: Struktury použitých derivátů katecholu, jejich zkratky a vzorce.

Název derivátu, IUPAC - název	**Používaná zkratka**	**Vzorec**
4-aminokatechol 4-aminobenzene-1,2-diol	4-AC	
3-fluorokatechol 3-fluorobenzene-1,2-diol	3-FC	
3-methylkatechol 3-methylbenzene-1,2-diol	3-MC	
4-methylkatechol 4-methoxybenzene-1,2-diol	4-MC	
3-methoxykatechol 3-methoxybenzene-1,2-diol	3-MOC	
2-methoxy-4-methylfenol 2-methoxy-4-methylphenol	2-MO-4-MePh	
2,4-dimethoxytoluen 2,4-dimethoxy-1-methylbenzene	2,4-DMeT	

4-allyl-1,2-dimethoxybenzen 1,2-dimethoxy-4-prop-2-enylbenzene	4-AL-DMB	
o-kresol2-methylphenol	o-Cr	
2-aminofenol 2-amynophenol	2-APh	
4-*terc*-butylkatechol 4-tert-butylbenzene-1,2-diol	4-TBC	
pyrokatechol benzene-1,2-diol	PC	
4-ethylguajakol 4-ethyl-2-methoxyphenol	4-EG	

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je zhodnotit cytotoxickou aktivitu třinácti derivátů katecholu v lidské buněčné linii karcinomu prsu MCF-7 a studovat vliv těchto derivátů na genovou expresi ER.

4 METODICKÁ ČÁST

4.1 Kultivace buněk

4.1.1 Podmínky pro kultivaci

Pro kultivaci buněk je důležité, aby podmínky in vitro byly stejné jako podmínky v lidském organismu. Tyto podmínky jsou zabezpečeny uchováváním buněk v inkubátoru s regulovanou teplotou, vlhkostí a koncentrací CO_2. Při manipulaci s buňkami je nutná práce ve sterilním prostředí, které je zajištěno laminárním boxem. Pro kultivaci buněk se používají kultivační lahve, kam se umístí buňky společně s kultivačním médiem. Co se týče experimentu, bylo použito komerční médium DMEM/F-12 (ThermoFischer, Waltham, MA, USA), ke kterému se přidaly ještě další přísady, které jsou nutné pro růst buněčné linie MCF-7. **(Tabulka 4)** Jednou z nich je fetální bovinní sérum (FBS), které podporuje růst buněk (ThermoFischer, Waltham, MA, USA). Při práci použitá varianta je bovinní sérum upravené filtrací přes filtr s aktivním uhlím (CS-FBS). Díky tomu se eliminuji steroidní hormony v séru, a proto je vhodnější pro studium aktivity hormonů. K médiu se přidávají ještě antibiotika (Penicilin/Streptomycin 10 000U/10mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) jako prevence kontaminace buněk a insulin ((Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Médium je nutné měnit 2-3 x týdně, protože obsahuje metabolický odpad, který buňky vylučují.

Tabulka 4: Složení média pro kultivaci buněčné linie MCF-7

Látka	Množství	Původní koncentrace	Finální koncentrace
DMEM/F-12	500 mL	x	x
CS-FBS	50 mL	x	10 %
Antibiotika	5 mL	x	1 %
Insulin	1.5 mL	2 mg/mL	6 ng/mL

4.1.2 Pasážování buněk

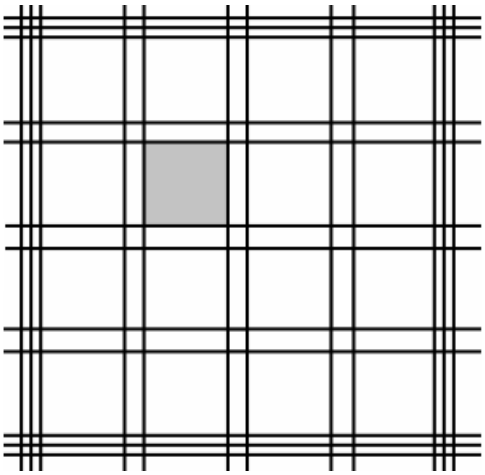
Pasážování buněk se provádí, když buňky pokrývají 75-85 % dna kultivační nádoby. Tehdy je potřeba buněčnou kulturu rozdělit na více částí, přenést část buněk do nové kultivační lahve, popř. lahví, a přidat nové médium. Nejen před pasážováním, ale i v průběhu kultivace je vhodné kontrolovat buňky pod mikroskopem.

Před pasážováním se do laminárního boxu přichystají všechny potřebné pomůcky. Reagencia a médium se ohřeje ve vodní lázni na teplotu 37°C.

Z kultivační lahve se odsaje staré médium a přidá se 2-3 mL fosfátového pufru (PBS), který opláchne buňky. Pufr se poté odsaje a přidá se 1-2 mL reagencia tryPLE™ (ThermoFischer, Waltham, MA, USA), díky němuž se buňky enzymaticky oddělí od povrchu lahve, a i od sebe navzájem. Kultivační lahev se následně ponechá 5-7 minut v inkubátoru, aby mohl proces proběhnout. Kontrolou suspenze proti světlu se zjistí, jestli jsou všechny buňky uvolněné od stěn. Do kultivační lahve se následně přidají přibližně 3 mL média, čímž se neutralizují účinky tryPLE™. Buňky se resuspendují pipetou, aby se předešlo vzniku shluků. Následně mohou být buňky využity k experimentu nebo se část buněk v určitém poměru nasadí do nové lahve společně s dalšími 7 mL média. Kultivační lahev se umístí do inkubátoru a pravidelně se mění médium. Pasážování je nutné pro buněčnou linii MCF-7 opakovat přibližně 1x týdně.

4.1.3 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Počítání buněk je důležité pro výpočet koncentrace buněk v suspenzi. K 10 µL buněk se přidá methylová modř pro odlišení mrtvých a živých buněk – mrtvé buňky jsou tmavé, protože barvivo projde dovnitř z důvodu nefunkční cytoplazmatické membrány – v poměru 1:1. 10 µL suspenze se následně pipetuje do Bürkerovy komůrky. Pod mikroskopem se počítají buňky v obou částech, dohromady v 16 malých čtvercích o straně 0,20 mm. **(Obr. 9)** Pokud se buňky nachází na okraji čtverce, počítají se jen ty, které se dotýkají levého a horního okraje. Buňky, které se dotýkají pravého a dolního okraje se nepočítají. Dále je určen počet buněk v 1 mL. **(Rovnice 1)**



Obrázek 9: Bürkerova komůrka. Počítací čtverec je označen šedě. Převzato a upraveno z: *http://www.rustreg.upol.cz/_materials/bubcv/BUBCV4.pdf*.

Rovnice 1: Výpočet počtu buněk v 1 mL suspenze

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

x = počet buněk v 1 mL suspenze

a = vypočítaný počet buněk

n = počet spočítaných čtverců

V = objem

4.1.4 Nasazení do mikrotitrační destičky

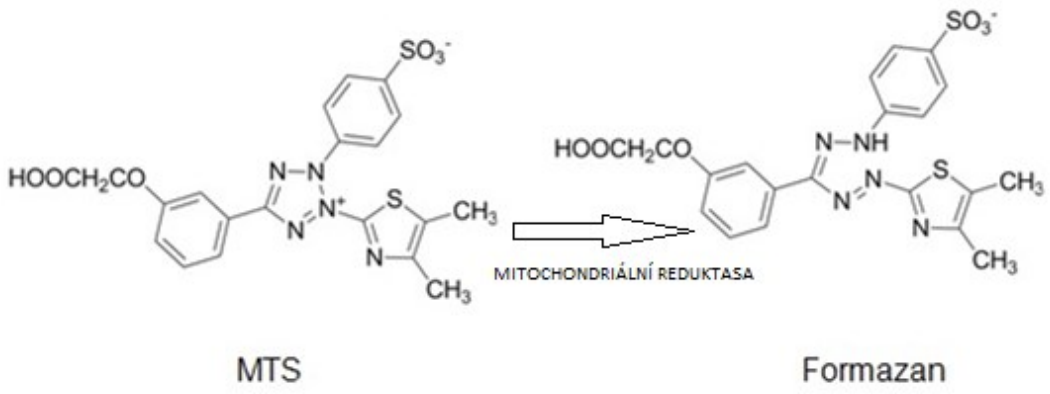
Pro účely této práce bylo potřeba do 96jamkové destičky v první fázi experimentu – měření cytotoxické aktivity, přidat 80 000 buněk na jamku; ve druhé fázi, kultivace buněk pro PCR, potom do 48jamkové destičky přidat 240 000 buněk na jamku. Do 96jamkové destičky se dále přidalo 150 µL média, do 48jamkové destičky pak 300 µL média obsahujícího daný počet buněk. Destičky se následně inkubují 48 hodin a poté se využijí pro stanovení cytotoxicity buněk nebo pro stanovení genové exprese.

4.2 Stanovení cytotoxicity buněk

Cytotoxicita buněk je jedním z nejdůležitějších ukazatelů v *in vitro* studiích. Poškození buněk cytotoxickými látkami se může projevit na různých úrovních, například poškozením buněčných membrán, inhibicí syntézy proteinů, inhibicí enzymatických reakcí nebo ireversibilním obsazením receptorů v buňce. Výhodou metod, které se pro studium cytotoxicity používají je jejich rychlost, nízké náklady, spolehlivost a snadná reprodukovatelnost. Nejčastěji používané jsou kolorimetrické metody založené na reakci solí tetrazolia s enzymem reduktasou produkovanou mitochondriemi, za vzniku barevných sloučenin. Výsledky jsou detekovány spektrofotometricky *(Aslantürk, 2018)*.

Nejužívanější MTT Assay je jednoduchý kolorimetrický test buněčné proliferace a životaschopnosti, který vytvořil Mosmann v roce 1983. Test je založen na přeměně soli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) na formazan díky mitochondriální aktivitě v živých buňkách. Vzniklé soli formazanu jsou nerozpustné, a proto je nutné přidat před detekcí solubilizační roztok, což není moc výhodné *(Riss et al., 2013)*.

Novější metodou je analog MTT – žlutá sůl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS). **(Obr. 10)** Výhodou MTS Assay je, že vznikající zbarvený produkt je dobře rozpustný v kultivačním médiu, proto není potřeba přidávat solubilizační roztok, a díky tomu je zjednodušen celý proces. Princip metody je založen, stejně jako v případě MTT, na redukci tetrazoliových solí zásluhou mitochondriálních dehydrogenas a jejich kofaktorů NADH a NADPH *(Riss et al., 2013, Aslantürk, 2018)*.



Obrázek 10: Přeměna soli MTS (žluté zbarvení) na formazan (fialové zbarvení) redukcí mitochondriálním metabolismem. Převzato a upraveno z: *Riss et al., 2013*

První fází experimentu je stanovení cytotoxické aktivity buněk, které bylo provedeno pomocí MTS Assay na buněčné linii MCF-7/S0.5. Nasazená 96jamková destička (80 00 buněk/jamka) byla 48 hodin inkubována. Následně bylo odsáto médium a přidány roztoky třinácti zkoušených katecholů v koncentracích 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM v objemu 100 µL na jamku. Vzorky byly pipetovány jako triplikáty. Pokaždé byl také v destičce přítomen dimethylsulfoxid 0.1 % (DMSO) jako rozpouštědlo pro látky, a dodecylsíran sodný 10 % (SDS) jako pozitivní kontrola. **(Obr. 11)** Po další 48hodinové kultivaci bylo do jamek přidáno 20 µL činidla MTS (Promega, USA) a destičky vráceny do inkubátoru. Po 3 hodinách byla spektrofotometrem měřena absorbance při vlnové délce 490 nm. V každé destičce byl přidán také DMSO 0.1% a SDS 10%. Obdobně se postupovalo s dalšími vzorky katecholů.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	DMSO 0.1%	SDS 10%	4-AC 100	4-AC 50	4-AC 25	4-AC 10	4-AC 1			
B	DMSO 0.1%	SDS 10%	4-AC 100	4-AC 50	4-AC 25	4-AC 10	4-AC 1			
C	DMSO 0.1%	SDS 10%	4-AC 100	4-AC 50	4-AC 25	4-AC 10	4-AC 1			
D	3-FC 100	3-FC 50	3-FC 25	3-FC 10	3-FC 1	3-MC 100	3-MC 50	3-MC 25	3-MC 10	3-MC 1
E	3-FC 100	3-FC 50	3-FC 25	3-FC 10	3-FC 1	3-MC 100	3-MC 50	3-MC 25	3-MC 10	3-MC 1
F	3-FC 100	3-FC 50	3-FC 25	3-FC 10	3-FC 1	3-MC 100	3-MC 50	3-MC 25	3-MC 10	3-MC 1

Obrázek 11: Vzorový příklad 96jamkové destičky připravený na měření cytotoxické aktivity. Vzorky byly pipetovány v triplikátech v pěti různých koncentracích v mM.

4.3 Genová exprese

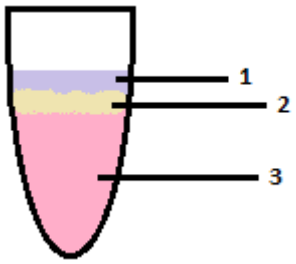
4.3.1 Izolace mRNA

Druhá fáze experimentu je studium genové exprese pomocí RT-PCR. Nejprve je potřeba izolovat mRNA z kultivovaných buněk. Pro tyto účely jsou buňky nasazeny v 48jamkové destičce, v množství 240 000 buněk na jamku. Destička se poté inkubovala 48 hodin. Poté bylo odsáto médium a přidány roztoky vzorků o koncentraci 10 µM v objemu 300 µL na jamku a pipetováno jako duplikáty. Přidán byl DMSO 0.1 % a Estradiol (E2) 10 nM. **(Obr. 12)** Po dalších 48 hodinách v inkubátoru bylo odsáto médium a přidáno 140 µL činidla TRIzol™ (ThermoFischer, Waltham, MA, USA) na jamku. Takto připravená destička byla před následnými kroky, buď zamrazena při -20 °C, nebo inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a použita.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	DMSO 0.1%	DMSO 0.1%	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM		
B	E2 10 nM	E2 10 nM	2-Mo-4-MePh 10 µM	2-Mo-4-MePh 10 µM	PC 10 µM	PC 10 µM		
C	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM		
D	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM				
E	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM				
F	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM				

Obrázek 12: Vzor připravené 48jamkové destičky připravené k izolaci mRNA. Jednotlivé vzorky byly přidány v duplikátech v objemu 300 µL.

Vzorky byly pipetovány do 1,5 mL zkumavek. Byl přidán chloroform v množství odpovídajícím polovině použitého TRizolu. Vzorky byly pečlivě protřepány mimo laminární box po dobu přibližně 15 vteřin a poté umístěny do centrifugy (12 000 g, 4 °C, 15 minut). Ve zkumavce zůstaly odděleny 3 fáze. **(Obr. 13)** Transparentní fáze na povrchu, která obsahuje genetický materiál, se odebere do čistých 1,5 mL zkumavek. Ke vzorkům se přidalo 400 µL isopropanolu, zhomogenizovaly se pomocí vortexu a nechaly kultivovat 10 minut při laboratorní teplotě. Následně se vzorky centrifugovaly (12 000 g, 4 °C, 15 minut). Po centrifugaci se odstranilo rozpouštědlo tak, aby na dně zůstal netknutý pelet, a bylo pipetováno 800 µL ethanolu 70 %. Následovala poslední centrifugace (7 500 g, 4 °C, 5 minut) a poté bylo co největší množství ethanolu odstraněno, zbytek se nechal odpařit 5–10 minut při laboratorní teplotě. Ke vzorkům se poté přidalo 20 µL vody zbavené nukleáz a pelety se rozpustily. Z jednotlivých vzorků byly odebrány 2 µL a přemístěny do 0,5 mL zkumavek. Tyto vzorky se použily pro spektrofotometrické měření čistoty a koncentrace vyizolované mRNA.



Obrázek 13: Oddělené fáze ve zkumavce po centrifugaci. 1: průhledná vodná fáze obsahující mRNA, 2: bílá vrstva celulární debris, 3: růžová fáze činidla TRIzol™.

4.3.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda založená na schopnosti enzymu DNA polymerasa syntetizovat nové vlákno DNA, které je komplementární k templátu. Celý proces je prováděn v termocykleru za různých teplot a sestává ze tří kroků – denaturace DNA (90–97 °C), nasednutí (annealing) primerů na DNA (50–60 °C) a prodlužování nového komplementárního vlákna DNA (72 °C). Proces se opakuje v cyklech, přičemž množství DNA exponenciálně roste podle vztahu 2^n. Na podkladě klasické PCR vznikla real-time qPCR – kvantitativní PCR v reálném čase, která umožňuje okamžitě určit množství specifické DNA ve vzorku *(Joshi et al., 2010.)*

4.3.3 Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí se používá v případě, kdy je výchozí molekulou mRNA. Výsledkem reverzní transkripce pak tzv. komplementární DNA (cDNA), která je poté amplifikována pomocí PCR.

a) Reverzní transkripce

Premix pro reverzní transkripci byl připraven na ledu. **(Tabulka 5)** Použit byl High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Připravené vzorky izolované mRNA, které byly naředěny na stejnou koncentraci, byly pipetovány do stripu v objemu 3 µL. Poté bylo pipetováno 17 µL premixu pro RT na konečný objem 20 µL. Pro správný průběh metody byly teplota a čas nastaveny dle požadavku výrobce. **(Tabulka 6)** Po dokončení reakce a ochlazení na ledu bylo ke každému vzorku pipetováno 100 µL vody zbavené nukleáz. Vzorky byly poté použity pro PCR nebo byly zmrazeny při teplotě -20 °C.

Tabulka 5: Příprava premixu pro reverzní transkripci.

Pořadí přidávání	PREMIX	Objem [µL]
3	Random Hexamer primer mix	1
4	dNTP mix	1
1	5x RT buffer	4
6	RNAase inhibitior	1
5	Tetro Reverse Transcriptase	1
2	DEPC-treated water	9

Tabulka 6: Podmínky reversní transkripce.

Fáze	Teplota [°C]	Čas [min]
1	25	10
2	45	30
3	85	5

b) Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Jako první byl připraven premix pro q-PCR. Použit byl TaqMan Fast Advanced Master mix. **(Tabulka 7)** Jako cílové byly použity dva estrogen responsivní geny, a to gen kódující ERα – estrogen receptor 1 (ESR1), trefoil factor 1 (TFF1).

Trefoil factor 1 je malý peptid. Gen pro TFF1 byl původně nalezen v karcinomu prsu *(Masiakowski et al., 1982)*. TFF1 je nadměrně exprimován u přibližně 50 % nádorů prsu a je považován za prediktivní faktor pozitivní odpovědi na hormonální léčbu karcinomu prsu *(Markićević et al., 2014)*.

Aby mohly být výsledky správně interpretovány, je nutné použít také referenční gen, tzv. housekeeping gen. Housekeeping gen musí být dostatečně exprimován v cílové tkáni, a vykazovat minimální variabilitu v expresi mezi jednotlivými vzorky nebo za rozdílných

experimentálních podmínek *(Silver et al., 2008)*. Pro účely práce byl použit gen pro protein β-aktin. **(Obr. 14)**

Mastermix byl zhomogenizován ve vortexu a rozpipetován do 96jamkové mikrotitrační amplifikační destičky na PCR v objemu 7,5 µL. Poté bylo přidáno 2,5 µL jednotlivých vzorků cDNA a smícháno. **(Tabulka 8)** Aby se vzorek neodpařil, přelepila se destička fólií. Následně se zcentrifugovala a vložila do termocycleru.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	2,4-DMeT 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	ESR1
B	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	2,4-DMeT 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	β-ACTIN
C	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	4-AC 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	2,4-DMeT 10 µM	TFF1
D	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM	3-FC 10 µM				
E	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM	3-MC 10 µM				
F	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM	4-MC 10 µM				
G	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM	3-MOC 10 µM				
H	2-MO-4-MePh 10 µM	2-MO-4-MePh 10 µM	2-MO-4-MePh 10 µM	2-MO-4-MePh 10 µM	2-MO-4-MePh 10 µM	2-MO-4-MePh 10 µM	2-MO-4-MePh 10 µM	2-MO-4-MePh 10 µM	2-MO-4-MePh 10 µM				
	ESR1			β-ACTIN			TFF1						

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %	DMSO 0.1 %			
B	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM	E2 10 nM			
C	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM	4-AL-DMB 10 µM			
D	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM	o-Cr 10 µM			
E	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM	2-Aph 10 µM			
F	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM	4-TBC 10 µM			
G	PC 10 µM	PC 10 µM	PC 10 µM	PC 10 µM	PC 10 µM	PC 10 µM	PC 10 µM	PC 10 µM	PC 10 µM			
H	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM	4-EG 10 µM			
	ESR1			β-ACTIN			TFF1					

Obrázek 14: Vzor 96jamkových destiček připravených na proces PCR. Vzorky cDNA byly pipetovány v objemu 2,5 µL, Mastermix v objemu 7,5 µL. Jednotlivé geny jsou odlišeny barevně.

Tabulka 7: Složení Mastermixu pro PCR

Složení
Taq DNA polymerasa
Uracil-N-glukosylasa (UNG)
Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs) s Deoxyuridintrifosfátem (dUTP)
Barvivo ROX
Optimalizovaný pufr

Tabulka 8: Příprava mastermixu pro jeden vzorek.

Mastermix	**Objem na 1 vzorek [µL]**
Voda pro PCR	3.5
Mastermix	3.5
Taq primery	0.5

Pro správné provedení PCR bylo potřeba nastavit a dodržovat přesnou teplotu a čas v jednotlivých fázích. **(Tabulka 9)**

Tabulka 9: Podmínky pro qCR

Fáze PCR	**Teplota [°C]**	**Čas**
Holding stage	50	2 min
	95	2 min
Cycling stage (40x)	95	1 s
	60	20 s

Fáze PCR

1. Fáze denaturace

DNA je zahřáta na vysokou teplotu a díky překročení bodu tání dochází k její denaturaci, a k rozpletení a oddělení jednotlivých vláken.

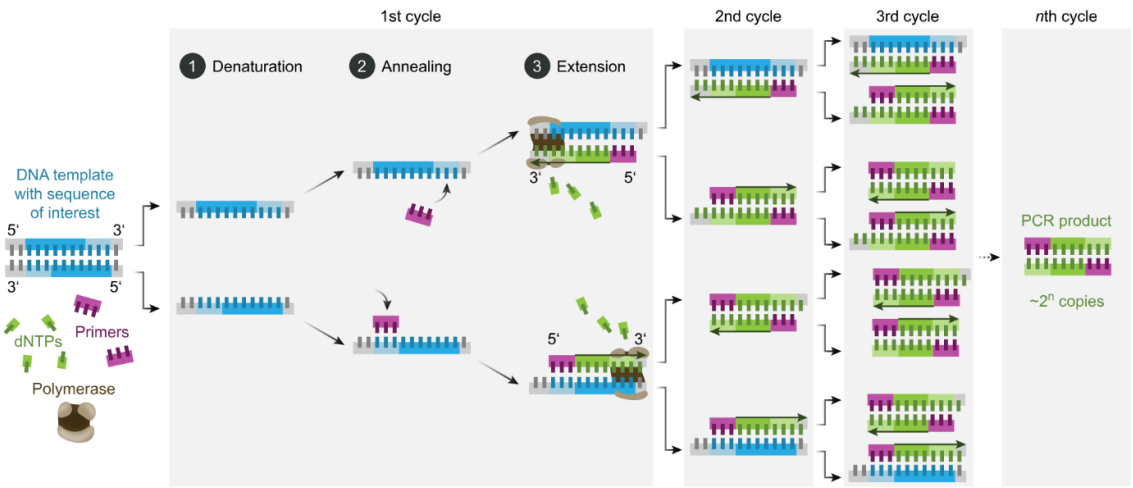
2. Annealing primerů

Jedná se o proces, kdy jsou primery navázány na mateřské vlákno DNA. Primery jsou krátké fragmenty DNA definované sekvence, které jsou komplementární s cílovou DNA. Tento proces probíhá za nižší teploty, 50-60 °C *(Joshi et al., 2010)*.

3. Elongace DNA

Ve třetí fázi je teplota reakce zvýšena na přibližných 72 °C na 2-5 minut. Na primery nasedá enzym Taq polymerasa, což je enzym DNA-polymerasa izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus* aktivní i v extrémních podmínkách. Působením enzymu dochází k elongaci vlákna a k vytvoření kopie DNA **(Obr. 15)** *(Garibyan et al., 2013)*.

Celý proces je opakován ve 30–40 cyklech, dokud není vytvořeno dostatečné množství genetického materiálu pro analýzu.



Obrázek 15: Fáze polymerázové řetězové reakce: 1 – Denaturace DNA, 2 – Annealing primerů, 3 – Prodlužování vlákna DNA a opakování procesu v cyklech. Převzato: *https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction-en.svg*

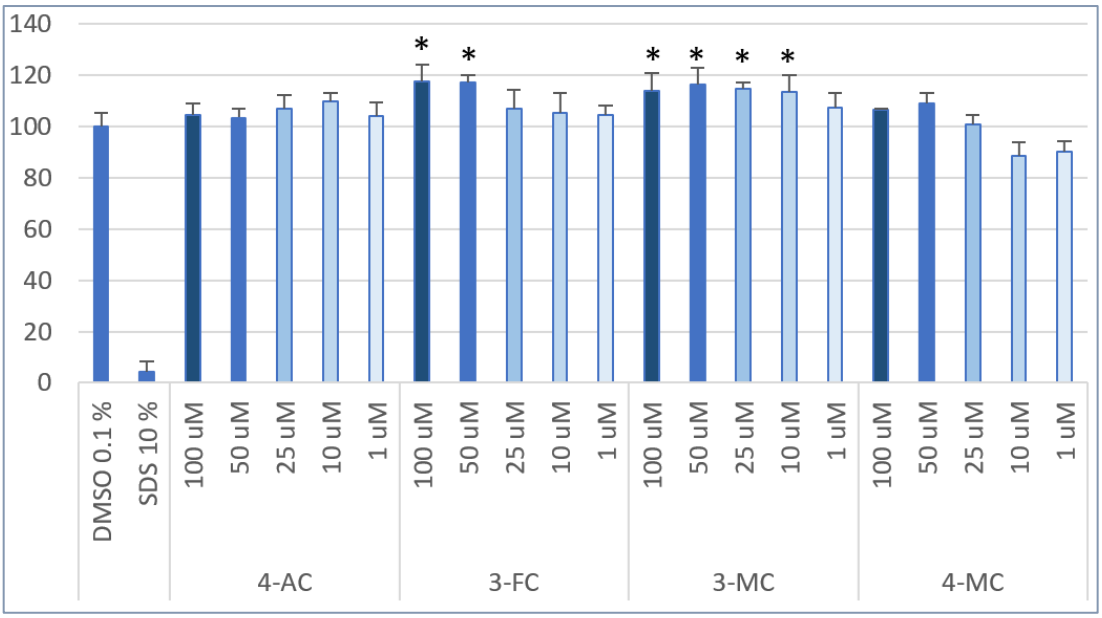
5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledky cytotoxické aktivity v buněčné linii MCF-7/S0.5

V první fázi diplomové práce byla určována cytotoxická aktivita třinácti vybraných derivátů katecholu na parenterální buněčnou linii karcinomu prsu MCF7/S0.5. Všech třináct katecholů bylo testováno v 5 koncentracích – 100 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM a 1 μM. Nejvyšší koncentrace 100 μM byla použita kvůli projevení případné toxicity daného derivátu pro buňky. Nejzajímavější bylo sledovat dvě nejslabší koncentrace 10 μM a 1 μM. Koncentrace 10 μM je nejčastěji používanou během *in vivo* experimentů na laboratorních zvířatech. Zajímavé by bylo i porovnání akutní toxicity s toxicitou chronickou při pravidelném podávání, kde se dá předpokládat i vliv nižší koncentrace látek, které by však byly podávány pravidelně. Avšak, takovéto studium není cílem této práce.

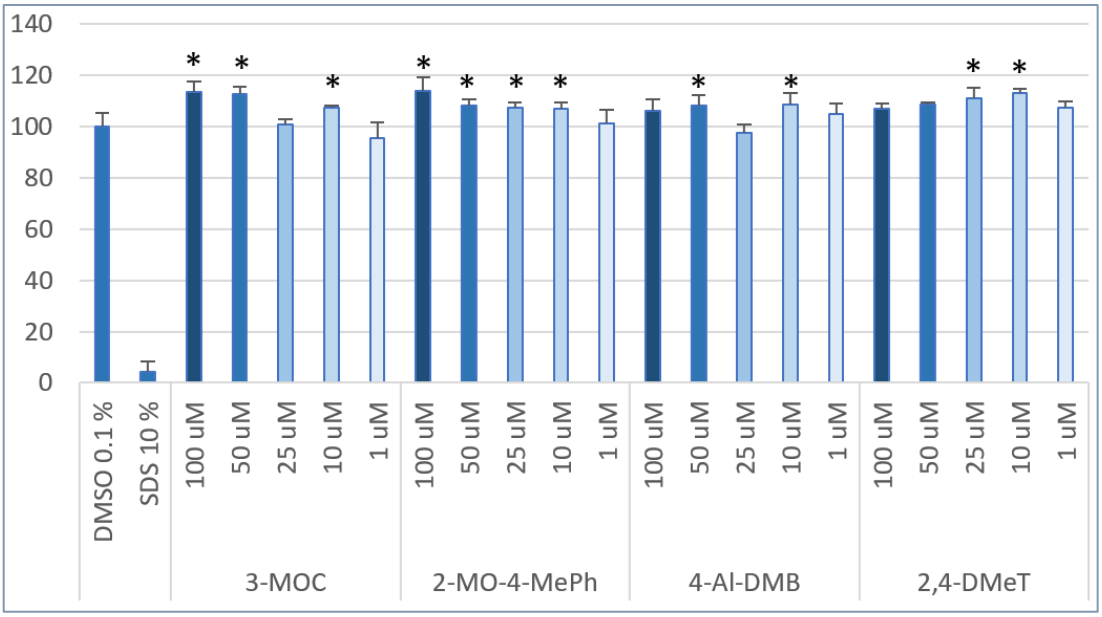
Během zpracovávání výsledků byl jako pozitivní kontrola použit SDS 10 %, který usmrtil všechny buňky. Pro stanovení 100% viability (životaschopnosti) buněk byl využit DMSO 0.1 %, který byl během procesu použit jako rozpouštědlo pro katecholy. Výsledky byly získány pomocí MTS Assay.

Nejnižší viabilita byla naměřena podle získaných výsledků u derivátů 4-MC a 3-MOC, a to v nízkých koncentracích 10 μM a 1 μM. Z výsledků lze usoudit, že zkoumané deriváty vykazují nízkou cytotoxickou aktivitu, která klesá s rostoucí koncentrací látek. Hodnotíme-li výsledky z opačného pohledu, tedy z pohledu viability – životoaschopnosti, můžeme říci, že použité katecholy mají na buňky spíše proliferativní účinky a podporují tak jejich růst. Tento trend můžeme sledovat postupně ve větší či menší míře u všech derivátů, přičemž nejvýraznější proliferativní účinky, a tím pádem nejnižší cytotoxickou aktivitu, vykazuje derivát 2-aminofenol (2-Aph) ve všech koncentracích, a to až o 57 % v koncentraci 100 μM a o 61 % u koncentrace 50 μM. Výsledky byly pro lepší přehlednost rozděleny do tří grafů **(Graf 1, 2, 3)**.



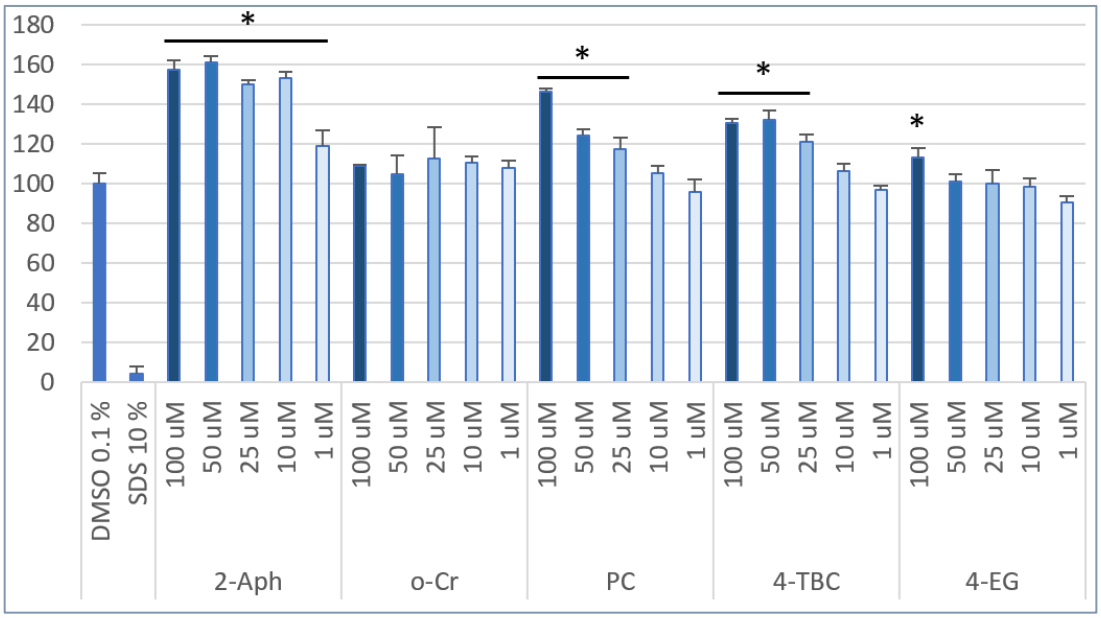
Graf 1: MTS cytotoxický assay. Látky byly testovány v pěti různých koncentracích a výsledky porovnávány s DMSO 0.1 % a SDS 10 %. Látky byly testovány v triplikátech minimálně ve třech nezávislých měřeních. Vyjádření viability buněk v %. Výsledky cytotoxické aktivity katecholů 4-AC, 3-FC, 3-MC a 4-MC. Statistický test one-way ANOVA, * $p < 0.05$.

Nejnižší viabilitu ze všech zkoušených látek vykazovala látka 4-MC a to v koncentracích 10 µM a 1 µM, kde se pohybovala okolo 90 %. U ostatních látek se projevily proliferativní účinky s viabilitou neklesající pod 100 % v žádné z testovaných koncentrací. Z těchto čtyř vzorků prokazovaly nejvyšší viabilitu látky 3-FC a 3-MC v koncentraci 100 µM a 50 µM, s hodnotami okolo 115 %.



Graf 2: MTS cytotoxický assay. Látky byly testovány v pěti různých koncentracích a výsledky porovnávány s DMSO 0.1 % a SDS 10 %. Látky byly testovány v triplikátech minimálně ve třech nezávislých měřeních. Vyjádření viability buněk v %. Výsledky cytotoxické aktivity katecholů 3-MOC, 2-MO-4-MePh, 4-AL-DMB, 2,4-DMeT. Statistický test one-way ANOVA, * $p < 0.05$.

Nejnižší viabilita v této skupině látek se pohybovala okolo 95 % u derivátu 3-MOC v nejnižší koncentraci 1 μM. Zajímavé je, že u látky 4-AL-DMB byly nejnižší hodnoty naměřeny při koncentraci 25 μM, kde klesly dokonce pod 100 %, avšak v jiných koncentracích se chovaly mírně proliferativně. U ostatních látek bylo taktéž možné pozorovat hodnoty pohybující se kolem 113 %. ve všech koncentracích.



Graf 3: MTS cytotoxický assay. Látky byly testovány v pěti různých koncentracích a výsledky porovnávány s DMSO 0.1 % a SDS 10 %. Látky byly testovány v triplikátech minimálně ve třech nezávislých měřeních. Vyjádření viability buněk v %. Výsledky cytotoxické aktivity katecholů 2-Aph, o.Cr, PC, 4-TBC, 4-EG. Statistický test one-way ANOVA, * $p < 0.05$.

Látka 2-APh vykazovala nejmenší cytotoxickou aktivitou, u koncentrací 100 µM, 50 µM, 25 µM a 10 µM se nárůst buněčné kultury pohyboval mezi 40 – 60 %. Vysoké proliferativní účinky v porovnání s dalšími deriváty měly i látky PC a 4-TBC. U těchto látek a 4-EG se se snižující se koncentrací objevila cytotoxická aktivita, u 4-EG viabilita klesla až na 90 %, což je srovnatelné s derivátem 4-MC popsaným výše

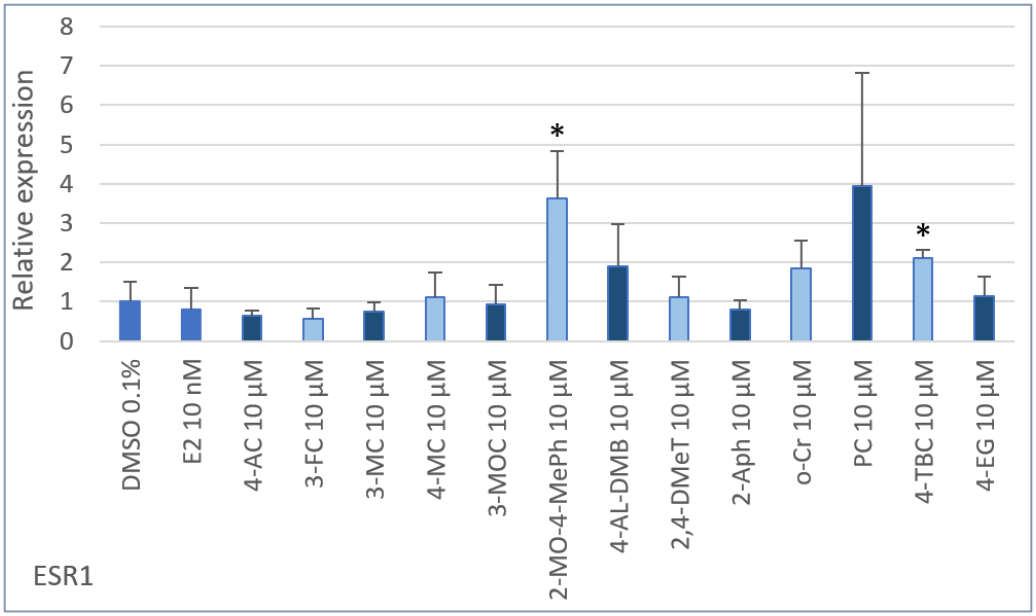
.

5.2 Výsledky genové exprese

Ve druhé části experimentu byla pomocí RT-qPCR sledována genová exprese estrogen responsivních genů. Zvoleny byly dva cílové geny na ER, a to Trefoil Factor 1 (TFF1) a Estrogen Receptor 1 (ESR1), a byla zkoumána interakce testovaných látek na estrogenní receptor. Pro vyhodnocení výsledků byla použita metoda, kdy se mezi sebou porovnávají relativní změny v genové expresi ve vzorku oproti referenčnímu genu. Referenční gen je takový gen, který je v buňkách stabilně exprimován, pro účely této práce/experimentu byl použit β-actin.

Genová exprese byla studována na buněčné linii karcinomu prsu MCF-7/S0.5 stejně jako cytotoxická aktivita. Testovány byly všechny katecholové deriváty v jednotné koncentraci 10 μM. K experimentu byl opět přidán i DMSO 0.1 %, který byl použit jako rozpouštědlo látek, a také estradiol (E2) v koncentraci 10 nM jako přirozený endogenní ligand ER, který sloužil jako porovnávací látka.

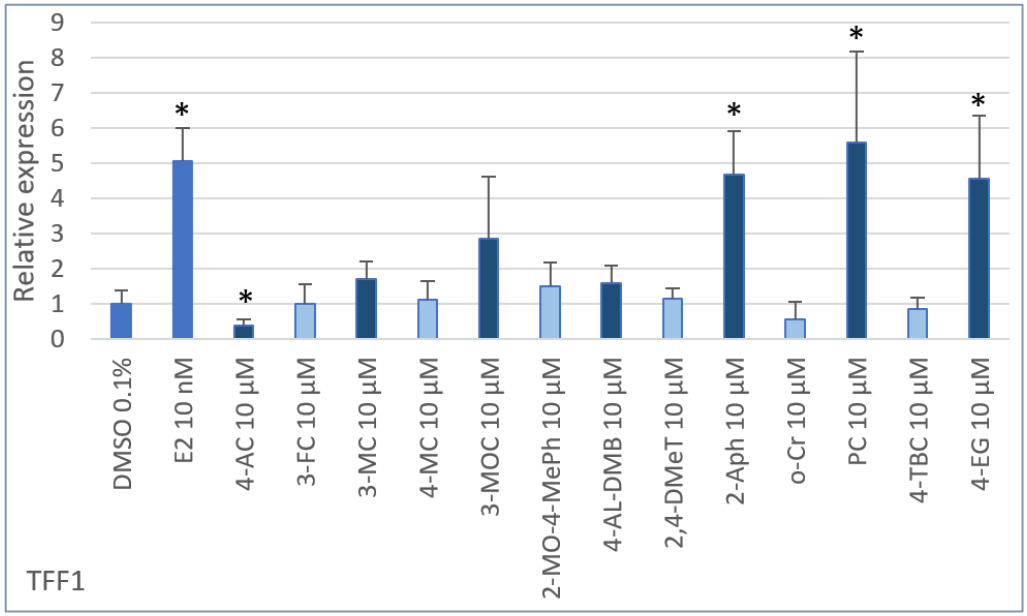
5.2.1 Výsledky pro gen Estrogen Receptor 1



Graf 4: Výsledky RT-qPCR. Genová exprese genu ESR1 v linii MCF-7/S0.5. Látky byly testovány v triplikátech minimálně ve třech nezávislých měřeních. Statistický test one-way ANOVA, * $p < 0.05$.

U genu ESR1 se u estradiolu projevila represivní exprese. Podobný efekt byl pozorován u dalších pěti látek: 4-AC, 3-FC, 3-MC, 3-MOC, 4-APh. Nižší genovou expresi oproti estradiolu měly vzorky 4-AC a 3-FC, lze tedy předpokládat, že se jedná o silnější aktivátory ER. Látka 3-MOC sice vykazovala nepatrně vyšší aktivitu než E2, ale stále byla snížená oproti vehikulu. Chování těchto derivátů naznačuje vysokou afinitu látek k estrogennímu receptoru. Co se týče ostatních derivátů, nejvyšší aktivace genu ESR1 byla zjištěna u látky PC a 2-MO-4-MePh v koncentraci 10 µM. Přibližně dvojnásobnou aktivaci než estradiol 10 nM potom vykazovaly látky 4-AL-DMB a o-Cr. Relativní exprese u látek 4-MC, 2,4-DMeT a 4-EG byla srovnatelná s vehikulem DMSO 0.1 %, látky tak nemají na genovou expresi ESR1 vliv.

5.2.2 Výsledky pro gen Trefoil Factor 1



Graf 5: Výsledky RT-qPCR. Genová exprese genu TFF1 v linii MCF-7/S0.5. Látky byly testovány v triplikátech minimálně ve třech nezávislých měřeních. Statistický test one-way ANOVA, * $p < 0.05$.

Násobná aktivace genu TFF1 byla zřetelná u všech zkoušených látek. Exprese estradiolu vykazovala při koncentraci 10 nM přibližně pětinásobně vyšší hodnotu oproti vehikulu i genu ESR1. Pouze jedna další látka měla vyšší aktivitu než E2, a to PC. O něco nižší aktivitu než estradiol měli pak 2-APh a 4-EG; 3-MOC vykazoval aktivitu téměř poloviční. Další deriváty významných hodnot násobné aktivace nedosáhly. Genová exprese srovnatelná s vehikulem DMSO 0.1 % byla pozorována u látek 3-FC, 4-MC a 4-DMeT. Vzorky o-Cr a 4-TBC vykazovaly o něco nižší aktivitu než vehikulum. Úplně nejnižších hodnot genové exprese dosáhla látka 4-AC.

6 DISKUZE

Katecholy jsou organické sloučeniny podobné polyfenolům, které se běžně vyskytují i v lidském organismu, kde fungují jako prekurzory katecholaminových neurotransmiterů nebo to jsou metabolity endogenních degradačních procesů *(Schweigert et al. 2001)*. Do organismu běžně vstupují také exogenní katecholy např. čajové katechiny, katecholy kávy nebo dalších potravin. *(Higdon et al., 2003)*

K tomuto experimentu bylo vybráno třináct derivátů katecholu a studována jejich cytotoxická aktivita, a dále, jejich interakce s ERα. Jednalo se o tyto látky: 4-aminokatechol (4-AC), 3-fluorokatechol (3-AC), 3-methylkatechol (3-MC), 4-methylkatechol (4-MC), 3-methoxykatechol (3-MOC), 2-methoxy-4-methylfenol (2-MO-4-MePh), 2,4-dimethoxytoluen (2,4-DMeT), 4-allyl-1,2-dimethoxybenzen (4-AL-DMB), *o*-kresol (o-Cr), 2-aminofenol (2-APh), 4-*terc*-butylkatechol (4-TBC), pyrokatechol (PC) a 4-ethylguajakol (4-EG).

Pro studium aktivity těchto derivátů na estrogenní receptor byla vybrána buněčná nádorová linie prsního karcinomu MCF-7/S0.5, která ve vysoké míře exprimuje isoformu ERα *(Comsa et al., 2015)*.

Nejprve byla v buněčné linii studována toxicita všech třinácti vybraných katecholových derivátů v pěti koncentracích. Tři nejvyšší koncentrace 100 μM, 50 μM a 25 μM jsou velmi vysoké a v žádném případě se nikdy nebudou nacházet v lidském organismu. Zvoleny byly proto, aby se dostatečně projevila případná cytotoxicita a byly získány bližší bezpečnostní informace o látkách. U nižších koncentrací 10 μM a 1 μM je větší pravděpodobnost, že by mohly být v organismu přítomny. Jsou to takové koncentrace, které bývají běžně užívány experimentálně, protože z hlediska bezpečnosti bývají nejméně toxické. Ačkoliv byl experiment prováděn metodou *in vitro*, výsledky jsou dobrým zdrojem informací o chování těchto derivátů v lidském organismu. Výsledky ukazují, že zkoumané látky nejsou, až na výjimky, v daných koncentracích cytotoxické, a naopak vykazují proliferativní účinky, které rostou se zvyšující se koncentrací. Projevují-li se cytotoxické účinky, děje se tak pouze v nejnižších koncentracích.

Ve dvou nejslabších koncentracích (10 μM a 1 μM) projevily lehce cytotoxické účinky pouze dva deriváty: 4-MC a 3-MOC. U látek PC, 4-TBC a 4-EG byla cytotoxicita zřejmá jen v koncentraci 1 μM a viabilita buněk se pohybovala okolo 90 %.

Zajímavý jev byl proliferativní účinek těchto derivátů. Největší vliv na růst buněk byl pozorován u látky 2-APh. V nejvyšší koncentraci 100 μM vzrostla proliferace až o 60 %, poté se snižovala s klesající koncentrací. Důvodem tohoto chování může být schopnost aminofenolových derivátů i v nejnižší koncentraci 1 μM specificky indukovat aktivaci dráhy ERα, a tím zvyšovat buněčnou proliferaci *(Wang et al., 2019)*. Ačkoliv byl tento jev v literatuře popsán při experimentech na thyroidních nádorových buňkách, mohl by vysvětlovat chování látky i v této nádorové linii. Další látky, které vykazovaly podobné vlastnosti, byly PC a 4-TBC. U těchto derivátů byl zřetelný rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší koncentrací. Ani u zbylých zkoušených látek nebylo prokázáno výrazné snížení viability buněk v žádné z testovaných koncentrací, dokonce byl v menší míře pozorován proliferativní účinek. V experimentu získané hodnoty korelují s již dostupnými daty, kde autoři popsali totožný účinek derivátů katecholu v koncentracích 100 μM, 10 μM a 1 μM *(Hrubša et al., 2022)*.

U látky 4-allyl-1,2-dimethoxybenzen (4-AL-DMB) byla prokázána genotoxicita a vliv na rozvoj nádorů, zejména jater, v *in vivo* studiích na myších a krysách *(Johnson et al., 2000)*. Důležité je zmínit, že k těmto hodnotám došli autoři při chronickém podávání vysoké látky po dobu dvou let. Hodnoty 4-AL-DMB v plasmě hlodavců se tak pohybovaly mezi 4 μM - 46 μM. Lidský organismus je běžně vystaven pouze nízkým dávkám, které jsou 100 až 1000 krát menší než v těle hlodavců v průběhu experimentu, a proto je toto riziko při běžné expozici irelevantní *(Smith at al., 2002)*. Na podkladě těchto výsledků by se dalo konstatovat, že zkoušené deriváty jsou bezpečné pro lidské buňky.

V následujícím kroku byla důkladně zkoumána schopnost těchto derivátů ovlivnit genovou expresi. Jako ER cílové geny byly zvoleny estrogen responsivní geny ESR1 kódující isoformu ERα a gen TFF1, jenž je indukován přímo interakcí s estrogenním receptorem *(Markićević et al., 2014)*. Tyto geny jsou pro tyto účely běžně používané v experimentální práci, a tudíž jsou vhodné k hodnocení na ERα.

Na základě získaných výsledků cytotoxicity byly pro studium genové exprese použity všechny látky v koncentraci 10 μM. Z důvodu pozitivní kontroly, byl ke všem experimentům přidán endogenní estrogen estradiol (E2) v koncentraci 10 nM, která byla zvolena proto, že se jedná o fyziologickou koncentraci hormonu v organismu *(Celojevic*

et al., 2011). Jednalo se o řádově nižší koncentraci, než byla použita u cytotoxicity, pomohla však dobře odlišit látky, které vykazovaly velmi nízkou genovou aktivaci.

Výraznou expresi genu ESR1 vyvolalo pouze 5 látek (2-Mo-4-MePh, 4-AL-DMB, o-Cr, PC a 4-TBC), přičemž aktivitu estradiolu několikanásobně převyšovaly deriváty 2-MO-4-MePh a PC. Tento projev poukazuje na schopnost daných látek silně ovlivňovat expresi přítomného genu. Ostatní deriváty vykazovaly nízkou nebo žádnou schopnost aktivace ESR1. Zajímavé je, že represivní aktivace se projevila u estradiolu, kde by se dal předpokládat opak. Tento jev se mohl zdát nečekaný, nicméně byl již popsán v literatuře. Ta uvádí, že jednou z možností takovéhoto chování může být represorový komplex proteinu SIN3A, který reaguje přímo s estrogenním receptorem, a díky tomu dochází k potlačení aktivace *(Ellison-Zelski et al., 2009)*. Platí tedy, že látky, které jsou silnými aktivátory ER mají represivní účinek na expresi ESR1. Látky, které podporují expresi tohoto genu by mohly účinkovat přes jiné dráhy – nelze je tudíž vyloučit jako potenciální aktivátory ER.

Dále byl zkoumán vliv katecholových derivátů na expresi genu TFF1. V tomto případě byla aktivita pozitivní kontroly estradiolu několikanásobně vyšší oproti genu ESR1, což lze očekávat, protože zde klasicky platí, že čím vyšší exprese, tím silnější účinnost. Všechny ostatní zkoušené látky, s výjimkou PC, však vykazovaly aktivaci nižší. Tato skutečnost poukazuje na přímou interakci zkoušených derivátů s receptorem. U 4-AC, o-Cr, 4-TBC byla aktivita snížená i oproti DMSO 0.1 %, tzn. relativní exprese byla nižší než jedna. Tyto látky pak působily na TFF1 tlumivě. Ostatní katecholy vliv na expresi genu nevykazovaly.

Ze získaných výsledků můžeme usoudit, že ačkoliv jednotlivé použité deriváty katecholů mají podobnou strukturu, je jejich chování a účinek rozdílný. Nejvyšší aktivitu vykazoval u obou genů derivát PC, jenž je svou strukturou obsahující dvě hydroxylové skupiny nejvíce podobný polyfenolům. U polyfenolů již bylo prokázáno, že inhibují proliferaci nádorových buněk, angiogenezi, vznik metastáz, zánět a indukují apoptózu. Mají také antioxidační vlastnosti a chrání buňky před volnými radikály *(Niedzwiecki et al., 2016)*. O protinádorové aktivitě samotných katecholých derivátů neposkytuje literatura mnoho informací. Nabízí se však jejich využití v syntéze složitějších sloučenin, např. komplexní sloučeniny obsahující 2-aminophenol, v podobě Schiffovy baze, jako ligand vázající měďnaté kationty. Tyto látky by byly potenciálně schopny nahradit v protinádorové

terapii komplexy platiny (cisplatina, oxaliplatina, karboplatina), jejichž užívání je spojeno s mnoha závažnými nežádoucími účinky *(Çeşme, 2023)*.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo testováno třináct derivátů katecholu. Na základě stanovení cytotoxicity bylo potvrzeno, že všechny zkoumané deriváty jsou pro buňky použité v našem experimentu bezpečné. Nejvyšší cytotoxicitu projevila látka 4-MC – viabilita buněk byla 88 %, a to v nejnižší testované koncentraci. Deriváty, namísto toxicky, působily mírným až vysokým proliferativním účinkem. Látka 2-APh ukázala nárůst viability až o 60 % oproti kontrolnímu vzorku DMSO 0.1 %, a bylo zjištěno, že tento účinek roste se zvyšující se koncentrací testovaných látek.

Při studiu genové exprese nejvyšší aktivaci u obou genů projevila látka PC, u genu ESR1 několikanásobně přesáhla aktivaci estradiolu a u genu TFF1 byla aktivace s estradiolem podobná. Deriváty byly testovány pouze v jedné buněčné linii. Pro získání dalších informací o jejich chování by bylo vhodné provést experiment i na jiné buněčné linii, např. MCF-7/182R-6, která je rezistentní na léčivou látku fulvestrant.

Katecholové deriváty mohou díky svým účinkům hrát, jak negativní, tak pozitivní roli v ovlivňování estrogenní signalizace v lidském organismu. Zároveň mohou být užitečné při prevenci a při vývoji nových léčiv v protinádorové terapii.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Al Rabadi LS, Cook MM, Kaempf AJ, Saraceni MM, Savin MA, Mitri ZI. Ado-trastuzumab for the treatment of metastatic HER2-positive breast cancer in patients previously treated with Pertuzumab. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1150. Published 2021 Oct 27. doi:10.1186/s12885-021-08894-2

Ali S, Rasool M, Chaoudhry H, et al. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation*. 2016;12(3):135-139. Published 2016 Jun 15. doi:10.6026/97320630012135

Aslantürk, Özlem Sultan. "In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages." Genotoxicity – A Predictable Risk to Our Actual World (2018): 1.

Burris TP, Busby SA, Griffin PR. Targeting orphan nuclear receptors for treatment of metabolic diseases and autoimmunity. *Chem Biol*. 2012;19(1):51-59. doi:10.1016/j.chembiol.2011.12.011

Carazo Fernández, Alejandro. Nukleární receptory – studium nových ligandů a význam genové variability. Hradec Králové, 2019. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie. Vedoucí práce Pávek, Petr.

Celojevic D, Petersen A, Karlsson JO, Behndig A, Zetterberg M. Effects of 17β-estradiol on proliferation, cell viability and intracellular redox status in native human lens epithelial cells. *Mol Vis*. 2011;17:1987-1996.

Çeşme, Mustafa 2-Aminophenol-based ligands and Cu(II) complexes: Synthesis, characterization, X-ray structure, thermal and electrochemical properties, and in vitro biological evaluation, ADMET study and molecular docking simulation, Journal of Molecular Structure, Volume 1271, 2023, 134073, ISSN 0022-2860, doi:10.1016/j.molstruc.2022.134073.

Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. 2013;19(3):197-209. doi:10.1016/j.molmed.2012.12.007

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. doi:10.1016/j.mam.2009.04.002

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):4949-4958. doi:10.1128/MCB.00383-09

Filardo EJ, Thomas P. Minireview: 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. doi:10.1210/en.2012-1061

Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2019;116:135-170. doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001

Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4. doi:10.1038/jid.2013.1

Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:52. Published 2003 Jul 9. doi:10.1186/1477-7827-1-52

Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(1):89-143. doi:10.1080/10408690390826464

Holliday, D.L., Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res 13, 215 (2011). https://doi.org/10.1186/bcr2889

Hrubša M, Alva R, Parvin MS, et al. Comparison of Antiplatelet Effects of Phenol Derivatives in Humans. *Biomolecules*. 2022;12(1):117. Published 2022 Jan 12. doi:10.3390/biom12010117

Choi WJ, Haratipour Z, Blind RD. Full-length nuclear receptor allosteric regulation [published online ahead of print, 2023 Jun 23]. *J Lipid Res*. 2023;100406. doi:10.1016/j.jlr.2023.100406

Ishii K, Morii N, Yamashiro H. Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy. *Core Evid*. 2019;14:51-70. Published 2019 Oct 31. doi:10.2147/CE.S217848

Jeng MH, Shupnik MA, Bender TP, et al. Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology*. 1998;139(10):4164-4174. doi:10.1210/endo.139.10.6229

Jensen EV, Desombre ER, Kawashima T, Suzuki T, Kyser K, Jungblut PW. Estrogen-binding substances of target tissues. Science. 1967, 158(3800), 529–530

Johnson JD, Ryan MJ, Toft JD II, et al. Two-year toxicity and carcinogenicity study of methyleugenol in F344/N rats and B6C3F(1) mice. J Agric Food Chem. 2000;48(8):3620-3632. doi:10.1021/jf000364a

Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, *2*(1), 81-97.

Kujanová H., Sýkora V., Pitter P. Látky s estrogenním účinkem ve vodách, Chem. Listy 101, 2007, 706−712.

Li MJ, Yin YC, Wang J, Jiang YF. Green tea compounds in breast cancer prevention and treatment. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):520-528.

Liang J, Shang Y. Estrogen and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:225-240. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183708

Lin Wang, Ling Zhao, Xiaomeng Jia, Lina Jiang, Yeqiong Song, Qinong Ye, Zhaohui Lyu, Aminophenols increase proliferation of thyroid tumor cells by inducing the transcription factor activity of estrogen receptor α, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 109, 2019, Pages 621-628, ISSN 0753-3322, https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.168.

Lu, J., Wu, T., Zhang, B. *et al.* Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Commun. Signal*, 60 (2021). https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y

Markićević M, Džodić R, Buta M, et al. Trefoil factor 1 in early breast carcinoma: a potential indicator of clinical outcome during the first 3 years of follow-up. *Int J Med Sci*. 2014;11(7):663-673. Published 2014 May 1. doi:10.7150/ijms.8194

Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(24):7895-7903. doi:10.1093/nar/10.24.7895

Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer*. 2005;6(3):240-246. doi:10.3816/CBC.2005.n.026

Mokbel K, Mokbel K. Chemoprevention of Breast Cancer With Vitamins and Micronutrients: A Concise Review. *In Vivo*. 2019;33(4):983-997. doi:10.21873/invivo.11568

Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients*. 2016; 8(9):552. https://doi.org/10.3390/nu8090552

Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. New England Journal of Medicine, 1998, 339.22: 1609-1618.

Prossnitz ER, Barton M. The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease: an update. *Nat Rev Endocrinol*. 2023;19(7):407-424. doi:10.1038/s41574-023-00822-7

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National

Rogers JM, Kavlock RJ (2008) Chapter 10. Developmental Toxicology. In: Klaassen, C.D., ed., *Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons*, 7th Ed., New York, McGraw-Hill Medical Publishing Division, p.418.

Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, Fishman J. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1984;259(8):4840-4845.

Schrager S, Potter BE. Diethylstilbestrol exposure. *Am Fam Physician*. 2004;69(10):2395-2400.

Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J Androl*. 2016;18(3):435-440. doi:10.4103/1008-682X.173932

Silver N, Cotroneo E, Proctor G, Osailan S, Paterson KL, Carpenter GH. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC Mol Biol*. 2008;9:64. Published 2008 Jul 17. doi:10.1186/1471-2199-9-64

Smith RL, Adams TB, Doull J, et al. Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances - methyl eugenol and estragole. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(7):851-870. doi:10.1016/s0278-6915(02)00012-1

Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*. 2005;227(2):115-124. doi:10.1016/j.canlet.2004.10.007

Tung NM, Garber JE. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. Br J Cancer. 2018; 119(2):141-152.

Vonka P, Hrstka R (2019): Overview of current findings about the role of oestrogen receptor α in cancer cell signalling pathways. Klin. Onkol., 32(Suppl 3):34-38. DOI: 10.14735/amko20193S. PMID: 31627704

Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(3):329-342. Published 2014 Oct 15. doi:10.11613/BM.2014.035

Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. Endocr Relat Cancer. 2010; 17(4):R245-62.

Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2016;16(1):4-20. Published 2016 Dec 5. doi:10.1002/rmb2.12006

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.

webové 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/