

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**Hodnocení vlivu triterpenů na buněčný cyklus lidské
nádorové linie CCRF-CEM**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Miloslav Macháček**

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D**

Hradec Králové, 2016

Renata Buriánová

Prohlášení

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

Hradec Králové, 22. 8. 2016

.....

Renata Buriánová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Miloslavovi Macháčkovi z Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a Mgr. Ivovi Frydrychovi, Ph.D z Ústavu molekulární a translační medicíny UP Olomouc za odborné vedení při psaní této bakalářské práce.

Také bych ráda poděkovala Mgr. Janě Kotulové, Ing. Soni Gurské, Ph.D a doc. RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D za věnovaný čas, přátelský přístup a cenné rady. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině za trpělivost a podporu během celého studia.

Abstrakt

Jméno a příjmení	Renata Buriánová
Název práce	Hodnocení vlivu triterpenů na buněčný cyklus lidské nádorové linie CCRF-CEM
Abstrakt	<p>Cíl práce: Cílem této práce bylo identifikovat možné mechanismy působení nových derivátů triterpenů odvozených od kyseliny betulínové u nádorové linie CCRF-CEM.</p> <p>Metody: K analýze účinků derivátů triterpenů byly použity metody průtokové cytometrie: detekce změn ve fázích buněčného cyklu pomocí propidium jodidu, analýza syntézy DNA (značení BrdU), syntézy RNA (značení BrU) a fosforylace histonu H3 (pH3^{Ser10}).</p> <p>Výsledky: Analýza buněčného cyklu ukázala změny v jednotlivých fázích vyvolaných studovanými deriváty. Mezi nejzajímavější patří deriváty LEM2719 a LEM2720, které mají nejvýraznější cytotoxický efekt na nádorové buňky, jenž se prokázal ve změnách v buněčném cyklu, hlavně v S a G2/M fázi. Po ovlivnění deriváty došlo ke snížení syntézy RNA a DNA, ke zvýšení fosforylace histonu H3 a k nárůstu populace v subG1 fázi spojené s apoptotickými pochody.</p> <p>Závěr: Studované látky vykazují různé mechanismy účinku. Získané výsledky poukázaly na možné mechanismy účinků jednotlivých derivátů působících změny jak v buněčném cyklu, tak na úrovni syntézy nukleových kyselin a buněčné smrti.</p>
Klíčová slova	Deriváty kyseliny betulínové, triterpeny, nádorové onemocnění, průtoková cytometrie, buněčný cyklus, apoptóza, syntéza DNA, syntéza RNA, CCRF-CEM

Abstract

Author	Renata Buriánová
Title of thesis	Evaluation of effect of triterpenes on cell cycle in CCRF-CEM human tumor cell line.
Abstract	<p>Aim of this study: The Aim of this thesis was to identify possible mechanisms of the effects of new triterpenes derivatives of betulinic acid on cancer cell line CCRF-CEM.</p> <p>Methods: For analysis of the effects of triterpene derivatives the flow cytometry methods were used: detection of changes in cell cycle by propidium iodide staining, analysis of DNA (BrdU staining) and RNA (BrU staining) synthesis a detection of phosphorylation of histon H3 (pH3^{Ser10}).</p> <p>Results: The analysis of cell cycle revealed changes in the cell cycle phases induced by studied derivatives. The most interesting derivatives were compounds LEM2719 and LEM2720 that had the most significant cytotoxic effect on cancer cell lines displayed as changes in cell cycle regulation, particularly S and G2/M phase. Decrease of RNA and DNA synthesis, increase of phosphorylation of histon H3 and increase of subG1 population linked with the apoptotic changes were also observed after the treatment.</p> <p>Conclusions: The studied compounds displayed various possible mechanisms of action. Obtained results proposed mechanisms of action in the dependence of derivatives used, including cell cycle changes, changes in nucleic acid synthesis and cell death.</p>
Key words	Betulinic acid derivatives, triterpenes, cancer, flow cytometry, cell cycle, apoptosis, DNA synthesis, RNA synthesis, CCRF-CEM

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah	6
Seznam použitých zkratek	7
1. Cíle práce	9
2. Teoretický úvod	10
2.1 Buněčný cyklus	10
2.2 Apoptóza	15
2.3 Triterpeny	17
3. Experimentální část	20
3.1 Materiál	20
3.2 Metody	24
4. Výsledky	29
4.1 Cytotoxický test MTS	29
4.2 Analýza buněčného cyklu a apoptózy	29
4.3 Analýza syntézy DNA.....	33
4.4 Analýza syntézy RNA.....	35
4.5 Detekce fosforylace histonu H3	37
5. Diskuze	39
6. Závěry	42
7. Seznam použité literatury	43
Seznam tabulek a obrázků	49

Seznam použitých zkratek

AIF	apoptózu indukující faktor
ATP	adenosin trifosfát
betA	betulinová kyselina
Bid, tBid	BH3 interacting-domain (proapoptotický protein)
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BrU	5-bromouridin
BSA	bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
CARD	caspase recruitment domain (strukturní motiv dlouhé prodomény kaspázy)
CD95	cluster of differentiation 95 (povrchový receptor)
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (inhibitor CDK1A)
c-FLIP	cellular FLICE-inhibitory protein (protein zapojený do signální dráhy apoptózy)
CIP1	CDK-interacting protein 1 (třída inhibitorů CDK)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FADD	Fas-associated protein with death domain (adaptorový protein)
FAS	apoptosis-stimulating fragment (povrchový receptor, taktéž CD95)
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluorescein izothiokyanát
IC₅₀	střední inhibiční koncentrace
INK4	inhibitor cyklin dependentní kinázy 4
LEM	laboratoř experimentální medicíny
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium
NP-40	nonidet P-40 (detergent)
p53	protein/produkt 53 (transkripční faktor, produkt genu TP53)
PBS	izotonický fosfátový pufr
PBS-T	izotonický fosfátový pufr s přísávkem Tween-100
PES	fenazin etylsulfát

PI	propidium jodid
PMS	fenazin metylsulfát
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza A	ribonukleáza A
SD	směrodatná odchylka
TNF	tumor nekrotizující faktor
TNFR1	receptor TNF 1
TP53	tumor protein 53 (transkripční faktor)
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
WIF1	Wnt inhibitory factor 1 (třída inhibitorů CDK)

1. Cíle práce

- vypracovat literární rešerši týkající se triterpenů a jejich protinádorových účinků, s ohledem zejména na buněčný cyklus a apoptózu
- pomocí průtokové cytometrie identifikovat možné mechanismy protinádorového působení nových derivátů triterpenů *in vitro* na nádorové buněčné linii CCRF-CEM

2. Teoretický úvod

Po dobu celé své existence se lidstvo potýká s mnoho nemocemi a od samého počátku se s nimi snaží vést často nerovný boj. I v dnešní době, kdy hluboká znalost základních oborů medicíny umožňuje mnohé zdravotní problémy řešit, existují nemoci, u kterých není zatím možné boj vyhrát. Jednou z těchto skupin nemocí jsou nádorová onemocnění. Existuje mnoho skupin protinádorových chemoterapeutik a jednou z nejvýznamnějších je právě skupina přírodních sloučenin – isoprenoidů, triterpenů.

Triterpeny jsou známé svými protizánětlivými, analgetickými, anti-mikrobiálními, antimykotickými, virostatickými, imunomodulačními a v neposlední řadě cytostatickými účinky. V popředí zájmu stojí zejména kyselina betulinová (betA), která se vyskytuje volně v přírodě a má silné protizánětlivé, virostatické a protinádorové vlastnosti. Problémem využití betA v medicíně je špatná rozpustnost. Za účelem vyšší biologické dostupnosti se výzkumné skupiny snaží o syntézu takových derivátů betA, které by měly požadované vlastnosti a zároveň lepší farmakokinetické účinky a terapeutický index. Tyto deriváty jsou pak zkoumány z hlediska cytostatických a cytotoxických účinků u nádorových buněk, kdy zejména cílí na regulaci buněčného cyklu a indukci apoptotických změn.

2.1 Buněčný cyklus

Základní funkcí buněčného cyklu je vytvoření dvou geneticky identických dceřiných buněk, a to zdvojením DNA obsažené v chromosomech. Tento proces má dvě hlavní části S a M fázi (obr. 1).

Během S fáze (syntetická fáze), jenž trvá obvykle 10-12 hodin dochází k replikaci DNA. V této fázi dochází k syntéze histonů, jež jsou nutné pro zdvojnásobení počtu nukleosomů v chromosomech buňky a pro syntézu RNA molekul. Po ukončení S fáze se chromosomy oddělí a buňka vstupuje do M fáze (mitotická fáze), která je znatelně kratší. M fáze se skládá z mitózy, kdy dochází k duplikaci rodičovských chromosomů za vzniku shodných sesterských chromatid s následným rozdělením do dvou jader, a cytokinezi, v níž dochází k rozdělení buňky za vzniku dceřiných buněk (Alberts *et al*, 2008).

Po skončení mitózy vstupuje buňka do G1 fáze, v jejímž průběhu dochází k tvorbě DNA polymerázy, RNA a dalších bílkovin, jako je tubulinu. Interfázní chromosom se v průběhu G1 fáze skládá pouze z jedné chromatidy a je tvořen jednou dvouvláknovou DNA molekulou. V S fázi se tedy chromosomy stávají dvouchromatidovými a zdvojnásobuje se množství jaderné DNA. Ve fázi G2 jsou chromosomy tvořeny dvěma chromatidami se zdvojnásobeným obsahem jaderné DNA. Typická pro tuto fázi je zvýšená metabolická aktivita a růst buňky. Dochází také k postreplikačním úpravám a interakci molekul DNA s histony. Na konci fáze G2 dochází ke kondenzaci chromatinových vláken (Obaya *et Sedivy*, 2002).

Pokud jsou však extracelulární podmínky nepříznivé, mohou buňky odložit postup přes kontrolní body, jež jsou regulující mechanismy buněčného cyklu sledující, zda daný krok cyklu proběhl ve správném pořadí a pouze jednou. Buňky mohou například vstoupit do speciálního klidového stavu nazývaného G0 fáze. Ve fázi G0 může buňka zůstat před opětovným obnovením proliferace různě dlouho dobu – hodiny, dny, dokonce týdny i roky. Některé vlastnosti buněčného cyklu, včetně doby požadované k ukončení určité fáze, se značně liší u různých typů buněk i v rámci stejného organismu. Základní organizace buněčného cyklu a jeho kontrolního systému je však v zásadě stejná ve všech eukaryotních buňkách (Alberts *et al*, 2008).

2.1.1 Kontrolní mechanismy buněčného cyklu

Regulace buněčného cyklu je zodpovědná především za signály k proliferaci či diferenciaci buněk a k synchronizaci vnitřních dějů, jako je replikace DNA, mitóza nebo cytokineze. Jako nejvýznamnější regulátory buněčného cyklu jsou označovány cyklin-dependentní kinázy (CDK) a jejich proteinové substráty – cykliny, tumor supresorové geny a protoonkogeny.

2.1.1.1 Cykliny a cyklin-dependentní kinázy

CDK patří do skupiny serin-treonin proteinových kináz a jsou důležité při regulaci buněčného dělení. Jednotlivé CDK fosforylují různé substráty ve specifických fázích buněčného cyklu za použití ATP (adenosin trifosfát) jakožto donoru fosfátové

skupiny (Alberts *et al.*, 2008). Koncentrace cyklinů, jak již název napovídá, v průběhu každého buněčného cyklu charakteristicky osciluje – tj. dochází k jejich střídavé syntéze a degradaci v závislosti na fázi buněčného cyklu. Je-li koncentrace cyklinů nízká, dochází k deaktivaci CDK. Naopak, při rostoucí koncentraci cyklinů se CDK aktivuje a buňka vstupuje do dalších fází buněčného cyklu (Karp, 2013).

Tab. 1: CDK a cykliny – nomenklatura a jejich funkce v buněčném cyklu savců (podle Lodish, 2013).

CDK	Cyklin	Funkce	Název
CDK1	Cyklin A, Cyklin B	M fáze	Mitotické CDK
CDK2	Cyklin A, Cyklin E	Vstup do buněčného cyklu S fáze	CDK G1/S fáze CDK S fáze
CDK4	Cyklin D	G1 fáze Vstup do buněčného cyklu	CDK G1 fáze
CKD6	Cyklin D	G1 fáze Vstup do buněčného cyklu	CDK G1 fáze

Jsou známy čtyři třídy cyklinů zapojených do regulace buněčného cyklu. Tyto třídy jsou dále členěny podle funkce a fáze buněčného cyklu, ve které se váží na CDK.

G1/S-cyklin se zapojuje na konci G1-fáze, ve které aktivuje CDK, čímž umožňuje vstup buňky do buněčného cyklu. V průběhu S fáze klesá koncentrace G1 cyklinů, naopak roste hladina S-cyklinů, které ve vazbě na příslušné CDK indukují replikaci chromosomů. Zvýšená hladina S-cyklinů je přítomna i během M fáze, kdy se tyto cykliny uplatňují zejména v časných událostech. Vstup buňky do mitózy stimuluje M-cykliny v kontrolním bodě G2/M vazbou na příslušné CDK (Alberts *et al.*, 2008, Hochegger *et al.*, 2008). Přehled párů CDK/cyklin je uveden v Tab. 1.

2.1.1.2 Tumor supresorové geny

Mezi regulátory buněčného cyklu jsou řazeny tumor supresorové geny, respektive jejich proteinové produkty, jež se uplatňují zejména při inhibici růstu a proliferace buněk a mají zásadní úlohu v maligním procesu. Typickým zástupcem je gen Rb1 (retinoblastoma), jenž je lokalizován na dlouhém raménku třináctého chromosomu 13q14 (Giacinti *et Giordano*, 2006). Tento gen se vyznačuje u převážné

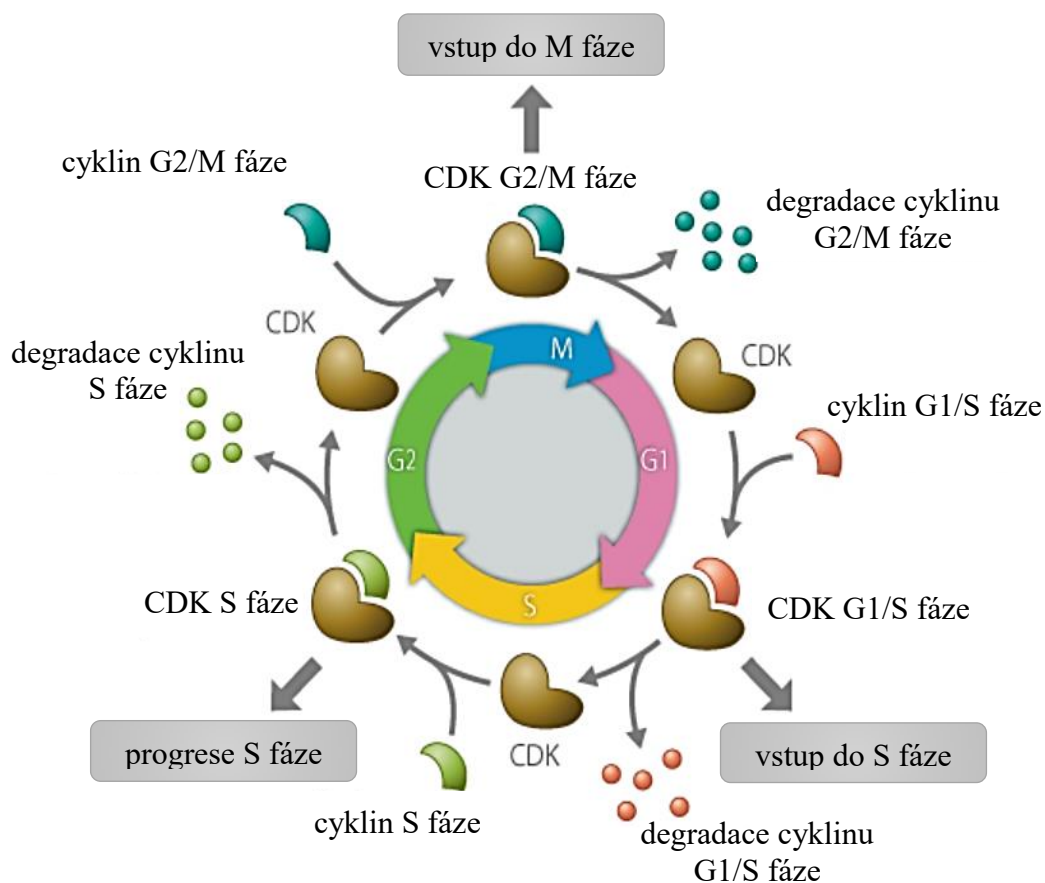
většiny somatických buněk. Jeho produktem je jaderný transkripční faktor Rb protein (pRb). pRb je aktivní pouze v případě, je-li fosforylován málo nebo vůbec. pRb hraje klíčovou roli při regulaci buněčného dělení, indukci apoptózy či během diferenciaci. Hlavní úlohou aktivního pRb je především inhibice transkripčních faktorů z rodiny E2F. Dále je prostřednictvím pRb regulován také například restriční bod na konci G1 fáze u živočišných buněk, jenž je zodpovědný za kontrolu přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu (Otová *et Mihalová*, 2012).

Transkripční faktory rodiny E2F hrají zásadní roli v kontrole buněčného cyklu. E2F proteiny regulují aktivitu genů buněčného cyklu, syntézy DNA a apoptózy. Komplex pRb-E2F potlačuje transkripci genů nezbytných pro produkci cyklinů E a D, jež hrají roli v průchodu kontrolním bodem G1/S. Tím dochází k zástavě buněčného cyklu. Hyperfosforylace pRb vede k inaktivaci pRb a jeho uvolnění z vazby s proteiny (například zmíněné E2F). Transkripční faktory Rb jsou v somatických buňkách neustále přítomny, dochází pouze k regulaci aktivity pomocí fosforylace a defosforylace v průběhu cyklu. Neaktivní fosforylovaná forma pRb je přítomna v průběhu fází S, G2 a M (Viatour *et al.*, 2011; Otová *et al.*, 2012).

Dalším genem spadajícím mezi nádorové supresorové geny je TP53 (Tumor protein 53) lokalizovaný na krátkém raménku sedmnáctého chromosomu (17p13, Petitjean *et al.*, 2007). Produkt TP53 se podílí na vlastní regulaci průchodu buňky buněčným cyklem. Tím produktem je transkripční faktor p53, jenž je vazbou na další geny schopen indukovat apoptózu, zastavit buněčný cyklus či spustit opravy poškození DNA. Například buňky při poškození DNA vzniklé působením ultrafialovým zářením zvyšují produkci proteinu p53. Mezi geny, které ve spolupráci s p53 regulují buněčný cyklus, patří inhibitory CDK CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), INK4 (Inhibitor cyclin dependentní kinázy 4) a CIP1-WIF1 (CDK-interacting protein 1-Wnt inhibitory factor 1; Bertheau *et al.*, 2008, Petitjean, 2007).

2.1.1.3 Protoonkogeny

Protoonkogeny představují další skupinu genů, které významným způsobem ovlivňují proces nádorové transformace buněk. Protoonkogeny kódují transkripční faktory či další regulátory zodpovědné za průchod buněčného cyklu a také se podílí na regulaci buněčného dělení. V případě protoonkogenů dochází k aktivaci pozitivní zpětné vazby, jenž je protipólem mechanismu účinku tumor supresorových genů. Dojde-li k mutaci či delecii v oblasti kódující protein či blízko regulační oblasti, amplifikaci genu nebo ke chromosomové translokaci, mohou se z protoonkogenů stát takzvané onkogeny (Pecorino, 2012). Tyto mutace mohou vést například k trvalé aktivaci onkogenu, jenž vede ke zvýšené expresi genu a to může mít za následek abnormální nárůst exprese strukturně nezměněného proteinu, expresi normální hladiny abnormálního genu, popřípadě k expresi hyperaktivního fúzního proteinu, což v konečném důsledku může vést k nekontrolovanému bujení nádorové masy. Onkogeny jsou tedy geny obsažené v genomech rakovinných buněk, které přispívají k produkci maligních vlastností buněk (Pecorino, 2012).

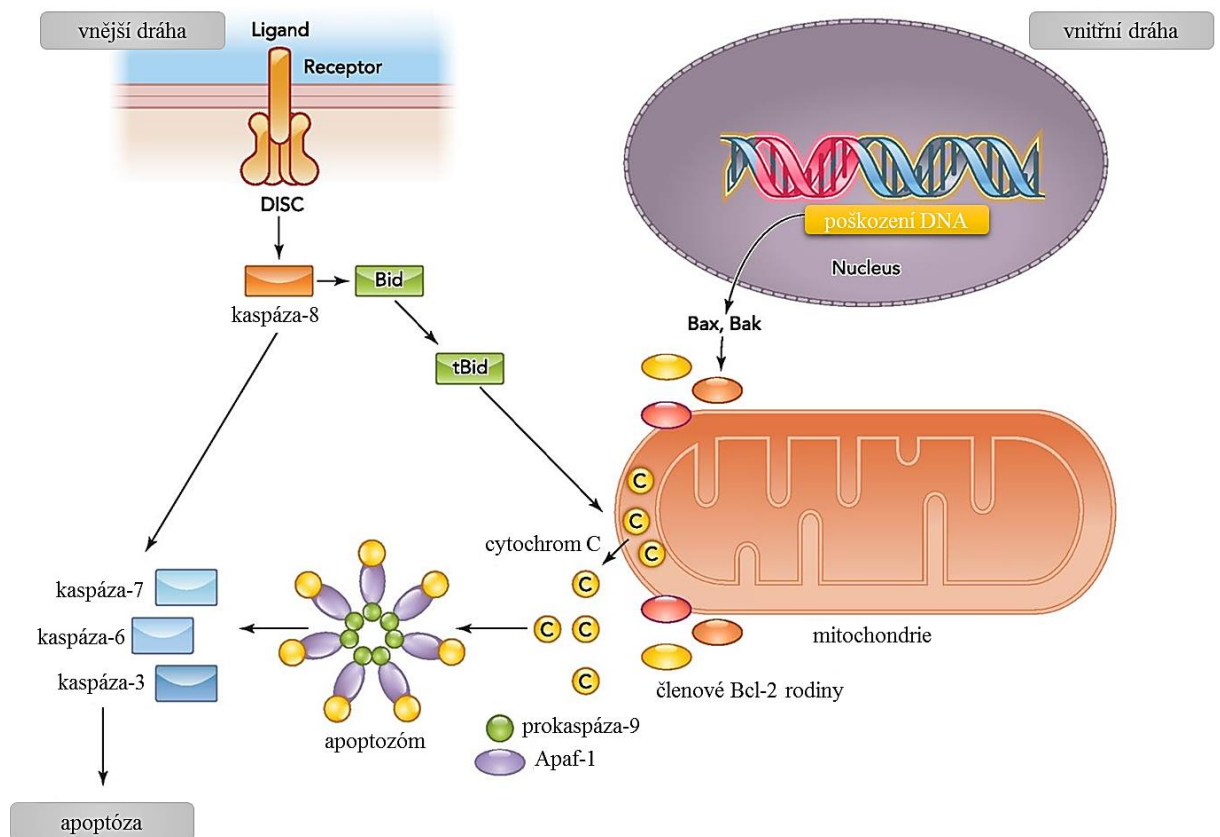


Obr. 1: Schéma buněčného cyklu. Jednotlivé fáze buněčného cyklu...popis (převzato z http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/13_02.html).

2.2 Apoptóza

Apoptóza představuje základní typ programované buněčné smrti (dříve uváděná jako buněčná smrt typu I), jenž je klíčový pro správný vývoj organismu (Vaux *et Korsmeyer*, 1999). Naproti tomu stojí z (klasického pohledu) neregulovatelný, náhodný proces – nekróza (typ III), která vede k odumření buňky vlivem infekce, fyzikálního poškození a jiných stavů neslučitelných s životem buňky. Dnes však víme, že i nekróza může být regulována (Galluzzi *et al.*, 2012). Při smrti buňky apoptózou dochází k typickým morfologickým změnám (cytoplazmatické smrštění, externalizace fosfatidylserinu, kondenzace chromatinu a smršťování jádra a později i celé buňky a její kontrolovaný rozpad na apoptotická tělíška). Existují dvě základní apoptotické dráhy – dráha vnější (receptorová) a vnitřní (mitochondriální) rozdělené podle způsobu aktivace (obr. 2).

Klíčovou úlohu v regulaci apoptózy mají cysteinové proteázy nazývané kaspázy. Kaspázy jsou exprimované jako neaktivní proenzymy a mohou být dále členěny na iniciační kaspázy (kaspázy-2, -8, -9 a -10) a efektorové kaspázy (kaspázy-3, -6 a -7). Iniciační kaspázy (-2, -4, -9) obsahují CARD doménu (caspase recruitment domain), jenž umožňuje interakci s adaptorovými molekulami. Toto umožňuje agregaci a samoaktivaci iniciačních kaspáz, čímž se liší od výkonných (exekučních) kaspáz, které obsahují krátkou prodoménu (Wang *et al.*, 2000, Green *et al.*, 2011).



Obr. 2: Schématické znázornění vnitřní a vnější dráhy apoptózy (upraveno podle Sandoel *et al.*, 2014).

2.2.1 Vnější dráha apoptózy

Vnější dráha apoptózy je aktivována navázáním ligandů na povrchové receptory, tzv. receptory smrti (Slabý, 2015). Mezi receptory smrti patří receptory z rodiny TNF (tumor necrosis factor), Fas (apoptosis-stimulating fragment) jakožto CD95 (cluster of differentiation 95), TRAIL-R1 a R2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand

receptor). Vazbou ligandu smrti na příslušný receptor dochází ke zformování komplexu DISC (death-inducing signaling complex) skládajícího se z FADD adaptorové domény (FAS-associated death domain), prokaspázy-8/prokaspázy-10 a proteinu c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein). Toto vede k aktivaci kaspázy-8, která štěpí a aktivuje kaspázu-3 a iniciuje apoptózu (Varfolomeev *et al.*, 1996).

2.2.2 Vnitřní dráha apoptózy

U buněk, které mají nižší hladinu kaspázy-8, musí být signál zesílen a veden vnitřní drahou (Esposti, 2002). V tomto případě kaspáza-8 štěpí proapoptotický protein Bid na tBid (BH3 interacting-domain), což vede k aktivaci vnitřní dráhy. Vnitřní dráha je spojena se změnami na mitochondriích a je aktivována i intracelulárně, například poškozením DNA nebo oxidačním stresem. Mitochondrie jsou nepostradatelné orgány pro život buňky, účastní se tvorby energie ve formě ATP. V případě aktivace vnitřní dráhy apoptózy dochází ke změnám na mitochondriálních membránách, což v konečném důsledku vede k depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány a inhibici respirace, produkce reaktivních radikálů kyslíku, ztrátě produkce ATP a uvolnění proapoptotických molekul (Crompton, 1999). Mezi uvolněnými molekulami je i cytochrom c, který se v cytosolu váže na Apaf-1 a spolu s prokaspázou-9 tvoří apoptosom, který posléze štěpí exekuční prokaspázy 3 a 7 na aktivní kaspázy a spouští apoptotickou kaskádu (Liu *et al.*, 1996).

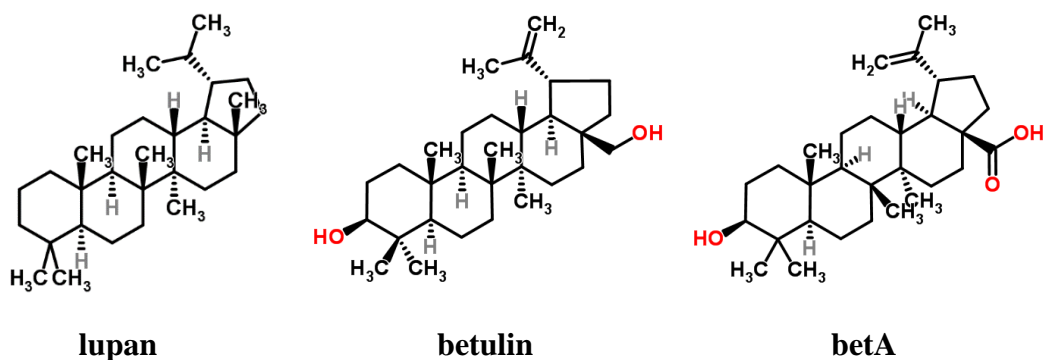
2.3 Triterpeny

Triterpeny tvoří rozsáhlou podskupinu terpenoidů. Terpenoidy představují skupinu látek, které jsou velmi rozšířeny v přírodě. Tyto sloučeniny, jež se vyskytují převážně v rostlinách, jsou podstatnou součástí vonných silic; jako těkavé vonné látky v listech, plodech, květech, oddencích a kořenech. Nachází se také v mikroorganizmech, plísních, houbách, řasách a některých mořských živočiších (Butterworth, 1968). Terpenoidy se vyznačují řadou jedinečných a biologicky významných účinků. Již v prvních herbářích lze najít zmínky o používání rostlin s vysokým obsahem saponinů, či triterpenů, jež se běžně vyskytují v rostlinách nebo v ovoci (například smetánka lékařská, hruška, jablko nebo brusinka).

2.3.1 Obecná charakteristika triterpenů

Některé biologické účinky triterpenů byly odvozeny z lidové zkušenosti a fytotherapeutické praxe (Šarek, 2003). Mezi nejvýznamnější triterpenoidní struktury z biologického hlediska patří oleananová (oleanolová kyselina, boswellová kyselina), ursanová (ursolová kyselina, β -amyrin), lupanová (lupeol, betulin, betulinová kyselina (BetA) a dammaran-eufanové triterpenoidy (obr. 3, Salvador, 2010). Každým rokem jsou identifikovány nové triterpeny (Hill *et Connolly*, 2015).

Největší zájem je o triterpeny v souvislosti s jejich účinky protizánětlivými, analgetickými, antimikrobiálními, virostatickými, hypoglykemickými, hepatoprotektivními, antimykotickými, imunomodulačními a v neposlední řadě i tonizujícími (Hajdúch *et al.*, 2004). Významnou úlohu mají i při prevenci a léčbě hepatitidy, parazitárních a některých dalších infekcí. V stále větším zájmu jsou mimo jiné i jejich cytostatické účinky (Laszczyk, 2009). Jedním z prvních triterpenů s protinádorovými účinky byla popsána právě betA (Pisha *et al.*, 1995), jenž společně s kyselinou platanovou, betulinem a lupeolem tvoří část vrstev březové kůry platanů (Šarek *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu, že se předkládaná práce věnuje vlivu vybraných triterpenů odvozených od kyseliny betulinové, bude největší pozornost věnována právě jí.



Obr. 3: **Strukturní skelet lupanu, betulinu a betA**, převzato z <http://www.chemspider.com/>. Struktura uvedených pentacyklických triterpenů je tvořena izoprenovými jednotkami.

2.3.2 Význam a mechanismy účinků BetA a jejích derivátů

Přírozně se vyskytující triterpen betA vykazuje protizánětlivé (Recio *et al.*, 1995), protivirové (De Clercq, 1995) a protinádorové účinky (Pisha *et al.*, 1995, Fulda *et al.*, 1999). Výzkumná skupina Pisha *et al.* (1995) jako první popsala cytotoxické účinky betA u lidského melanomu *in vitro* i *in vivo*. Z výzkumů dále vyplývá, že protinádorová aktivita betA a jejích derivátů je známá vysokou aktivitou u mnoha dalších nádorových linií, například buněčná linie neuroblastomu, ovariálního, plicního karcinomu i karcinomu děložního čípku (shrnuto v Santos *et al.*, 2011). Tyto účinky se při srovnatelné koncentraci látky jeví selektivně toxické pro nádorové buňky (Zuco *et al.*, 2002, Kommera *et al.*, 2011). Fakt, že zdravé buňky zůstávají nepoškozeny, zvyšuje terapeutický potenciál betA a jejích derivátů (Šarek *et al.*, 2003).

K hlavním prokázaným protinádorovým mechanismům účinků betA a jejích derivátů patří zejména regulace buněčného cyklu a indukce apoptózy nezávislá na p53 (Wick *et al.*, 1999). Spolu s dalšími vědeckými skupinami prokázal Santos *et al.* (2011) inhibici růstu nádorových buněk po ovlivnění betA a odvozených derivátů; konkrétně například *in vitro* u HepG2 buněk (karcinom jater) nebo HeLa buněk (karcinom děložního čípku) dochází k zástavě buněčného cyklu v S fázi po působení derivátů betA, která je doprovázena apoptózou.

V rámci apoptotických změn dochází ke zvýšení exprese proteinů Bcl-2, Bcl-xL, k aktivaci kaspáz a změn v membránovém potenciálu mitochondrií (Fulda *et al.*, 1998). Tím dojde k uvolnění faktoru AIF (apoptosis inducing factor) indikujícího apoptózu a cytochromu c s následnou aktivací kaspáz 3 a 8, kdy dochází ke štěpení substrátů a nukleární fragmentaci (Fulda *et al.*, 1998, Kommera *et al.*, 2011). Mezi další popsané mechanismy patří indukce autofagie (Xu *et al.*, 2007) a regulace DNA polymeráz či topoizomeráz (Chowdhury *et al.*, 2002, Mizushina *et al.*, 2003).

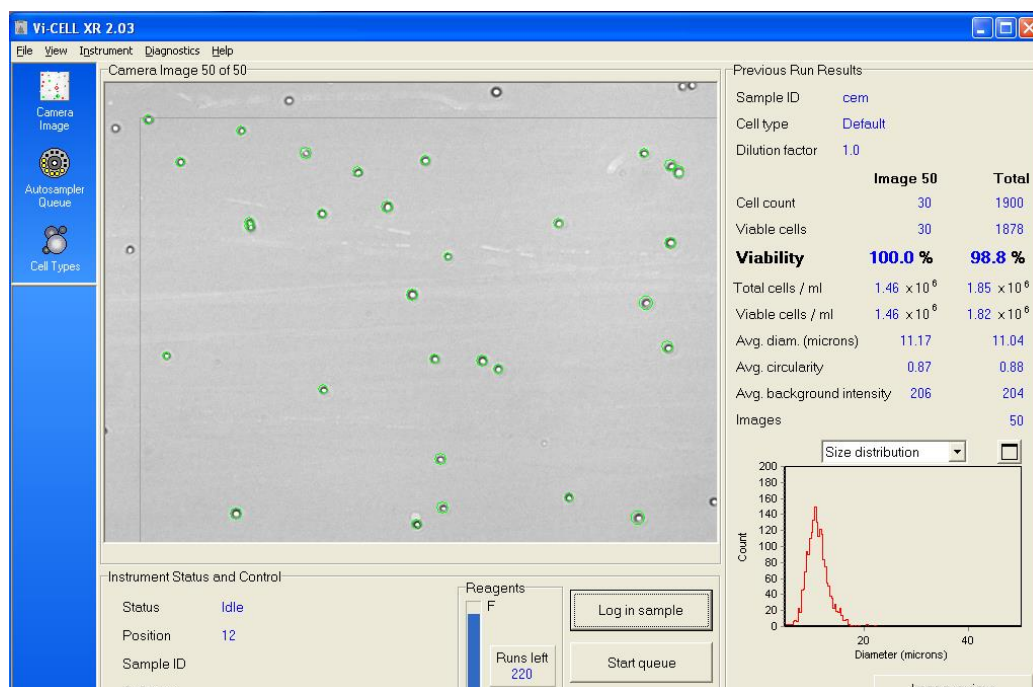
Přímá aktivace apoptotických změn na mitochondriích a změny v buněčném cyklu výlučně u nádorových buněk zvyšují klinický význam derivátů betA (Fulda *et al.*, 2009). Nevýhodou pro využití betA v klinické praxi však zůstává její špatná rozpustnost, a tedy biologická dostupnost. Z tohoto důvodu se výzkumné skupiny snaží o modifikace derivátů betA, jež by zlepšily jejich farmakokinetické účinky a terapeutický index (Borková *et al.*, 2016).

3. Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Buněčná linie CCRF-CEM

Pro studium vlivu triterpenů byla použita lidská nádorová linie CCRF-CEM (American Type Culture Collection, ATCC), která je odvozená od lymfoblastické leukémie. Buněčná linie CCRF-CEM byla kultivována v médiu RPMI 1640 (RNBF1543, Sigma-Aldrich, USA) s přidavkem antibiotik penicilinu-streptomycinu (10 mg/ml, 115M4795V, Sigma-Aldrich, USA) a 10 % fetálního bovinního séra (FBS, P110704, PAN-Biotech, Německo). Buňky byly kultivovány v plastových kultivačních lahvích T75 (TPP Trasadigen, Švýcarsko) v inkubátoru při teplotě 37°C, 95% vlhkosti a 5% CO₂ atmosféře. K dosažení vysoké životnosti byly pasážovány třikrát týdně. Nejprve byla vyloučena kontaminace pod inverzním světelným mikroskopem (Olympus IX51). Buňky byly poté centrifugovány při 500 g, 5 minut s následnou výměnou média. Viabilita a počet buněk byl stanoven pomocí přístroje Vi-Cell XR (Beckman Coulter). Pro další kultivaci se buňky uchovávaly v kultivačních lahvích v koncentraci $3,3 \times 10^4$ buněk/ml, pro experimenty byly použity buňky v 17. až 24. pasáži a viabilitě 97,7 – 98,8 % (obr. 4).



Obr. 4: Ukázka stanovení počtu buněk a viability pomocí přístroje Vi-Cell.

Výchozí látkou pro syntézu testovaných derivátů byla betA. Pro účely bakalářské práce byly vybrány deriváty z Tab. 2. Struktury látek jsou chráněny, a proto jsou látky označeny LEM kódy (Laboratoř experimentální medicíny).

Tab. 2: Seznam derivátů betA vybraných pro pilotní experimenty.

Kódové označení LEM
2717
2718
2719
2720
2721
2722
2723
2724
2725

3.1.3 Chemikálie

5-bromo-2'-deoxyuridin, BrdU (125H0932, Sigma-Aldrich, USA)

5-bromouridin, BrU (850187, Sigma-Aldrich, USA)

bovinní sérový albumin (BSA, A 7906, Sigma-Aldrich, USA)

citrát trisodný dihydrát (S4641, Sigma-Aldrich, USA)

etanol bezvodý p.a. (605458, Dr Kulich Pharma s.r.o., ČR)

formaldehyd 35% (20120625, Dr Kulich Pharma s.r.o., ČR)

glycin (14864, Serva, Německo)

HCl (A150273/01, Lachema, ČR)

KCl (APO-30076, Sigma-Aldrich, USA)

KH₂PO₄ (APO-30016, Lach-Ner, s.r.o., ČR)

MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium, reakční pudr, G1111, Promega, USA)

Na₂B₄O₇ · 10H₂O (30870, Lach-Ner, s.r.o., ČR.)

Na₂HPO₄ · 12H₂O (APO 30017, Lach-Ner, s.r.o., ČR)

NaCl (A131428, mikroChem, Slovensko)

nonidet P 40 (NP-40,74385, Sigma-Aldrich, USA)

propidium jodid (PI, SLBH8362V, Sigma-Aldrich, USA)

ribonukleáza A (060M7000V, Sigma-Aldrich, USA)

triton X-100 (1000009002931, Sigma-Aldrich, USA)

tween-20 (37470, Serva, Německo 37470)

3.1.4 Roztoky

1. **izotonický fosfátový pufr (PBS):** 8 g NaCl, 3,21 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 doplněno do 1 l H_2O , pH 7,4
2. **70% etanol**
3. **MTS reakční pudr:** 8,5 mM roztok v PBS
4. **citrátový pufr:** 0,5 M roztok citrátu trisodného monohydrátu v H_2O
5. **roztok PI**
(PI 1) pro analýzu BrdU: 70 mM roztok v PBS
(PI 2) pro analýzu BrU: 7 mM roztok v PBS
(PI 3) pro analýzu fosforylace histonu: 14 mM roztok v PBS
6. **pracovní roztok ribonukleázy A:** 0,7 mM roztok v PBS
7. **1mM roztok BrdU** v RPMI 1640 médiu
8. **100mM roztok BrU** v RPMI 1640 médiu
9. **2 M HCL + 0,5% Triton X-100** v H_2O
10. **0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$**
11. **PBS-T** (PBS + 0,5% Tween-100 + 0,1% BSA) v PBS
12. **1% formaldehyd + 0,05% NP-40** v PBS
13. **0,1% BSA+0,1% NP-40** v PBS
14. **1% roztok glycinu** v PBS
15. **1% FBS** v PBS

3.1.5 Příprava protilátek

Pro analýzu BrdU: Ředění primární protilátky Anti-BrdU-FITC (11-286-C100, Exbio, ČR) bylo 1:250, sekundární protilátky Anti-mouse-IgG-FITC (F2883, Sigma-Aldrich, USA) také 1:250 do promývacího roztoku.

Pro analýzu BrU: Ředění primární protilátky Anti-BrdU-FITC je 1:500, ředění sekundární protilátky Anti-mouse-IgG-FITC je 1:250.

Pro analýzu fosforylace histonu: Ředění primární protilátky Anti-H3^{pSer10}-FITC(06-570,Merck Millipore, Canada) je 1:200, ředění sekundární látky **Alexa Fluor 488** F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11070, **Thermo Fisher Scientific USA**,) 1:250.

3.1.6 Spotřební materiál

plastové kultivační lahve (TPP Trasadigen, Švýcarsko)

panely 6-ti jamkové (TPP)

panely 1536-jamkové (Perkin Elmer)

cytometrické zkumavky 5 ml (BD Falcon, USA)

3.1.7 Přístrojové vybavení

laminární box HeraSafe (ThermoScientific, USA)

CO₂ inkubátor (ThermoScientific, USA)

inverzní mikroskop (Olympus IX51, Japonsko)

Vi-Cell XR (Beckman Coulter)

čtečka mikrotitračních destiček EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)

Echo 555 (LabCyte, USA)

průtokový cytometr FACS Calibur (BD, USA)

centrifuga 5810R (Eppendorf)

analytické váhy (Scaltech, USA)

pH metr (P-LAB, ČR)

vodní lázeň Sub aqua 12 plus (Grant)

vortex genie 2T komplet (Scientific industries)

multi-rotator multi RS-60 (Biosan)

magnetic stirrer MSH 300 (Biosan)

3.2 Metody

Pro účely této bakalářské práce byly využity metody měření cytotoxicity látek pomocí MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium) testu a průtokové cytometrie. Pomocí MTS testu byla nejprve zjištěna toxicita látek na buněčné linii CCRF-CEM, na základě výsledků testu byly vybrány látky, které jsou aktivní, ale zároveň nejsou cytotoxické v nižších koncentracích (Tab. 3) a ty pak byly použity pro další analýzy pomocí průtokové cytometrie.

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých buněk. Lze ji použít i k analýze částic, jako například bakterií, virů, jader, chromosomů, apod. Tato metoda má široké spektrum aplikací, jako například imunofenotypizace buněk, hodnocení syntézy DNA, RNA, aktivace apoptózy, a tím i monitorování vlivu protinádorových léčiv na buněčný cyklus. Suspenzní buňky jsou při průchodu průtokovou celou vstříkovány do středu proudu opláštěvací (nosné) kapaliny, která proudí rychleji a soustřeďuje buňky v centrálním kanálku (hydrodynamická isofokusace). Takto jsou buňky dopraveny až do měřicí cely, kde je detekován fluorescenční signál laserovým paprskem (Rahman, 2013).

3.2.1 Cytotoxický MTS test

Principem testu je přeměna MTS pomocí mitochondriálních dehydrogenáz v metabolicky aktivních buňkách při teplotě 37°C na ve vodě rozpustný formazanový produkt, jenž se kvantifikuje pomocí spektrofotometrie (Lai *et al.*, 2014).

Při MTS testu se využívá záporný náboj formazanového produktu, jenž je rozpuštěn v médiu a k omezení buněčné permeability ošetřen tetrazoliem. Tetrazoliové reagentie se používají v kombinaci s meziprodukty činidel akceptorů elektronu, jako jsou fenazin metylsulfát (PMS) nebo fenazin etylsulfát (PES), jež pronikají přes membránu živé buňky a redukují se. Dochází k převodu tetrazolia na rozpustný formazan (Berridge *et al.*, 2005; Riss *et al.*, 2013). Tento formazanový produkt má maximální absorbanci při 490 nm, která je přímo úměrná počtu živých buněk v kultuře (Lai *et al.*, 2014).

Pro testování cytotoxicity byly buňky připraveny v koncentraci 1×10^6 buněk/ml a nanесeny na 1536-jamkové panely. Panely byly uchovávány při teplotě 37°C, vlhkosti 95 % a obsahu CO₂ 5 % a O₂ 20 % 24 hodin v inkubátoru. Po této době byly k buňkám přidány látky v koncentraci 50 μM a po 72 hodinách působení následovalo přidání 1 μl MTS (8,5 mM) a inkubace po dobu 90 minut v inkubátoru. Poté byla na přístroji EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 490$ nm. Pro účely bakalářské práce byla zkoumána cytotoxicita devíti vybraných derivátů triterpenů. Pokud byla zkoumaná sloučenina schopná inhibovat proliferaci nebo snížit viabilitu buněk, byla vyhodnocena jako aktivní a zařazena do sekundárního testování.

V druhém kroku byly všechny aktivní látky testovány v koncentračním rozmezí 0,12 – 50 μM (v násobku 4) pro stanovení hodnot IC₅₀ (střední inhibiční koncentrace), jež je koncentrace, při které dochází k 50% inhibici životaschopnosti buněk (Stepanenko *et* Dmitrenko, 2015). Výsledky byly zpracovány pomocí MS Office Excel 2007 a vyhodnoceny v programu Dotmatics. Deriváty triterpenů, jejichž hodnota IC₅₀ byla menší jak 10 μM (Tab. 3), byly použity pro následující analýzy. Cytotoxicita všech derivátů byla testována ve třech nezávislých opakováních.

3.2.2 Analýza buněčného cyklu

Pomocí průtokové cytometrie byla provedena analýza buněčného cyklu. Jednotlivé fáze buněčného cyklu byly stanoveny pomocí barvení PI, jež jako fluorescenční barvivo interkaluje do dvouřetězcové DNA a umožňuje tak semikvantitativní stanovení celkového obsahu DNA a distribuce buněčné populace v jednotlivých fázích cyklu: G0/G1 fáze (nereplikovaný obsah), S fáze (syntéza DNA), G2/M fáze (replikace DNA, Darzynkiewicz *et* Juan, 1997). Při analýze buněčného cyklu byl zároveň použit citrátový pufr k extrakci nízkomolekulárních fragmentů a stanovena subdiploidní populace subG0, typická pro probíhající apoptózu.

Buňky v 6-jamkových panelech v hustotě $2,5 \times 10^5$ buněk/ml byly vystaveny působení derivátů o koncentraci IC₅₀ nebo $5 \times IC_{50}$ po dobu 24 hodin v inkubátoru. Následovalo zpracování vzorků podle uvedeného postupu. Buňky byly sesbírány do cytometrických zkumavek, centrifugovány 5 minut při 500 g, promyty nesterilním PBS a fixovány v 2 ml 70% etanolu při 4°C. Takto připravené vzorky byly uchovány

do druhého dne při -20°C . 24 hodin po fixaci byl etanol odstraněn centrifugací (5 minut, 500 g), buňky byly promyty PBS a rozsuspendovány v 1 ml citrátového pufru, poté byly přidány další 3 ml tohoto pufru. Po centrifugaci (500 g, 5 minut) následovalo přidání 500 μl roztoku PI 1, po zvortexování a 15 minutové inkubaci ve vodní lázni při 37°C ve tmě, bylo přidáno 200 μl roztoku ribonukleázy A (0,7 M, 060M7000V, Sigma-Aldrich, USA) a opět následovala 15 minutová inkubace za stejných podmínek. Takto inkubované vzorky byly uchovány nejméně 1 hodinu při 4°C .

Analýza byla provedena na průtokovém cytometru FACS Calibur s použitím argonového laseru (excitace při 488) a softwaru CellQuest. K vyhodnocení měření byl použit program ModFit verze 2 (Verity Software House). Zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu bylo zpracováno v programu Excel (Microsoft Office 2010).

3.2.3 Analýza DNA syntézy

Princip metody je založen na detekci množství 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU) zabudovaného do DNA buněk. BrdU je jako pyrimidinový analog inkorporován namísto tymidinu do nově syntetizované DNA buněk a odráží tak jejich schopnost proliferovat. Množství inkorporovaného BrdU, a tedy množství buněk nacházejících se v S-fázi buněčného cyklu, je detekováno pomocí fluorescenčně značené protilátky konjugované s BrdU.

Buňky byly vysety na 6-jamkové panely v denzitě $2,5 \times 10^5$ buněk/ml a 24 hodin inkubovány s vybranými deriváty o koncentraci IC_{50} nebo $5 \times \text{IC}_{50}$ při 37°C v inkubátoru. Buňky byly v panelech značeny 1 mM roztokem BrdU po dobu 30 minut. Následovalo převedení do cytometrických zkumavek a centrifugace při 4°C a 500 g 5 minut. Po promytí PBS byly buňky fixovány do 2 ml 70% etanolu (4°C), vzorky byly uchovány do druhého dne při -20°C . Následovala centrifugace (při laboratorní teplotě, 500 g, 5 minut), postupné přidání 2 ml 2 M HCl/Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich, USA) a 30 minut inkubace při laboratorní teplotě. K inkubovaným vzorkům byly přidány 2 ml 0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Po zvortexování a centrifugaci (5 minut, 500 g) byly buňky promyty 2 ml pracovního roztoku PBS-T, opět centrifugovány a po odsátí supernatantu bylo přidáno 200 μl naředěné primární protilátky (1:250) anti-BrdU konjugované s IgG-FITC (clone MoBu -fluorescein izothiokyanát, S0030807, Exbio) a vzorky byly inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po inkubaci

následovalo opětovné promytí 2 ml PBS-T a centrifugace (5 minut, 500 g). K získané peletě bylo přidáno 200 μ l zředěné sekundární protilátky Anti-Mouse-IgG-FITC (025K60841, Sigma) v poměru 1:250 a inkubace probíhala 30 minut ve tmě. K promyté peletě bylo přidáno 100 μ l ribonukleázy A o koncentraci 10 mg/ml a buňky byly ponechány 15 minut ve vodní lázni při teplotě 37°C, ve tmě. Na dalších 15 minut bylo přidáno 400 μ l roztoku PI 2.

Takto připravené vzorky byly po 30 minutové inkubaci při 4°C připraveny k analýze syntézy DNA pomocí průtokového cytometru FACS Calibur (argonový laser, excitace při 488 nm) a softwaru CellQuest. Míra syntézy DNA byla zpracována v programu Excel.

3.2.4 Analýza RNA syntézy

Analýza RNA syntézy pomocí 5-bromouridinu (BrU) je založena na imunocytochemické detekci začleněného BrU do RNA buněk pomocí fluorescenčně značené protilátky. Nukleotid BrU je v buňce fosforylován a inkorporován do nově vznikající RNA, jejíž množství je pak přímo úměrné množství zabudovaného BrU.

Buňky byly vysety na 6-jamkové panely o koncentraci $2,5 \times 10^5$ buněk/ml. Po 24 hodinové inkubaci s vybranými deriváty o koncentraci IC_{50} a $5 \times IC_{50}$ při 37°C v inkubátoru, bylo přidáno 40 μ l 100 mM roztoku BrU po dobu 30 minut. Následovalo převedení do cytometrických zkumavek a centrifugace při 4°C (500 g, 5 minut). Po promytí $1 \times$ PBS byly buňky fixovány do 2 ml 1% formaldehydu. Fixované buňky byly uchovány při 4°C. Po 24 hodinách byly buňky odstředěny při 500 g a 4°C, 5 minut. Po odsátí supernatantu následovalo promytí 3 ml $1 \times$ PBS + 1% glycin, centrifugace a odsání supernatantu. Buňky byly inkubovány 45 minut se 100 μ l protilátky anti-BrdU-FITC (ředění 1:250) při laboratorní teplotě. Následovalo promytí PBS s 0,1% NP-40 + 0,1% BSA (bovine serum albumin) a centrifugace (500 g, 5 minut). Po odsátí supernatantu byly buňky inkubovány se sekundární protilátkou anti-mouse-IgG-FITC (100 μ l, 1:250), 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Následovalo promytí PBS s 0,1% NP-40 + 0,1% BSA. K peletě byl po kapkách přidáván 1 ml 1% formaldehydu na mechanickém rotátoru. Buňky byly homogenizovány 15 minut ve tmě za laboratorní teploty a následně ponechány 1 hodinu v lednici při 4°C. Po centrifugaci a odsátí supernatantu

bylo ke vzorkům přidáno 100 µl ribonukleázy A (0,7 M) a po dalších 15 minutách 600 µl PI 2 s následnou 15 minutovou inkubací. Takto připravené vzorky byly změřeny pomocí průtokové cytometrie jako v případě analýzy syntézy DNA.

3.2.5. Detekce fosforylace histonu

Hlavní úlohou histonů je regulovat uspořádání DNA v chromosomech. Nejvyšší úrovně kondenzace dosahuje chromatin v průběhu metafáze mitózy. Tyto chromatinové změny jsou zahájeny během G2 fáze (Slabý *et al.*, 2015) Měření fosforylace histonu H3 na Ser10 (H^{pSer10}) umožňuje detekci mitotických buněk a tím jejich odlišení od buněk v G2/M fázi.

Buňky CCRF-CEM byly nasazeny na 6-jamkové panely a ovlivněny látkami jako u předchozí metody. Vzorky byly sbírány do zkumavek a stočeny při 4°C a 500 g po dobu 5 minut. Po promytí PBS následovala fixace do 2 ml 70% etanolu při 4°C. Vzorky byly uchovány do druhého dne při -20 °C. Následující den byly buňky promyty PBS s 1 % FBS a po stočení byl ke vzorkům přidán 1 ml vychlazeného roztoku 0,25% Tritonu X-100 v PBS a vzorky byly 15 minut inkubovány při 4°C. Poté byly vzorky promyty PBS s 1% FBS a inkubovány se 100 µl sekundární protilátky Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1705868, Life Technologies) v poměru 1:50 po dobu 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Buňky byly znovu promyty PBS s 1 % FBS a inkubovány 30 minut s 600 ul PI 3 roztoku ve tmě při 37°C. Takto připravené vzorky byly změřeny pomocí průtokové cytometrie jako v případě analýzy syntézy DNA. Pro měření apoptózy byly použity vzorky zpracovány stejným způsobem. Měření bylo provedeno pomocí průtokového cytometru a softwaru CellQuest. Data byly zpracovány v programu Excel.

4. Výsledky

4.1 Cytotoxický test MTS

Deriváty triterpenů (Tab. 2) byly nejprve analyzovány z hlediska cytotoxicity u buněčné linie CCRF-CEM. Všechny testované látky vykazovaly v koncentraci 50 μM aktivitu na úrovni inhibice proliferace či snížení viability buněk a byly použity pro sekundární testování ke zjištění hodnoty IC_{50} . Výsledky MTS testu jsou uvedeny v Tab. 3. včetně směrodatných odchylek. Buňky CCRF-CEM byly ovlivněny deriváty po 24 hodin, následně byl proveden MTS test a vyhodnocena IC_{50} . Uvedené hodnoty v tabulce č. 2 jsou průměrem ze tří nezávislých opakování; červeně jsou vyznačeny deriváty mající hodnotu $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$ byly použity do dalšího testování.

Tab. 3: Hodnoty IC_{50} získané pomocí MTS testu. Červeně jsou uvedeny látky, které měly hodnoty IC_{50} nižší než 10 μM a byly použity pro další analýzy.

Kódové označení LEM	IC_{50} (μM)	\pm SD
2717	0,50	0,13
2718	12,25	2,11
2719	1,71	0,39
2720	8,96	2,63
2721	17,6	4,37
2722	>50	-
2723	34,36	6,73
2724	37,12	8,21
2725	28,8	5,96

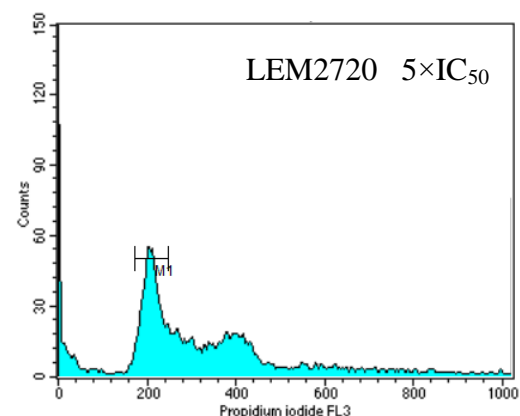
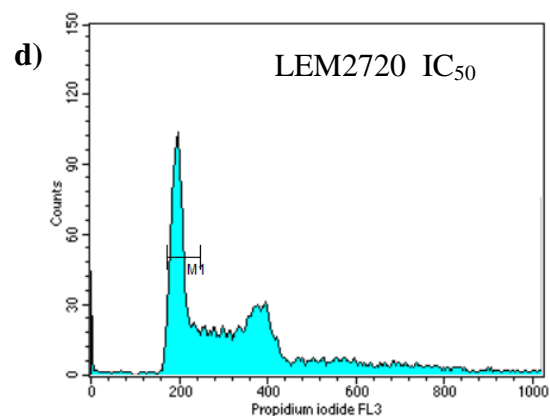
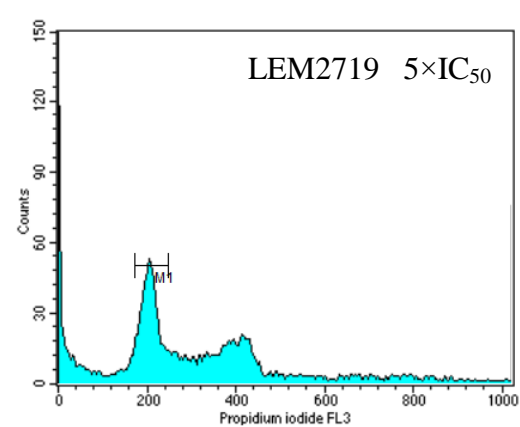
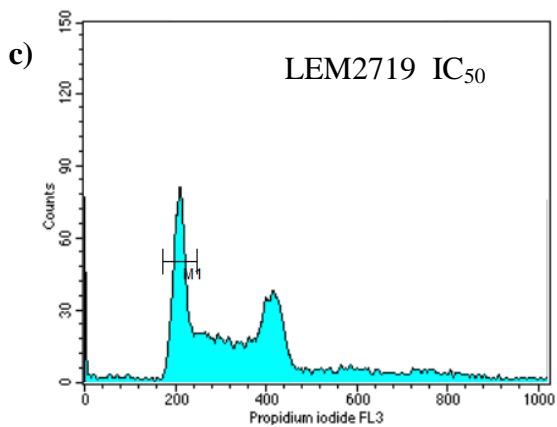
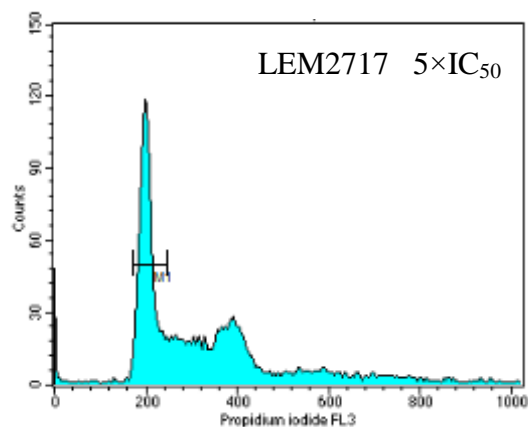
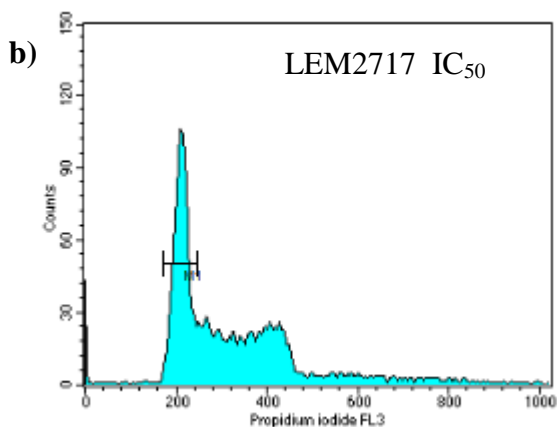
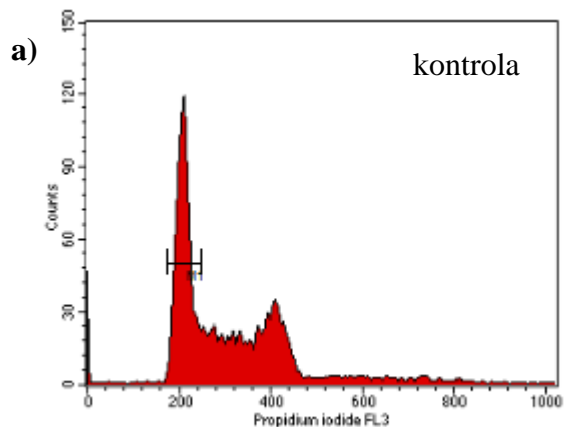
4.2 Analýza buněčného cyklu a apoptózy

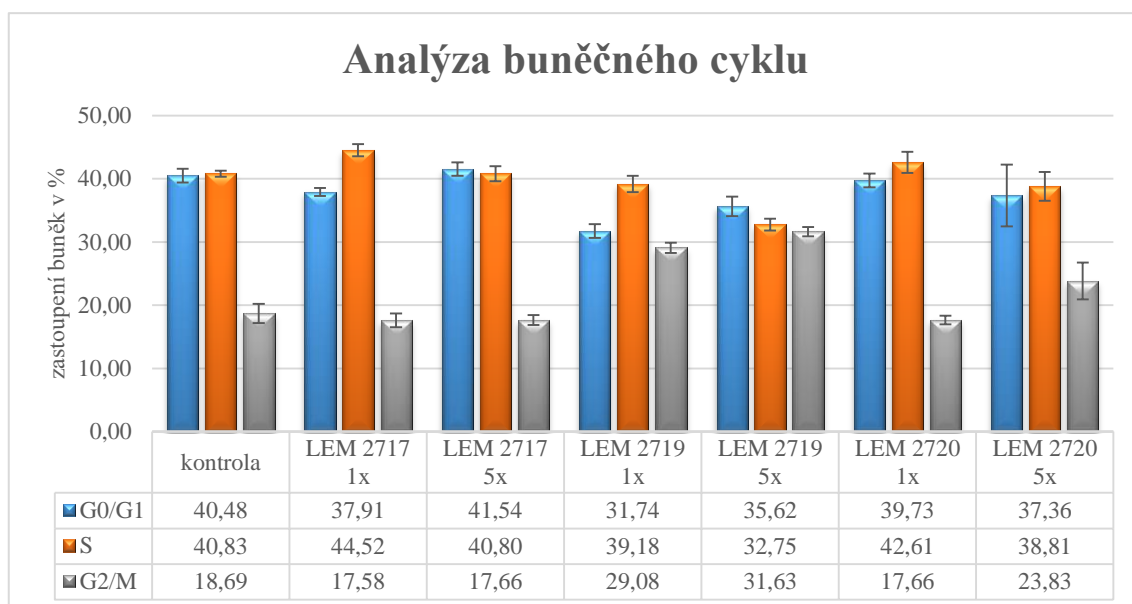
Buněčný cyklus byl analyzován u derivátů LEM2717, LEM2719 a LEM2720 po 24 hodinách působení v koncentracích IC_{50} a $5 \times \text{IC}_{50}$. Analýza byla provedena ve třech nezávislých opakováních. Ukázané výsledky jsou reprezentativním vzorkem jednoho opakování (obr. 5), hodnoty jsou shrnuty v grafu (obr. 6).

V porovnání s kontrolním vzorkem vykazovala látka LEM2719 ($1 \times$) snížení počtu buněk v G0/G1 fázi (nereplikovaný obsah), k nárůstu v S fázi (syntéza DNA) docházelo u LEM2717 ($1 \times$) a 2720 ($1 \times$), naopak větší pokles počtu buněk v S fázi byl zaznamenán u látky LEM2719 ($5 \times$). Byl také zaznamenán nárůst v G2/M fázi (replikace DNA) po ovlivnění buněk CEM-CCRF látkami LEM2719 ($1 \times$ i $5 \times$) a LEM2720 ($5 \times$).

Obr. 5: Histogramy znázorňující distribuci buněčného cyklu pro populaci buněčné linie CCRF-CEM ovlivněné deriváty betA v koncentrací IC_{50} a $5 \times IC_{50}$.

- a) kontrola
- b) LEM2717 IC_{50} (vlevo), $5 \times IC_{50}$ (vpravo)
- c) LEM2719 IC_{50} (vlevo), $5 \times IC_{50}$ (vpravo)
- d) LEM2720 IC_{50} (vlevo), $5 \times IC_{50}$ (vpravo)





Obr. 6: *Analýza buněčného cyklu.*

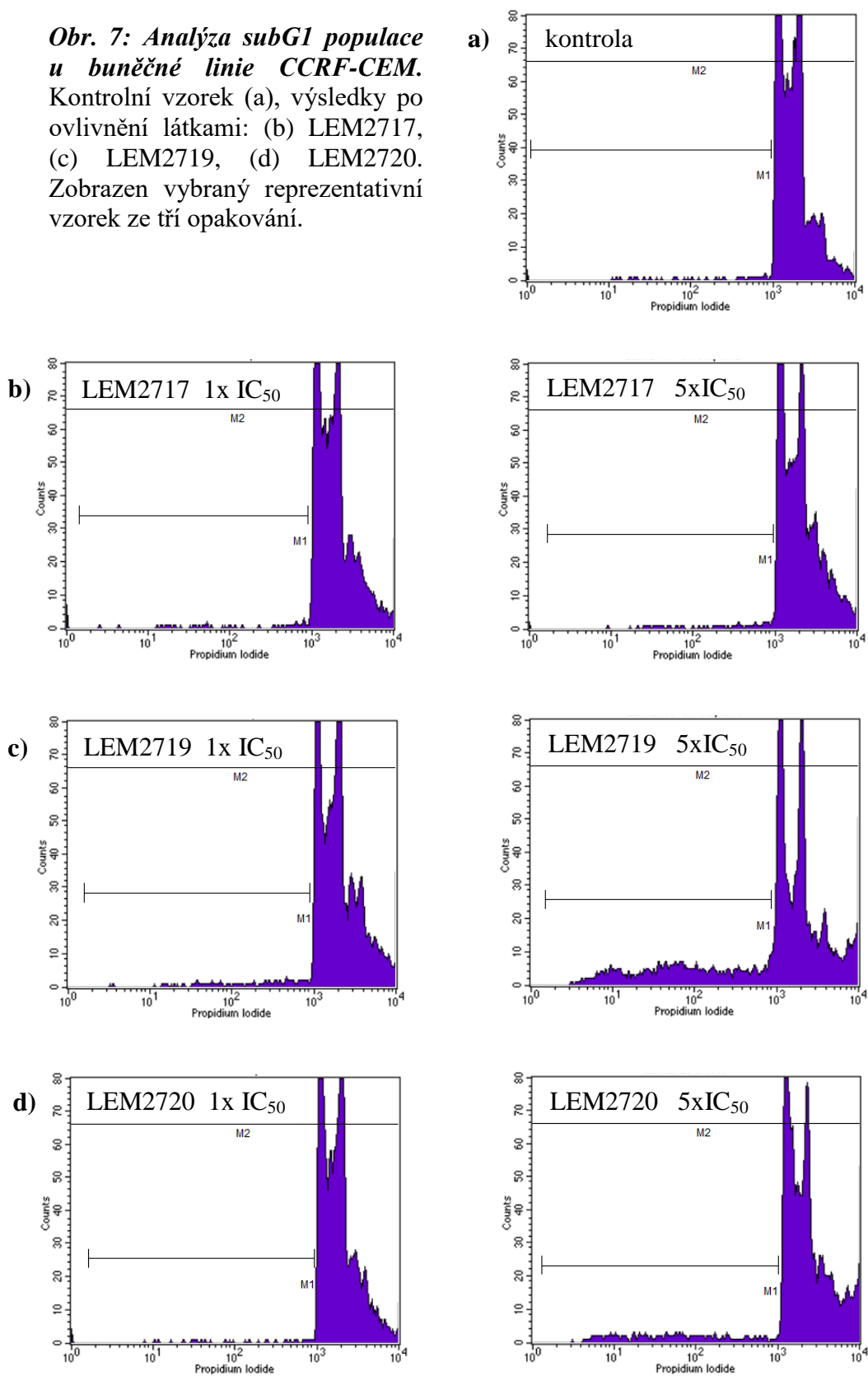
Graf shrnující změny v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ovlivnění látkami LEM2717, 2719 a 2720 v koncentraci 1× a 5×IC₅₀. Průměrné hodnoty jsou uvedeny v procentech, je znázorněna směrodatná odchylka, data jsou výsledkem tří nezávislých opakování.

U stejných derivátů byla analyzována také subG1 populace typická pro apoptotické změny v buňce. Analýza apoptózy (subG1 populace) po 24 hodinách od ovlivnění ukazuje nárůst v subG1 u derivátů LEM 2719 a 2720 v koncentraci 5×IC₅₀, v ostatních případech nebyla nalezena významná změna (Tab. 4). Na Obr. 7 jsou ukázány histogramy znázorňující subG1 populaci pro kontrolní vzorky (a) a látky LEM2717 (b), LEM2719 (c) a LEM2720 (d) v koncentraci 1×IC₅₀ (vlevo) a 5×IC₅₀ (vpravo).

Tab. 4: *Detekce subG1 populace po ovlivnění uvedenými látkami u buněčné linie CCRF-CEM, shrnující tabulka.* Uvedený procentuální výsledek je průměrem ze tří nezávislých opakování.

deriváty	subG1 (%)	± SD
kontrola	2.43	0.18
LEM 2717 1x	2.75	0.08
LEM 2717 5x	3.66	0.28
LEM 2719 1x	4.64	0.27
LEM 2719 5x	24.48	0.93
LEM 2720 1x	4.77	0.55
LEM 2720 5x	9.06	0.45

Obr. 7: Analýza subG1 populace u buněčné linie CCRF-CEM. Kontrolní vzorek (a), výsledky po ovlivnění látkami: (b) LEM2717, (c) LEM2719, (d) LEM2720. Zobrazen vybraný reprezentativní vzorek ze tří opakování.

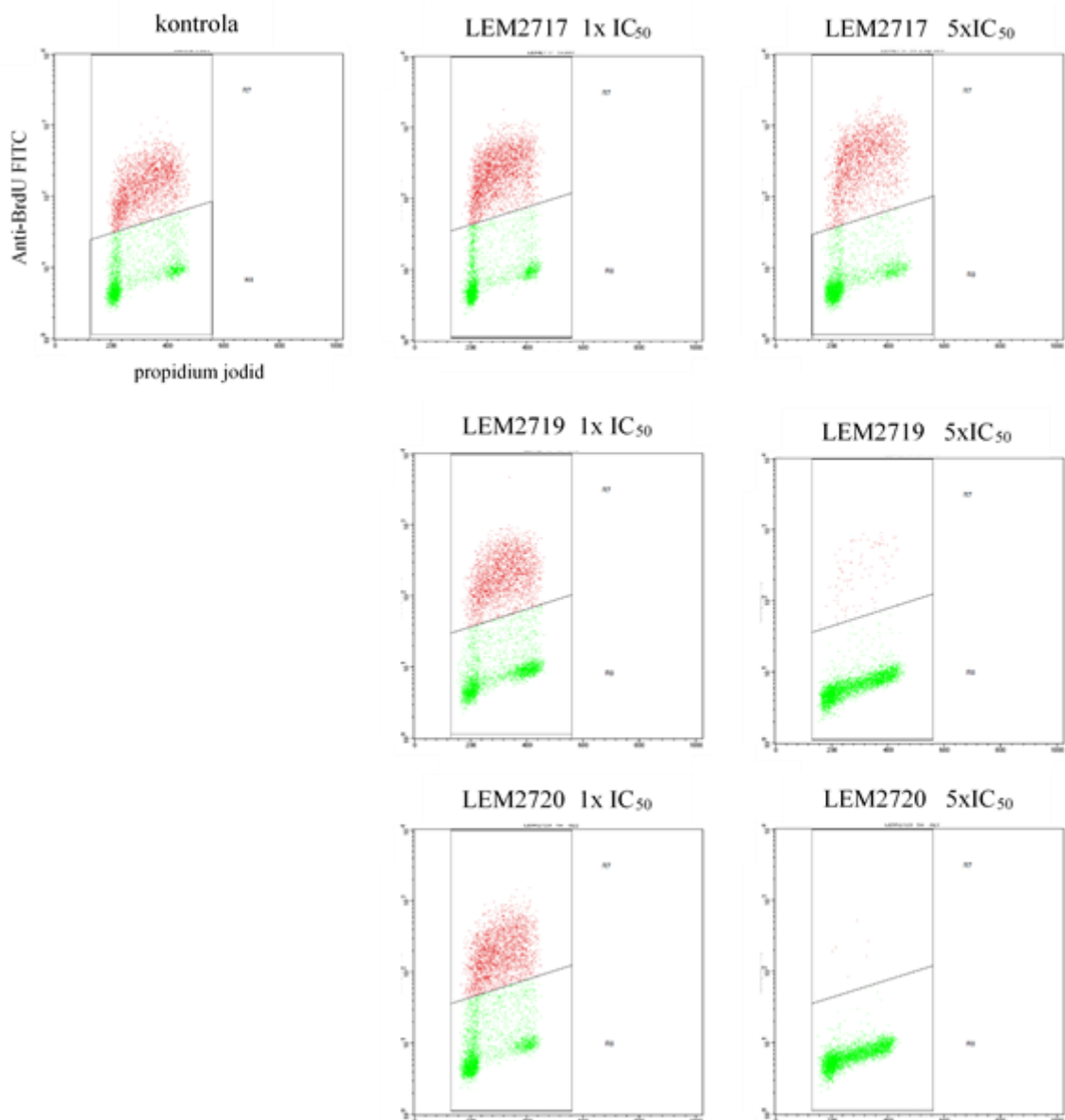


4.3 Analýza syntézy DNA

Množství inkorporovaného BrdU je přímo úměrné množství buněk nacházejících se v S fázi buněčného cyklu, tedy buňky pozitivně značené BrdU jsou považovány za aktivně syntetizující DNA. Výsledky ukazují, že nejvyšší schopnost indukce syntézy DNA ze zkoumaných látek má po 24 hodinách inkubace s deriváty LEM2717, naopak po ovlivnění buněk CCRF-CEM látkami LEM2719 a LEM2720 v koncentraci $5 \times IC_{50}$ dochází ke snížení syntézy DNA na minimum (Tab. 5, Obr. 8).

Tab. 5: Analýza syntézy DNA u buněčné linie CCRF-CEM po ovlivnění vybranými látkami. Uvedené výsledky jsou průměrem ze tří nezávislých opakování se směrodatnou odchylkou (SD).

deriváty	IC ₅₀ (μM)	± SD
kontrola	45.56	0.19
LEM 2717 1×	48.49	0.31
LEM 2717 5×	47.22	0.70
LEM 2719 1×	41.51	0.20
LEM 2719 5×	1.40	0.25
LEM 2720 1×	41.11	0.02
LEM 2720 5×	0.34	0.20



Obr. 8: Histogramy analýzy syntézy DNA u buněčné linie CCRF-CEM po ovlivnění uvedenými látkami. Uvedený histogram je vždy reprezentativním vzorkem ze tří opakování.

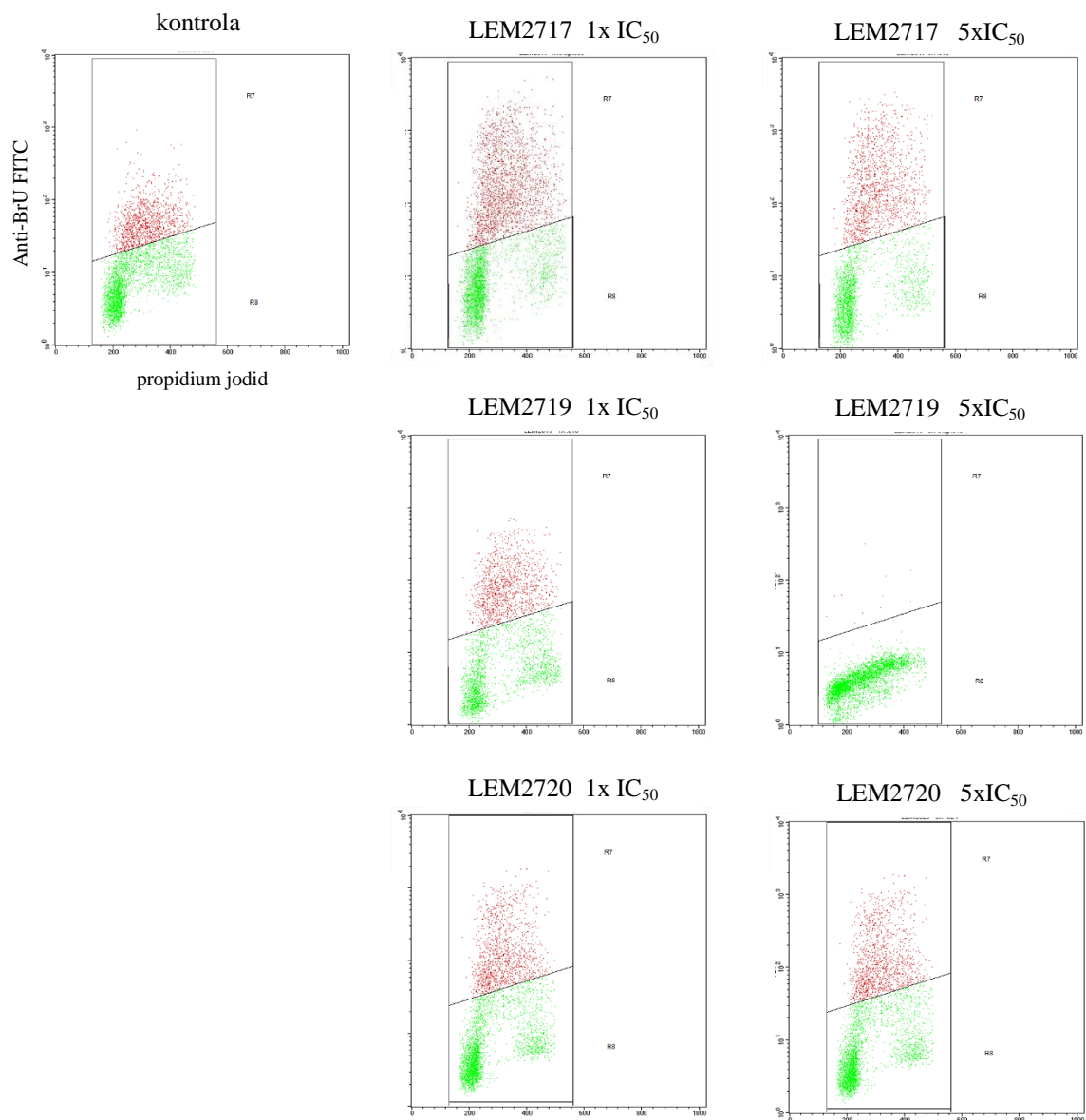
4.4 Analýza syntézy RNA

Dalším krokem byla analýza syntézy RNA pomocí detekce inkorporace BrU do nově vznikající RNA. Po 24 hodinách inkubace buněk CCRF-CEM s látkami LEM2717, LEM2719 a LEM2720 byla vyhodnocena míra syntézy RNA pomocí fluorescenčně značené protilátky specifické vůči BrU.

Všechny deriváty v koncentraci $1 \times IC_{50}$ a $5 \times IC_{50}$ vykazovaly snížení RNA syntézy (Tab. 6). K markantnímu snížení došlo zejména u látky LEM2719 v porovnání s kontrolními vzorky (Tab. 6, Obr. 9), a to v koncentrační závislosti.

Tab. 6: Procentuální zastoupení aktivně RNA syntetizujících buněk v rámci S fáze buněčného cyklu. Uvedené hodnoty odpovídají průměrným hodnotám ze tří nezávislých opakování.

deriváty	syntéza RNA (%)	± SD
kontrola	49.16	0.15
LEM 2717 1x	43.36	0.21
LEM 2717 5x	40.09	0.30
LEM 2719 1x	35.37	1.10
LEM 2719 5x	0.31	0.22
LEM 2720 1x	34.80	0.44
LEM 2720 5x	27.95	0.61



Obr. 9: Bodové grafy znázorňující monitorování aktivní syntézy RNA po 24 hodinovém působení uvedených derivátů *betA* u buněčné linie *CCRF-CEM*. Uvedený histogram je vždy reprezentativním vzorkem ze tří opakování.

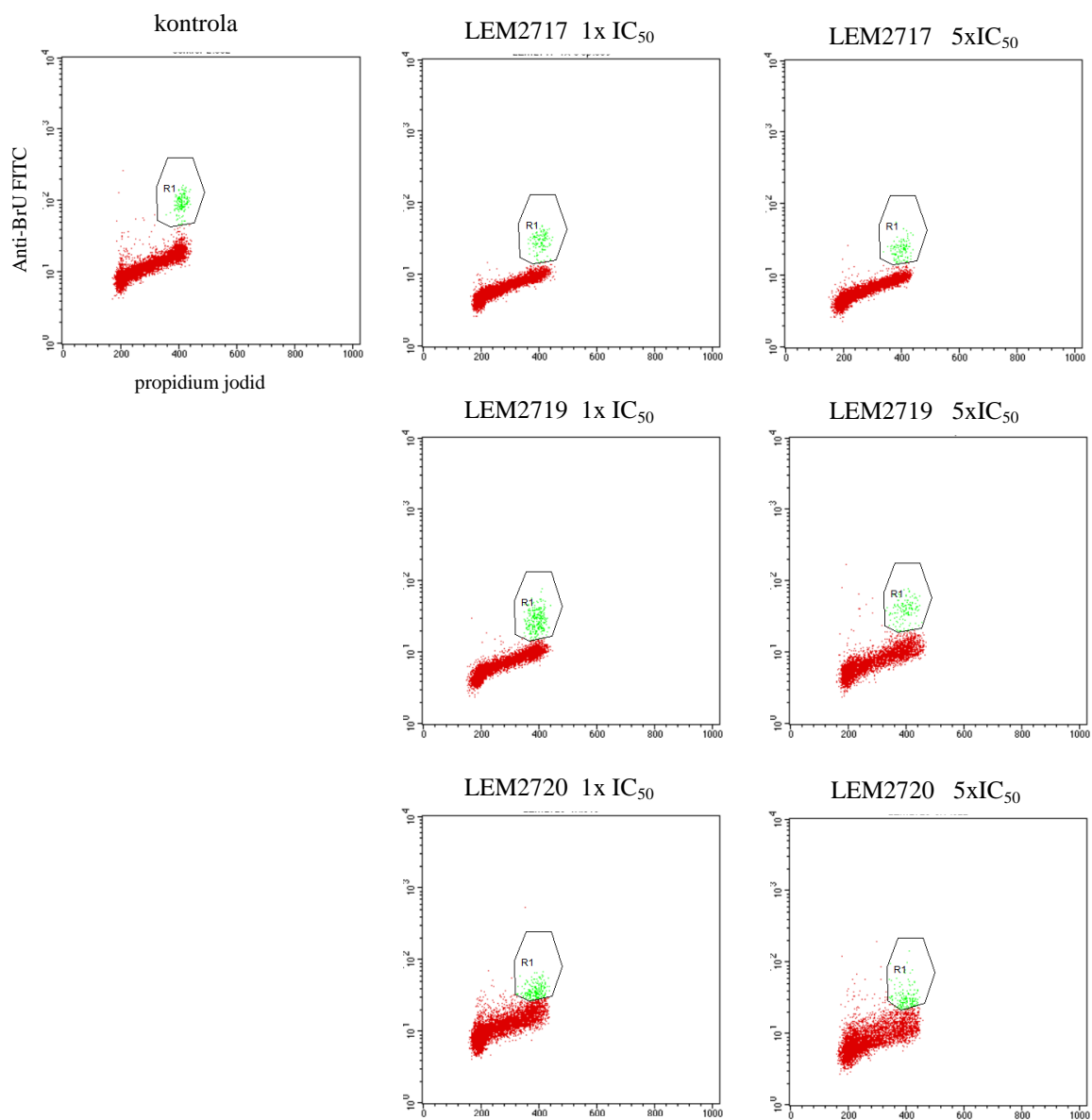
4.5 Detekce fosforylace histonu H3

Pomocí analýzy fosforylace histonu H3 na Ser10 je možné detekovat změny v G2/M fázi buněčného cyklu, tedy buňky vstupující do mitózy. Stejně jako u předešlých metod byly buňky CCRF-CEM vystaveny působení derivátů betaA po dobu 24 hodin, následně byla změřena fosforylace histonu H3 pomocí průtokové cytometrie.

Oproti kontrole vykazovaly deriváty LEM2719 a LEM2720 zvýšenou hladinu fosforylovaného histonu H3 na Ser10, přičemž nejvyšší hodnoty (zhruba 3× oproti kontrole) vykazovala látka LEM2719 v koncentraci 1×IC₅₀ (Tab. 7, Obr. 10).

Tab. 7: Detekce fosforylace histonu H3^{Ser10} po 24 hodinách působení derivátů betaA u buněk CCRF-CEM. Uvedené hodnoty odpovídají průměrným hodnotám ze tří nezávislých opakování.

deriváty	pH3 ^{Ser10} (%)	± SD
kontrola	1.25	0.07
LEM 2717 1×	1.69	0.06
LEM 2717 5×	1.65	0.09
LEM 2719 1×	4.17	0.10
LEM 2719 5×	2.87	0.09
LEM 2720 1×	3.29	0.12
LEM 2720 5×	3.53	0.16



Obr. 10: Bodové grafy znázorňující distribuci pozitivně Anti- $H3^{pSer10}$ -FITC značených buněk po působení uvedených derivátů *betA* po 24 hodinách. Vybrané histogramy jsou vždy reprezentativním vzorkem ze tří nezávislých opakování.

5. Diskuze

Tato práce se zabývá studiem účinků derivátů odvozených právě od betaA s ohledem na jejich protinádorové účinky u nádorové buněčné linie odvozené od T-lymfoblastické leukémie CCRF-CEM. Tato nádorová linie vykazuje vysokou chemosenzitivitu a byla proto vybrána jako vhodný model ke studiu protinádorových účinků derivátů.

Hlavním cílem mé bakalářské práce byla identifikace možných mechanismů protinádorového působení nových derivátů triterpenů na úrovni regulace buněčného cyklu, syntézy nukleových kyselin a fosforylace histonu H3. Pro studium účinků derivátů betaA byly vybrány pouze ty deriváty, které vykazovaly cytotoxické hodnoty IC_{50} pod 10 μ M.

Analýza buněčného cyklu ukázala změny distribuce buněk v jednotlivých fázích zejména po působení derivátů LEM2719 a LEM2720. Jejich účinky jsou však odlišné v závislosti na použité koncentraci ($1\times$ nebo $5\times IC_{50}$). U látky LEM2719 dochází při použití koncentrace $1\times IC_{50}$ ke snížení počtu buněk v G0/G1 fázi a naopak ke zvýšené akumulaci buněk v G2/M fázi, která je pozorovatelná rovněž u koncentrace látky odpovídající hodnotě $5\times IC_{50}$. U látky LEM2720 při koncentraci $1\times IC_{50}$ došlo k zablokování buněk v S fázi a nižší počet buněk vstupoval do G2/M, při pětinasobné koncentraci použité látky došlo ke snížení počtu buněk v G0/G1 a S fázi a k nárůstu buněk v G2/M. V souvislosti s buněčným cyklem byla také detekována populace subG1 ukazující na apoptotické změny. Získané výsledky ukazují mírný nárůst buněk v subG1 populace po působení všech látek i v koncentraci $1\times IC_{50}$, avšak nejvíce patrné jsou změny u látek LEM2719 (téměř 25 %) a LEM2720 (přibližně 9 %) v koncentraci $5\times IC_{50}$. Tyto efekty jsou známy i z literatury. Mezi hlavní popsání protinádorové účinky betaA a jejích derivátů patří právě regulace buněčného cyklu a indukce apoptózy (Wick *et al.*, 1999). Co se týče bloku v S fázi, zjištěné výsledky u látek LEM2717 a LEM2720 v koncentraci $1\times IC_{50}$ korelují s výsledky jiných skupin, například Santos *et al.* (2011).

Analýza syntézy DNA a RNA ukázala také změny na úrovni tvorby nukleových kyselin po působení derivátů betaA. Ke snížení syntézy DNA došlo po ovlivnění látkami LEM2719 a LEM2720, přičemž snížení DNA syntézy téměř na nulovou hodnotu způsobila koncentrace $5\times IC_{50}$. S těmito výsledky souhlasí i výsledky syntézy RNA, kdy došlo ke snížení RNA syntézy u stejných látek v koncentrační závislosti. Pokud se

podíváme zpětně na výsledky analýzy buněčného cyklu pomocí PI, snížení buněk v S fázi je patrné zejména u látky LEM2719. Z literatury je známa regulace DNA polymeráz či topoizomeráz deriváty betA (Chowdhury *et al.*, 2002, Mizushina *et al.*, 2003).

Detekce fosforylované formy histonu H3 na Ser10 ukázala změny na úrovni G2/M fáze a počtu buněk vstupujících do mitózy. Ke zvýšení fosforylace H3 došlo zejména u látek LEM2719 a LEM2720, nejvyšší hodnoty (zhruba 3x oproti kontrole) vykazovala látky LEM2719 v koncentraci IC₅₀. V případě obou látek LEM2719 a LEM2720 došlo také k nárůstu buněk v G2/M fázi cyklu při analýze pomocí PI.

Zjištěné výsledky měření ukazují na to, že ačkoliv jsou si analyzované deriváty triterpenoidů podobné strukturou, jejich účinek na nádorové buňky může být odlišný. Vzhledem k získaným výsledkům je možno říci, že mechanismy účinků jednotlivých derivátů působí na úrovni změn v buněčném cyklu, indukce apoptózy a na úrovni syntézy nukleových kyselin.

Tab. 8: Souhrnná tabulka biologických aktivit testovaných derivátů betA. Tabulka shrnuje výsledky analýzy buněčného cyklu, syntézy DNA a RNA a fosforylace histonu H3. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých opakování.

deriváty	cytotoxicita	apoptóza	buněčný cyklus (%)			pH3 ^{Ser10}	syntéza DNA	syntéza RNA
	IC ₅₀ (μM)	subG1 (%)	G0/G1	S	G2/M	(%)	(%)	(%)
kontrola		2,43	40,48	40,83	18,69	1,25	45,56	49,16
LEM 2717 1×	0,50	2,75	37,91	44,52	17,58	1,69	48,49	43,36
LEM 2717 5×		3,66	41,54	40,80	17,66	1,65	47,22	40,09
LEM 2719 1×	1,71	4,64	31,74	39,18	29,08	4,17	41,51	35,37
LEM 2719 5×		24,48	35,62	32,75	31,63	2,87	1,40	0,31
LEM 2720 1×	8,96	4,77	39,73	42,61	17,66	3,29	41,11	34,80
LEM 2720 5×		9,06	37,36	38,81	23,83	3,53	0,34	27,95

Na základě získaných výsledků shrnutých v Tab. 8 můžeme usuzovat na dobrou korelaci mezi sníženou akumulací buněk v S fázi a snížením syntézy nukleových kyselin po působení derivátů LEM2719 a 2720. Zároveň je patrná dobrá korelace mezi zjištěným procentem buněk v mitóze (pH3^{Ser10}) a zvýšenou akumulací buněk v G2/M fázi. Dosažené výsledky mohou být využity pro další pokročilé testování těchto látek a k získání prospěšných informací, které by do budoucna mohly pomoci při výzkumu a léčbě nádorového onemocnění.

6. Závěry

- Byla vypracována literární rešerše shrnující poznatky týkající se triterpenů a jejich protinádorových účinků zejména na buněčný cyklus a apoptózu. Triterpeny se vyznačují řadou výjimečných účinků, včetně protizánětlivých, virostatických, antimikrobiálních a cytostatických. Mezi první popsané triterpeny s protinádorovou aktivitou patří betA, její efekty byly popsány v řadě prací.
- V experimentální části práce proběhla identifikace mechanismů možných protinádorových účinků nových derivátů triterpenů *in vitro* pomocí metod průtokové cytometrie na buněčné linii CCRF-CEM u tří vybraných derivátů betA. Zejména látky LEM2719 a LEM2720 ukazovaly změny v buněčném cyklu, hlavně v S a G2/M fázi. S těmito výsledky korelují také data z analýzy syntézy nukleových kyselin a fosforylace histonu H3. U daných látek byl také zjištěn nárůst populace v subG1 fázi spojené s apoptotickými pochody. Výsledky bakalářské práce shrnuté v Tab. 8 jsou v souladu s výsledky jiných výzkumných skupin zabývajících se deriváty betA.

7. Seznam použité literatury

Alberts B., Wilson J., Hunt T., 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 1 392 p. ISBN 978-081-5341-055.

Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F., 1999. Mitochondria and Cell Death. Mechanistic Aspects and Methodological Issues. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 264 (3): 687–701. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491114>.

Bertheau P., Espié M., Turpin E., Lehmann J., Plass L.F., Varna M., Janin A., de Thé H., 2008. TP53 Status and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 75 (2): 132–39. doi:10.1159/000123851.

Massimo B., Pinton P., 2014. The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cancer: Molecular Mechanisms Involved in Cell Death. *Frontiers in Oncology* 4: 302. doi:10.3389/fonc.2014.00302.

Borkova L., Gurska S., Dzubak P., Burianova R., Hajduch M., Sarek J., Popa I., Urban M., 2016. Lupane and 18 α -Oleanane Derivatives Substituted in the Position 2, Their Cytotoxicity and Influence on Cancer Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* 121: 120–31. doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.029.

Butterwort J. H., Morgan E.D., 1968. Isolation of a Substance That Suppresses Feeding in Locusts. *Chemical Communications (London)*, no. 1. The Royal Society of Chemistry: 23. doi:10.1039/c19680000023.

Crompton M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 233–49.

De Clercq E., 1995. Antiviral Therapy for Human Immunodeficiency Virus Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 8 (2): 200–239. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542558>.

Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J., 2006. Pharmacological Activities of Natural Triterpenoids and Their Therapeutic Implications. *Natural Product Reports* 23 (3):

394–411. doi:10.1039/b515312n.

Esposti D. M., 2002. The Roles of Bid. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 7 (5): 433–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12207176>.

Fulda S. I., Jeremias H., Steiner H., Pietsch T., Debatin K.M., 1999. Betulinic Acid: A New Cytotoxic Agent against Malignant Brain-Tumor Cells. *International Journal of Cancer* 82 (3): 435–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399962>.

Simone F., Kroemer G., 2009. Targeting Mitochondrial Apoptosis by Betulinic Acid in Human Cancers. *Drug Discovery Today* 14 (17): 885–90. doi:10.1016/j.drudis.2009.05.015.

Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. M., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., Dawson T. M., 2012. Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 19 (1): 107–20. doi:10.1038/cdd.2011.96.

Gao X., Dorrah D., Jiang H., Yongbo L., Arbab A. S., Dulchavsky S. A., Gautam S. C., 2010. Synthetic Triterpenoids Inhibit Growth, Induce Apoptosis and Suppress pro-Survival Akt, mTOR and NF- κ B Signaling Proteins in Colorectal Cancer Cells. *Anticancer Research* 30 (3): 785–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392997>.

Giacinti C., Giordano A., 2006. RB and Cell Cycle Progression. *Oncogene* 25 (38): 5220–27. doi:10.1038/sj.onc.1209615.

Green D. R., Salvesen G. S., Garrison J.B., Krieg A., Welsh K., Wen Y., Reed J. C., Walczak H., Kantari Ch., and McStay G. P., 2011. *Apoptosis | Physiology and Pathology*. 1 edition. Cambridge University Press. <http://www.cambridge.org/us/academic/subjects/life-sciences/cell-biology-and-developmental-biology/apoptosis-physiology-and-pathology?format=HB>.

Hajdúch M., Džubák P., Šarek J., 2004. Biologické účinky triterpenoidů: Protinádorová aktivita. *Klin. Farmakol. Farm.* 18, 14–21.

Hill R. A., Connolly J. D., 2015. Triterpenoids. *Natural Product Reports* 32 (2): 273–327. doi:10.1039/c4np00101j.

Hochegger H., Shunichi T., Hunt T., 2008. Cyclin-Dependent Kinases and Cell-Cycle Transitions: Does One Fit All? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (11): 910–16. doi:10.1038/nrm2510.

Chowdhury A. R., Suparna M., Bidyottam M., Shalini S., Sibabrata M., Hemanta K. M., 2002. Betulinic Acid, a Potent Inhibitor of Eukaryotic Topoisomerase I: Identification of the Inhibitory Step, the Major Functional Group Responsible and Development of More Potent Derivatives. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 8 (7): BR254–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118187>.

Karp G., 2013. *Wiley: Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 7th Edition*. Wiley. <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-EHEP002533.html>.

Kommerer H., Kaluđerović G. N., Kalbitz J., Paschke R., 2011. Lupane Triterpenoids--Betulin and Betulinic Acid Derivatives Induce Apoptosis in Tumor Cells. *Investigational New Drugs* 29 (2): 266–72. doi:10.1007/s10637-009-9358-x.

Laszczyk M. N., 2009. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. *Planta Medica* 75 (15): 1549–60. doi:10.1055/s-0029-1186102.

Liu X. C., Kim N., Yang J., Jemmerson R., Wang X., Benveniste P., Cohen A., 1996. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome C. *Cell* 86 (1). Elsevier: 147–57. doi:10.1016/s0092-8674(00)80085-9.

Lodish H. F., Berk A., Kaiser Ch. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., and Scott M. P., 2013. *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Co.

Mizushima Y., Akira I., Kenji E., Masahiko O., Nobuyuki K., Kohei K., Toshiko S., 2003. Inhibition of DNA Polymerases and DNA Topoisomerase II by Triterpenes Produced by Plant Callus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305 (2): 365–73. doi:10.1016/S0006-291X(03)00765-4.

Obaya A. J., Sedivy J. M., 2002. Regulation of Cyclin-Cdk Activity in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 59 (1): 126–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846025>.

Otová B., Mihalová R., 2012. *Základy Biologie a Genetiky Člověka*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 228 p. ISBN 978-802-4621-098.

Pecorino L., 2012. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press.

Petitjean A., Achatz M. I. W., Borresen-Dále A. L., Hainaut P., and Olivier M., 2007. TP53 Mutations in Human Cancers: Functional Selection and Impact on Cancer Prognosis and Outcomes. *Oncogene* 26 (15): 2157–65. doi:10.1038/sj.onc.1210302.

Petronelli A., Gaetano P., Testa U., 2009. Triterpenoids as New Promising Anticancer Drugs. *Anti-Cancer Drugs* 20 (10): 880–92. doi:10.1097/CAD.0b013e328330fd90.

Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W., Fong H. H., Kinghorn A. D., Brown D. M., 1995. Discovery of Betulinic Acid as a Selective Inhibitor of Human Melanoma That Functions by Induction of Apoptosis. *Nature Medicine* 1 (10): 1046–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489361>.

Recio M. C., Giner R. M., Máñez S., Gueho J., Julien H. R., Hostettmann K., Ríos J.L., 1995. Investigations on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros Leucomelas*. *Planta Medica* 61 (1): 9–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7701004>.

Santos R. C., Salvador J. A. R., Cortés R., Pachón G., Marín S., Cascante M., 2011. New Betulinic Acid Derivatives Induce Potent and Selective Antiproliferative Activity through Cell Cycle Arrest at the S Phase and Caspase Dependent Apoptosis in Human Cancer Cells. *Biochimie* 93 (6): 1065–75. doi:10.1016/j.biochi.2011.02.014.

Sarek J., Klinot J., Dzubák P., Klinotová E, Nosková V., Krecek V., Korínková G., 2003. New Lupane Derived Compounds with pro-Apoptotic Activity in Cancer

Cells: Synthesis and Structure-Activity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* 46 (25): 5402–15. doi:10.1021/jm020854p.

Sendoel A., Hengartner M.O., 2014. Apoptotic Cell Death under Hypoxia. *Physiology (Bethesda, Md.)* 29 (3): 168–76. doi:10.1152/physiol.00016.2013.

Shanmugam M. K., Nguyen A. H., Kumar A. P., Tan B. K. H., Sethi G., 2012. Targeted Inhibition of Tumor Proliferation, Survival, and Metastasis by Pentacyclic Triterpenoids: Potential Role in Prevention and Therapy of Cancer. *Cancer Letters* 320 (2): 158–70. doi:10.1016/j.canlet.2012.02.037.

Slabý O., Michalová E., Šmarda J., 2015. *Molekulární Medicína*. Galén, 598 p. ISBN 978-807-4921-216.

Vanlangenakker N., Berghe T. V., Krysko D. V., Festjens N., Vandenabeele P., 2008. Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. *Current Molecular Medicine* 8 (3): 207–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473820>.

Vaux D. L., Korsmeyer S. J., Alnemri E. S., Bell P. R., Bergmann A., Agapite J., McCall K., 1999. Cell Death in Development. *Cell* 96 (2). Elsevier: 245–54. doi:10.1016/s0092-8674(00)80564-4.

Viatour P., Sage J., 2011. Newly Identified Aspects of Tumor Suppression by RB. *Disease Models & Mechanisms* 4 (5): 581–85. doi:10.1242/dmm.008060.

Wang J., Lenardo M.J., 2000. Roles of Caspases in Apoptosis, Development, and Cytokine Maturation Revealed by Homozygous Gene Deficiencies. *Journal of Cell Science*, March, 753–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10671365>.

Wick W., Grimm C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M., 1999. Betulinic Acid-Induced Apoptosis in Glioma Cells: A Sequential Requirement for New Protein Synthesis, Formation of Reactive Oxygen Species, and Caspase Processing. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289 (3): 1306–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10336521>.

Xu Z-X., Liang J., Haridas V., Gaikwad A., Connolly F. P., Mills G. B., Gutterman J. U., 2007. A Plant Triterpenoid, Avicin D, Induces Autophagy by Activation of

AMP-Activated Protein Kinase. *Cell Death and Differentiation* 14 (11): 1948–57.
doi:10.1038/sj.cdd.4402207.

Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F., 2002. Selective Cytotoxicity of Betulinic Acid on Tumor Cell Lines, but Not on Normal Cells. *Cancer Letters* 175 (1): 17–25.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734332>.

Internetové odkazy:

1. http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/13_02.html
2. <http://www.chemspider.com/>

Seznam tabulek a obrázků

Tab. 1: CDK a cykliny – nomenklatura a jejich funkce v buněčném cyklu savců.

Tab. 2: Seznam derivátů betA vybraných pro pilotní experimenty.

Tab. 3: Hodnoty IC_{50} získané pomocí MTS testu.

Tab. 4: Detekce subG1 populace po ovlivnění uvedenými látkami u buněčné linie CCRF-CEM, shrnující tabulka.

Tab. 5: Analýza syntézy DNA u buněčné linie CCRF-CEM po ovlivnění vybranými látkami.

Tab. 6: Procentuální zastoupení aktivně RNA syntetizujících buněk v rámci S fáze buněčného cyklu.

Tab. 7: Detekce fosforylace histonu $H3^{Ser10}$ po 24 hodinách působení derivátů betA u buněk CCRF-CEM.

Tab. 8: Souhrnná tabulka biologických aktivit testovaných derivátů betA.

Obr.1: Schéma buněčného cyklu.

Obr. 2: Schématické znázornění vnitřní a vnější dráhy apoptózy.

Obr. 3: Strukturní skelet lupanu, betulinu a betA.

Obr. 4: Ukázka stanovení počtu buněk a viability pomocí přístroje Vi-Cell.

Obr. 5: Histogramy znázorňující distribuci buněčného cyklu pro populaci buněčné linie CCRF-CEM ovlivněné deriváty betA v koncentracích IC_{50} a $5 \times IC_{50}$.

Obr. 6: Analýza buněčného cyklu.

Obr. 7: Analýza subG1 populace u buněčné linie CCRF-CEM.

Obr. 8: Histogramy analýzy syntézy DNA u buněčné linie CCRF-CEM po ovlivnění uvedenými látkami.

Obr. 9: Bodové grafy znázorňující monitorování aktivní syntézy RNA po 24 hodinovém působení uvedených derivátů betA u buněčné linie CCRF-CEM.

Obr. 10: Bodové grafy znázorňující distribuci pozitivně Anti- $H3^{pSer10}$ -FITC značených buněk po působení uvedených derivátů betA po 24 hodinách.