

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Protinádorové účinky steroidních  
derivátů srdečních glykosidů**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **Bc. Tereza Kašparová**  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: 2021

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení Bc. Tereza Kašparová  
autora

Název práce Protinádorové účinky steroidních derivátů srdečních glykosidů

Typ práce Diplomová

Pracoviště Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

Vedoucí práce Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.

Rok obhajoby práce 2021

Abstrakt Diplomová práce se zabývá protinádorovou aktivitou derivátů srdečních glykosidů. V teoretické části jsou shrnuty poznatky o karcinomu prostaty, jsou definovány molekulární mechanismy probíhající u karcinomu prostaty, jsou zmíněny jaderné receptory a charakterizovány vlastnosti srdečních glykosidů, včetně jejich současné protinádorové aktivity. V praktické části byly provedeny experimenty za účelem zjištění aktivity derivátů srdečních glykosidů na prostatické nádorové linie DU-145 a LNCaP. Bylo zjištěno, že po ovlivnění buněk testovanou látkou došlo ke změně viability buněk, byl ovlivněn buněčný cyklus a apoptóza buněk. Deriváty srdečních glykosidů jsou slibné pro vývoj nových protinádorových léčiv.

Klíčová slova karcinom prostaty, srdeční glykosidy, buněčný cyklus, apoptóza

Počet stran 84

Počet příloh 0

Jazyk český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Bc. Tereza Kašparová
Title of thesis	Anticancer effects of steroid cardiac glycoside derivatives
Type of thesis	Master
Department	Department of Clinical and Molecular Pathology Medical Faculty, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>The diploma thesis deals with the antitumor activity of cardiac glycoside derivatives. The theoretical part of this thesis summarizes the knowledge about prostate cancer, defines the molecular mechanisms involved in prostate cancer, mentions nuclear receptors and characterizes the effects of cardiac glycosides, including their current antitumor activity.</p> <p>In the practical part of this thesis, experiments were performed to determine the activity of cardiac glycoside derivatives on prostate cancer cell lines DU-145 and LNCaP. It was found that tested agent has an effect on cell viability, the expression of nuclear receptors, cell cycle and apoptosis of prostate cancer cells. Cardiac glycoside derivatives are promising for the development of new anticancer drugs.</p>
Keywords	prostate cancer, cardiac glycoside, cell cycle, apoptosis
Number of pages	84
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne .....

.....

Bc. Tereza Kašparová

*Velké poděkování patří vedoucí mé diplomové práce Mgr. Janě Steigerové, Ph.D. za veškeré rady, nesmírnou trpělivost a za odborné vedení při vypracování celé diplomové práce. Dále děkuju celému kolektivu Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého za pomoc při experimentální části a velmi příjemné pracovní prostředí. Největší díky patří mým rodičům, kteří při mně stáli celou dobu studia a moc mě podporovali.*

## Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	8
1 ÚVOD .....	12
2 CÍLE PRÁCE .....	13
3 TEORETICKÁ ČÁST .....	14
3.1 Karcinom prostaty .....	14
3.1.1 Prostatický specifický antigen a další diagnostické markery .....	17
3.1.2 Diagnostika a léčba .....	19
3.1.3 Molekulární mechanismy u karcinomu prostaty .....	21
3.2 Srdeční glykosidy .....	26
3.2.1 Chemická struktura .....	27
3.2.2 Mechanismus účinku .....	27
3.2.3 Protinádorová aktivita .....	28
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
4.1 Přístroje a materiály .....	30
4.1.1 Přístrojové vybavení .....	30
4.1.2 Použité chemikálie .....	31
4.1.3 Použité roztoky .....	32
4.1.4 Použité protilátky .....	33
4.1.5 Použité buněčné linie .....	34
4.1.6 Testované deriváty srdečních glykosidů .....	35
4.2 Metody .....	36
4.2.1 Test buněčné viability (MTT test) .....	36
4.2.2 Kultivace 3D buněčných sféroidů v přítomnosti testovaných látek .....	37
4.2.3 Průtoková cytometrie .....	38
4.2.4 Western blot analýza .....	39
4.2.5 In Cell ELISA (ICE) .....	42
4.2.6 Fluorescenční imunocytochemická detekce .....	44
4.2.7 TUNEL assay .....	44
4.2.8 Statistické zpracování dat .....	45
5 VÝSLEDKY .....	46
5.1 Vliv derivátů srdečních glykosidů na viabilitu buněk .....	46
5.2 Vliv derivátů srdečních glykosidů na integritu 3D buněčných sféroidů .....	47
5.3 Vliv derivátů srdečních glykosidů na buněčný cyklus .....	49

5.3.1	Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie .....	49
5.3.2	Expres proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu metodou WB analýzy a ICE .....	51
5.4	Vliv derivátů srdečních glykosidů na apoptotickou buněčnou smrt .	54
5.4.1	Expres proteinů regulujících apoptózu metodou WB analýzy a ICE .....	54
5.4.2	TUNEL assay .....	56
5.5	Vliv derivátů srdečních glykosidů na expresi receptorů pro steroidní hormony .....	58
5.5.1	Expres receptorů pro steroidní hormony na základě imunofluorescenčního barvení .....	58
5.5.2	Expres proteinů podílejících se na expresi receptorů pro steroidní hormony metodou WB analýzy a ICE.....	59
6	DISKUZE .....	61
7	ZÁVĚR.....	72
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	73

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A549	buněčná linie odvozená od karcinomu plic
AA+BIS	akrylamid/bis-akrylamid 30%
AMACR	$\alpha$ -methylacetyl koenzym A racemáza
AMXA3	annexin A3
APS	peroxodisíran amonný
AR	androgenový receptor
ATCC	z angl. American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát
Bax	z angl. Bcl-2 associated protein X
BC	buněčný cyklus
Bcl-2	B-buňky CLL/lymfom 2, z angl. B-cell lymphoma 2
Bcl-X <sub>L</sub>	z angl. B-cell lymphoma-extra large
Bid	z angl. BH3 interacting-domain death agonist
Bik	z angl. Bcl-2 interacting killer
Bim	z angl. Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	z angl. Bcl-2 modifying factor;
BPE	extrakt hovězí hypofýzy, z angl. bovine pituitary extract
BSA	hovězí sérový albumin, z angl. bovine serum albumine
CDK	cyklin-dependentní kináza, z angl. cyclin-dependent kinase
Cki	inhibitor cyklin-dependentní kinázy, z angl. cyclin kinase inhibitor
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DHT	dihydrotestosteron
DISC	signální komplex indukující buněčnou smrt, z angl. signal complex indicating cell death
DMEM	kultivační médium z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DU-145	buněčná linie odvozená od karcinomu prostaty
E2F	transkripční faktor



ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	z angl. epidermal growth factor
EGFR	z angl. epidermal growth factor receptor
ER ( $\alpha/\beta$ )	estrogenový receptor ( $\alpha/\beta$ )
EZH2	z angl. enhancer zeste homolog 2
Fas	transmembránový receptor zapojený do apoptózy, tzv. receptor smrti
FbGF	z angl. fibroblast growth factor
FBS	fetální bovinní sérum
HDAC	histonové deacetylázy
HeLa	buněčná linie odvozená od karcinomu děložního hrdla
Hep3B	buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
HepG2.2.15	buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
HRP	křenová peroxidáza, z angl. horseradish peroxidase
Hsp	„heat shock“ proteiny
IC <sub>50</sub>	50% inhibiční koncentrace
ICE	z angl. In Cell ELISA
IGF-I, II	z angl. insulin-like growth factor
LNCaP	buněčná linie odvozená od karcinomu prostaty
LS 180	buněčná linie odvozená od kolorektálního karcinomu
LSB	Laemmliho pufr, z angl. Laemmli Sample Buffer
MCF-7	buněčná linie odvozená od karcinomu prsu
Mcl-1	myeloidní buněčná leukémie 1, z angl. myeloid-cell leukemia 1
Mcm-7	z angl. minichromosome maintance complex component 7
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid
MYC	regulační onkogen
NCI-H460	buněčná linie odvozená od karcinomu plic
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
PARP	poly(ADP-ribóza)polymeráza
PBS	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffer saline
PC-3	buněčná linie odvozená od karcinomu prostaty

PCA3	prostatický nádorový antigen 3, z angl. prostate cancer antigen 3
PFA	paraformaldehyd
PIA	proliferativní zánětlivá atrofie, z angl. proliferative inflammatory atrophy
PIN	prostatická intraepiteliální neoplazie, z angl. prostatic intraepithelial neoplasia
PR	progesteronový receptor
PSA	prostatický specifický antigen
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RAS	z angl. rat sarcoma
Rb	retinoblastomový protein, z angl. retinoblastoma protein
RIPA	lyzační pufr, z angl. radioimmunoprecipitation assay buffer
RNase A	z angl. ribonuclease A
ROS	reaktivní formy kyslíky, z angl. reactive oxygen species
RPMI 1640	kultivační médium, z angl. Roswell Park Memorial Institute
RWPE-1	buněčná linie odvozená od nenádorových buněk prostaty
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za použití dodecylsíranu sodného, z angl. Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFM	z angl. serum free medium
SKOV-3	nádorová ovariální buněčná linie
Src	nereceptorová proteinová tyrozinkináza
TBS	z angl. tris-buffer saline
TdT	terminální deoxynukleotidyltransferáza, z angl. terminal deoxynucleotidyl transferase
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	z angl. transforming growth factor-beta
TNF ( $\alpha$ )	tumor nekrotizující faktor ( $\alpha$ )
TPP	z angl. Techno plastic products
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan

TUNEL

z angl. Terminal deoxy - nucleotide transferase (TdT) -  
mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end  
labeling

## 1 ÚVOD

Rakovina prostaty je významnou zátěží pro veřejné zdraví a nejčastější příčinou nemoci a úmrtnosti mužů na celém světě. Karcinom prostaty je po karcinomu plic a tlustého střeva třetí nejčastější nádor mužů, který vede ke smrti (Mačák *et al.* 2012). Vzhledem k rostoucímu počtu pacientů s diagnostikovaným karcinomem prostaty jsou hledány nové látky, které by měly příznivé výsledky při léčbě zmíněného nádorového onemocnění.

Srdeční glykosidy jsou sekundární metabolity rostlin, jež se využívaly už v lidové medicíně. Nachází se skoro v celé rostlině, ale liší se např. množstvím v různých částech rostliny a jejich hlavním úkolem je ochrana proti škůdcům (Zalucki *et al.*, 2001). Nejznámější látkou je digoxin, jehož extrakt se získává z náprstníku červeného (*Digitalis purpurea L.*). V současné době jsou srdeční glykosidy díky svým inotropním<sup>1</sup> účinkům používány jako kardiotonika, ale existuje řada studií zabývajících se mechanismy protinádorové aktivity srdečních glykosidů u nádorových buněčných linií (Elbaz *et al.*, 2012; Varbanov *et al.*, 2017; Winnicka *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018).

---

<sup>1</sup> ovlivňující svalový stah

## **2 CÍLE PRÁCE**

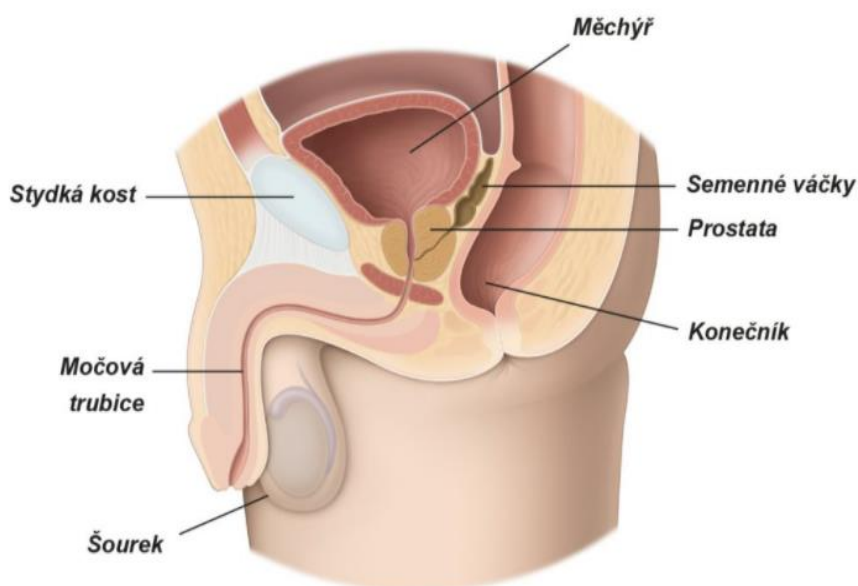
1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma.
2. Stanovit viabilitu nádorových a nenádorových buněk po ovlivnění testovanými deriváty srdečních glykosidů.
3. Charakterizovat vliv testovaných derivátů srdečních glykosidů na integritu buněčných sféroidů, buněčný cyklus, apoptotickou buněčnou smrt a expresi receptorů pro steroidní hormony.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části jsou shrnuty poznatky charakterizující karcinom prostaty, prognostické markery, diagnostiku onemocnění a jeho současnou léčbu. V další části jsou popisovány molekulární mechanismy uplatňující se při regulaci buněčného cyklu a apoptózy u nádorových buněk prostaty, taktéž jaderné receptory zapojené do buněčných dějů karcinomu prostaty. V poslední části teorie jsou charakterizovány testované srdeční glykosidy, zejména jejich mechanismus účinku a biologické působení na nádorové buňky.

#### 3.1 Karcinom prostaty

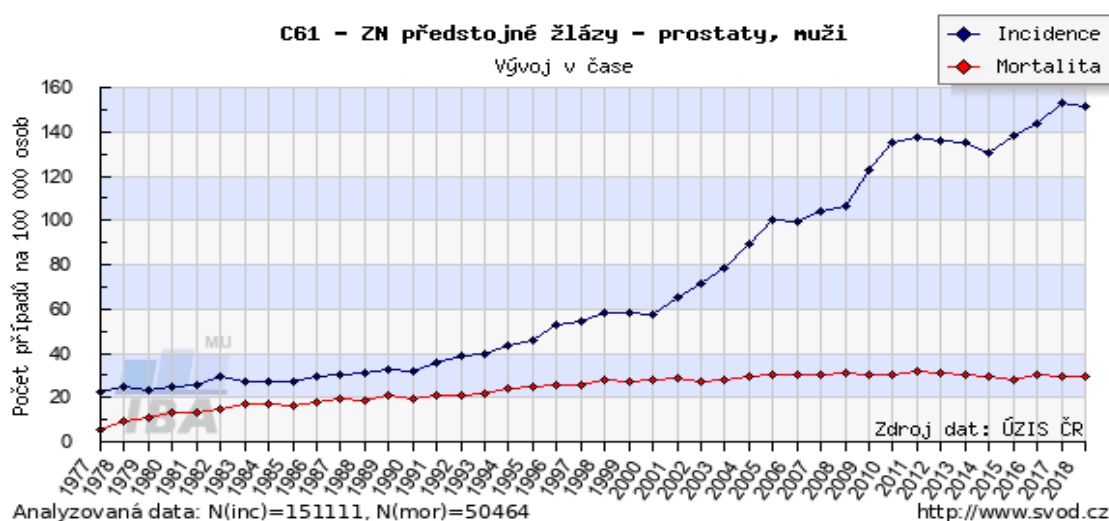
Prostata je svalově žláznatý mužský orgán o velikosti vlašského ořechu. Je označována jako předstojná žláza, žláza s vnitřní sekrecí umístěná pod močovým měchýřem, kterou prochází močová trubice (obr. 1). Váží okolo 20 g. Hlavní funkcí prostaty je produkce sekretu, jenž se při ejakulaci mísí se spermatem a tvoří 15-30 % ejakulátu. Sekret je bezbarvý, má pH 6,4 a obsahuje prostatický specifický antigen, který zkapalňuje ejakulát. Dále obsahuje polyaminy, kyselinu citronovou, kyselou fosfatázu, zinek, prostaglandiny, proteázy a další. Za zásadní úlohu sekretu považujeme výživu spermií, jejich ochranu v kyselém prostředí pochvy a zvýšení jejich pohyblivosti při oplodnění vajíčka.



Obr. 1: Uložení prostaty na sagitálním řezu mužskou pánví. Převzato z: European Association of Urology, 2017.

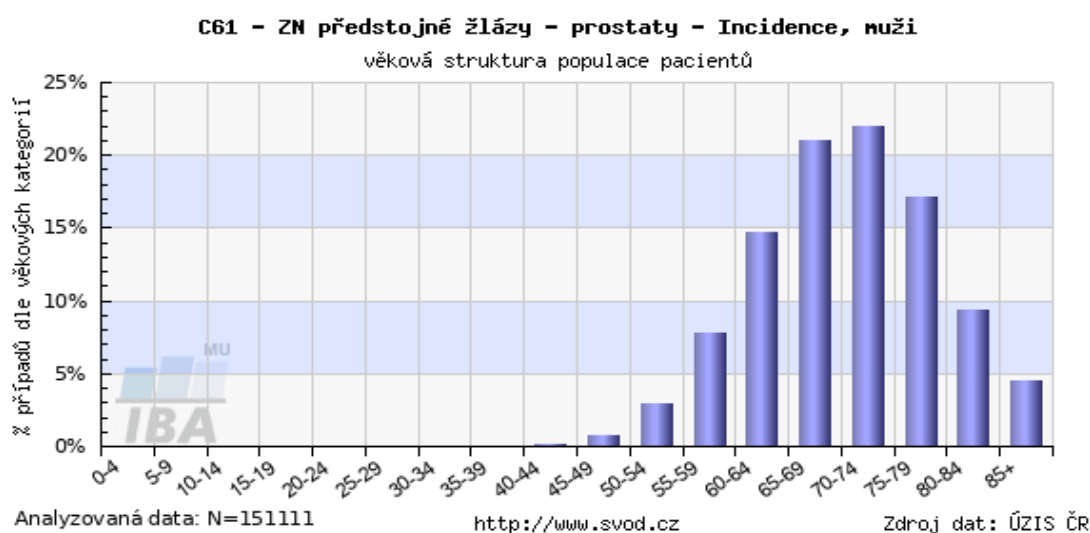
Prostata je hormonálně řízená prostřednictvím androgenů, mužských pohlavních hormonů, zodpovědných za vývoj a růst mužských pohlavních orgánů a sekundárních pohlavních znaků. Mezi nejvýznamnější androgeny patří testosteron. Testosteron je produkován ve varlatech, konkrétně v Leydigových buňkách, a působí na replikaci prostatické buňky. V cílových orgánech pomocí enzymu 5 $\alpha$ -reduktázy dochází k redukci testosteronu na biologicky aktivnější dihydrotestosteron (DHT), který se podílí na správné funkci prostaty, zvýšené syntéze proteinů a buněčné proliferaci. Epitel prostaty se skládá z bazálních a luminálních buněk. Bazální buňky nepodléhají stimulaci androgenů. Buňky luminální mají exokrinní schopnosti a androgeny jsou zde naopak stimulovány. Do lumina žláz produkují prostatický specifický antigen, o němž bude více zmíněno níže (Doležel, 2011; Matoušková, 2006).

Karcinom prostaty je nádorové onemocnění, jehož incidence stoupá s věkem. Jedná se o jedno z nejčastějších nádorových onemocnění u mužů a jednu z nejčastějších příčin úmrtí na onkologické onemocnění u nás i ve světě. Česká republika je na 27. místě v růstu incidence tohoto onemocnění v porovnání s ostatními zeměmi světa. Nemocných je 113 osob v přepočtu na 100 000 obyvatel. Prvenství v počtu nových případů karcinomu předstojné žlázy na světě patří Francii. Incidence ve Francii činí 218 osob na 100 000 obyvatel. Počet nových případů karcinomu prostaty v ČR stále roste, což se nedá říct o mortalitě, která je navzdory přibývajícím případům stále na stejné hodnotě již řadu let (obr. 2)



**Obr. 2: Incidence a mortalita karcinomu předstojné žlázy v ČR v letech 1977-2018. Převzato z: Dušek et al., 2018. Dostupný z: [www.svod.cz](http://www.svod.cz).**

Pacienti s diagnostikovaným karcinomem prostaty jsou ve věku 45-85 a víc let, což znamená, že věková struktura pacientů se zhoubným nádorem prostaty je široká a má rozmezí 40 let. Největší procentuální zastoupení nemocných je ve věku 70-74 let a činí 22 %. S věkovou kategorií 65-69 let se ovšem liší pouze o 1 %. Tyto dvě věkové kategorie převládají nad ostatními a tvoří nejrizikovější věkovou skupinu pro rozvoj karcinomu. S rozvojem diagnostických metod je karcinom předstojné žlázy diagnostikován u stále mladších pacientů, než bylo možné dříve (obr. 3). Zavedení detekce prostatického specifického antigenu způsobilo velký zlom v odhalení většího počtu tumorů, které nebyly zjistitelné vyšetřením *per rectum*, ale také tumorů v časných stádiích (Pešl *et al.*, 2005).



**Obr. 3: Procentuální zastoupení případů karcinomu prostaty v ČR dle věkových kategorií. Převzato z: Dušek *et al.*, 2018. Dostupný z: [www.svod.cz](http://www.svod.cz).**

Frekvence výskytu karcinomu prostaty vzrostla v posledních dvou desetiletích. Příčin vzniku karcinomu předstojné žlázy je pravděpodobně více. Nejpravděpodobnější jsou hormonální změny, ale vliv má i genetika a prostředí (Král *et al.*, 2010; Mačák *et al.* 2012). Dále sem patří epigenetické změny a vlivy vnějšího prostředí, špatný životní styl, nevhodná strava, kouření, alkohol.

Karcinom prostaty nejčastěji metastázuje do kostí, zejména do bederní páteře, pánve či kosti stehenní. Metastáze tak mohou způsobovat patologické zlomeniny, poškození míchy nebo poruchu krevetvorby. Dále se mohou metastázy vyskytovat v plicích, játrech, ledvinách, močovém měchýři, semenných váčcích a lymfatických uzlinách pánve.



Vznik karcinomu prostaty má dlouhodobý vývoj, může trvat řadu let a mohou mu předcházet buněčné změny, proliferativní zánětlivá atrofie (PIA) a prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN), která se jako prekanceróza může objevit až 20 let před vývojem nádoru (Dvořáček, 2005).

### **3.1.1 Prostatický specifický antigen a další diagnostické markery**

První poznatky o prostatickém specifickém antigenu (PSA) pochází ze 70. let 20. století. Ablin a kolektiv v roce 1970 studovali PSA v normální lidské prostatické tkáni a prokázali přítomnost tří druhů PSA. V roce 1971 Hara a kolektiv popsali gama seminoprotein, který je identický s PSA. V roce 1979 se podařilo Wangovi a kolektivu pomocí imunoprecipitační techniky a použití protilátky proti prostatickému tkáňově specifickému antigenu detekovat PSA ve zdravých prostatických tkáních, v benigních hypertrofických a maligních prostatických tkáních. V jiných lidských tkáních antigen prokázán nebyl.

Prostatický specifický antigen je glykoprotein tvořený 237 aminokyselinami a jedním uhlovodíkovým řetězcem, který se váže na aminoskupinu kyseliny asparagové. Je produkován zdravou i nádorovou tkání tvořenou epitelovými buňkami. Jeho molekulová hmotnost je 33 kDa. Prostatický specifický antigen je nádorový marker karcinomu prostaty. Vyskytuje se v tělesných tekutinách a může být kvalitativně i kvantitativně hodnocen laboratorními metodami (Lukeš *et al.*, 2001). Gen, který PSA kóduje, je uložen na 19. chromozomu, konkrétně na jeho dlouhém raménku. Prostatický specifický antigen se vytváří v epiteliálních buňkách prostaty a vyskytuje se především ve spermatu. Hladina PSA nemusí být zvýšena jen v případě zhoubného nádoru, ale i u jiných onemocnění např. při zánětu prostaty, benigní hyperplazii prostaty, akutní retenci moči, ale i po katetrizaci, endoskopii močového měchýře močovou trubicí pomocí cystoskopu či pohlavním styku. Do krevního oběhu se dostává po překonání buněčných struktur (Lukeš *et al.*, 2001; Štern *et al.*, 2008).

Prostatický specifický antigen nalezneme ve formě volné i vázané. Vytváří se komplexy vazbou na dva další sérové proteiny  $\alpha$ -1-antichymotrypsin a  $\alpha$ -2-makroglobulin. Laboratorně stanovitelný je PSA

vázaný na alfa-1-antichymotrypsin a volný PSA (Lukeš *et al.*, 2001). Udávaná referenční hodnota PSA je 0 - 4 ng/ml.

K dalším diagnostickým markerům patří prostatický specifický membránový antigen (PSMA), gen p27<sup>Kip1</sup>, Bcl-2, EGFR, p53 (Klečka *et al.*, 2008). Předmětem dalšího zkoumání je např. MYC onkogen, p21, E-cadherin, RAS onkogen a EZH2 onkogen a markery detekovatelné v moči, např. prostatický nádorový antigen 3 (PCA3),  $\alpha$ -methylacyl koenzym A racemáza (AMACR), annexin A3 (AMXA3) a další.

V roce 1987 byl Horoszewiczem a jeho kolektivem popsán **PSMA**. Zjistili, že tento membránový glykoprotein o velikosti 100 kDA byl nadměrně exprimován v buňkách a séru pacientů s karcinomem prostaty. Od této doby je PSMA brán jako potencionální diagnostický a prognostický marker rakoviny prostaty, který často koreluje s Gleasonovým skóre, tzn., že čím je vyšší stádium rakoviny, tím více PSMA můžeme detekovat (Bradford *et al.*, 2006). Enzymatická aktivita prostatického specifického membránového antigenu hraje důležitou roli v karcinogenezi a progresi prostaty (Yao *et al.*, 2010).

Jako inhibitor cyklin dependentní kinázy (CKI) a negativní regulátor buněčné proliferace se uplatňuje gen **p27<sup>Kip1</sup>** (Klečka *et al.*, 2008). Úplná nebo částečná mutace genu p27<sup>Kip1</sup> nezastaví buněčný cyklus a dochází ke zvýšení buněčné proliferace a k rozvoji karcinogeneze (Trojanowsky *et al.*, 2015).

Přítomnost **Bcl-2** proteinu inhibujícího apoptózu byla procentuálně zjištěna u karcinomu prostaty téměř v 70 % (Zellweger *et al.*, 2005). Rovněž byla prokázána vyšší hladina Bcl-2 u karcinomů hormonálně rezistentních a karcinomů s vysokým Gleasonovým skóre (Quinn *et al.*, 2005).

Receptor pro epidermální růstový faktor (**EGFR**) je jedním z členů rodiny HER2 genů. Receptor je exprimován s výraznou variabilitou v normálním epitelu prostatických žláz i v hyperplastických žlázkách. Význam exprese u nádorů prostaty zatím není zcela objasněn. Zvýšená exprese EGFR je spojená s horší prognózou onemocnění a použití specifické protinádorové terapie proti EGFR je bez léčebného efektu (Wilding *et al.*, 2006).

Gen **p53** je tumor supresorový gen, který se účastní procesů udržení genomové integrity a kontroly apoptózy. K inaktivaci genu p53 dochází nejčastěji mutacemi v obou alelách genu. Následkem mutace p53 je akumulace p53 proteinu v jádře buňky se zvýšeným poločasem degradace. Procento pacientů s karcinomem prostaty s inaktivovaným p53 genem se pohybuje od 4 do 61 % (Quinn *et al.*, 2005). Toto široké rozmezí vystihuje nesourodost imunohistochemických metodik měřících koncentraci p53 proteinu.

Významnou oblastí výzkumu jsou markery detekovatelné v moči. Jejich výhodou je snadný odběr vzorků, u nichž se stanovuje přítomnost buněk karcinomu nebo produktů, které nádorové buňky sekretují. Mezi nejslibnější patří PCA3, dále AMACR, ANXA3 a další.

Prostatický nádorový antigen 3 (**PCA3**) byl identifikován již v roce 1999 (Bussemakers *et al.*, 1999). Je lokalizován na chromozomu 9q21.1, jeho produktem není protein, ale nekódující RNA s nejasnou funkcí. V různé míře je exprimován v buňkách normální prostaty, ovšem bylo zjištěno, že je vysoce exprimován v nádorové prostatické tkáni (10-100x více než u normální tkáně), přičemž jeho přítomnost je omezená pouze na prostatickou tkáň. Stanovení PCA3 má pomoci při správném výběru pacientů pro biopsii prostaty zejména v případě hodnot PSA v tzv. šedé zóně (2,5-10 ng/ml) a v případě podezření na karcinom prostaty navzdory negativnímu výsledku první biopsie (Day *et al.*, 2011).

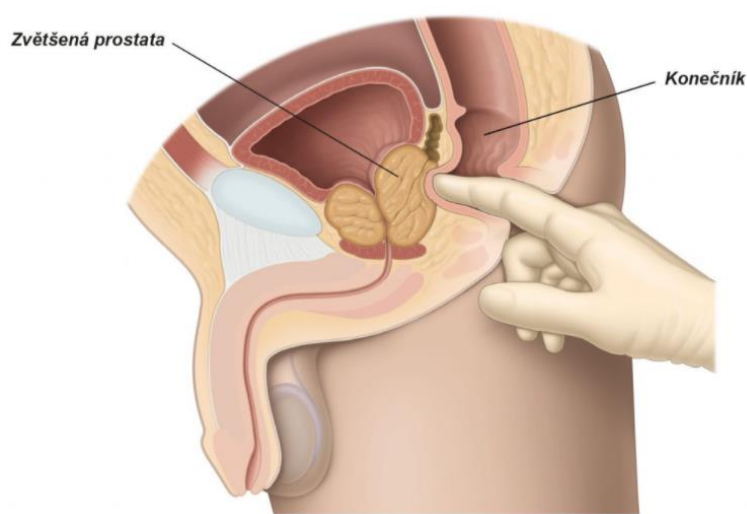
$\alpha$ -methylacyl koenzym A racemáza (**AMACR**) je koenzym, jehož stanovení v moči po rektálním vyšetření či biopsii prostaty zvyšuje senzitivitu a specifitu výsledku histologie (Makarov *et al.*, 2009).

Annexin A3 (**ANXA3**) je protein vázající kalcium a fosfolipidy, který se uplatňuje během buněčné diferenciaci. Jeho stanovení v moči podporuje případnou indikaci biopsie u pacientů s negativním rektálním vyšetřením a hraničním PSA. Byla popsána korelace ANXA3 s Gleasonovým skóre (Jamaspishvili *et al.*, 2010).

### 3.1.2 Diagnostika a léčba

Včasně odhalení zhoubného nádoru a jeho diagnostika jsou pro další vývoj nemoci velice důležité. Ke stanovení se vyšetřuje hladina PSA a v případě

vyšší hodnoty než je hodnota referenční, je prováděna punkční biopsie předstojné žlázy a odebraný materiál je zaslán k histologickému vyšetření (Pešl *et al.*, 2005). Tkáň prostaty může být odebrána i transrektálně pod ultrasonografickou kontrolou. Prognóza je odvozena od počtu pozitivních vzorků, stanovení Gleasonova skóre a hladiny PSA. K určení rozsahu onemocnění se dále doplňuje vyšetření *per rectum* (obr. 4) a scintigrafie<sup>2</sup> skeletu, která využívá radioaktivní látku k zobrazení vyšetřovaného orgánu (Hradil *et al.*, 2014).



Obr. 4: Vyšetření prostaty *per rectum*. Převzato z: European Association of Urology, 2017.

Terapie karcinomu prostaty se stanovuje na základě progresu onemocnění, histopatologické klasifikace a klinického stádia onemocnění. Léčba je taktéž volena dle věku pacienta a stupně buněčné diferenciaci. Mezi nejvíce používanou léčbu patří hormonální terapie, která je založená na blokování účinku androgenů, někdy dokonce až k potlačení jejich tvorby, což má za důsledek apoptózu buněk závislých na androgenech. Snížení hladin testosteronu lze docílit i chirurgickou cestou, tzv. orchiektomií<sup>3</sup> či farmakologickou cestou (Vítek *et al.*, 2012). Biologická léčba stimuluje imunitní systém, jehož aktivita je buď záměrně zesílena, nebo oslabena. Používají se vakcíny, toxiny nebo imunomodulátory, které působí pouze na postižené buňky a zdravé buňky nijak neovlivňují. V případě výskytu vzdálených metastáz je dle standardů urologické společnosti nabídnuta chemoterapie, jež spočívá v podávání docetaxelu v třítydenních intervalech.

<sup>2</sup> radionuklidové vyšetření

<sup>3</sup> odstranění varlat

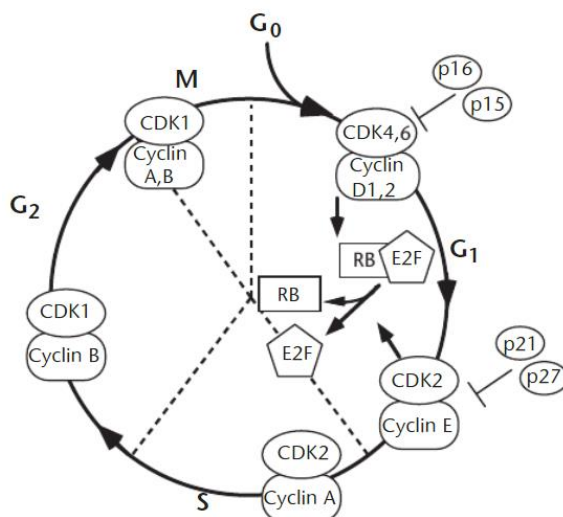
Další možností léčby je imunoterapie, která je v dnešní době uznávanou metodou, ale stále má spoustu nezodpovězených otázek (Bartůňková *et al.*, 2014; Podrazil *et al.*, 2016).

### **3.1.3 Molekulární mechanismy u karcinomu prostaty**

Kancerogeneze je proces, během kterého dochází k maligní transformaci buněk a následně vzniku nádoru. Mezi typické molekulární mechanismy transformované buňky patří poškozená regulace buněčného cyklu, nezávislost na růstových faktorech, neomezený replikační potenciál, poškozené mechanismy a deregulovaná apoptotická programovaná buněčná smrt. Mezi znaky maligního nádoru patří indukce angiogeneze, invazivita a tvorba metastáz (Hanahan a Weinberg, 2000).

#### **3.1.3.1 Buněčný cyklus**

Buněčný cyklus (BC) je děj důležitý pro růst a vývoj všech organismů. Dělíme ho do pěti základních fází končící rozdělením buňky za vzniku dvou buněk dceřiných. Mezi základní fáze patří  $G_0$ ,  $G_1$ , S,  $G_2$  a M fáze (obr. 5). Jeden buněčný cyklus trvá přibližně 16 hodin, ale jeho délka je ovlivněna především délkou fáze  $G_1$  (restrikční bod), ze které se ještě buňky mohou vrátit do klidové fáze  $G_0$ , kde setrvávají v klidu až do další mitózy. V S fázi dochází k syntéze DNA a ve fázi  $G_2$  se buňky připravují na mitózu. M fáze neboli mitotická fáze se dále dělí na profázi, metafázi, anafázi a telofázi. V těchto fázích dochází k dělení jádra, po kterém následuje rozdělení celé buňky, tzv. cytokineze. Interfáze je období mezi dvěma mitózami buňky.



Obr. 5: Fáze buněčného cyklu a místa zapojení proteinů p15, p16, p21, p27, Rb a transkripčního faktoru E2F, cyklin-dependentních kináz a cyklinu do regulace buněčného cyklu. Převzato z: Funk, 2005.

Regulaci přechodu mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu zajišťují cyklin-dependentní kinázy (CDK). Cyklin-dependentní kinázy jsou serin/threonin proteinkinázy, jejichž regulace závisí na vazbě s cykliny, na vazbě s inhibitory CDK a na inhibiční a regulační fosforylaci. Nejdříve je nutné CDK aktivovat či inaktivovat v konkrétních časových bodech během BC. S přechodem buňky z  $G_1$  fáze do S fáze je nejvíce spojována aktivita komplexu D/CDK4,6 (Hirama *et al.*, 1995). Za klíčový substrát pro tento komplex považujeme retinoblastomový protein (Rb), jehož funkce spočívá v regulaci přechodu mezi  $G_1$  a S fází. Komplexem D/CDK4,6 je Rb protein fosforylován a tím se uvolní histonové deacetylázy (HDAC). Uvolnění HDAC umožní expresi cyklinu E. Cyklin E vytvoří komplex s CDK2 a spustí druhou vlnu fosforylace Rb. Následkem fosforylace se uvolní transkripční faktory E2F a umožní tak transkripci genu např. cyklinu A, DNA polymerázy, které jsou důležité pro S fázi. V případě, že nedojde k fosforylaci Rb proteinu v  $G_1$  fázi, nedojde k průchodu buňky buněčným cyklem (Slabý *et al.*, 2015). Cyklin A se váže na CDK2 a umožní vstup buňky do S fáze (Hirama *et al.*, 1995). Nástup mitotické fáze je podpořen komplexem cyklin A/CDK1 a její další regulaci zajišťuje komplex cyklin B/CDK1 (Arellano *et al.*, 1997).

Dále nutno zmínit strážce genomu, protein p53, který sjednocuje buněčné odpovědi na poškození DNA, oxidační stres, hypoxii, aktivaci onkogenů a také reguluje aktivaci kontrolních bodů BC (Slabý *et al.*, 2015).

Aktivita proteinu p53 je narušena u většiny lidských nádorů a z toho důvodu nedojde k potlačení růstu nádoru, není spuštěna apoptóza a nádor nekontrolovatelně roste (Gottlieb *et al.*, 1998).

### **3.1.3.2 Apoptotická programovaná smrt buněk**

Apoptotická programovaná smrt buněk neboli apoptóza je buněčný děj potřebný k udržení vnitřního prostředí organismu. Maligní transformace prostatických buněk je způsobena spíše neschopností buněk spustit apoptózu než zvýšenou buněčnou proliferací (Gurumurthy *et al.*, 2001). Slovo apoptóza pochází ze starořečtiny a používá se pro „podzimní opadávání listů“ (Kerr *et al.*, 1972). Apoptóza se uplatňuje již během vývoje samotného jedince. Díky ní dochází např. k odstranění tkáně mezi prsty. Aktivace apoptózy je při boji s nádorovými buňkami zásadním krokem.

Hlavní roli v regulaci apoptózy hrají kaspázy, které patří do skupiny cysteinových proteáz. Kaspázy se v buňce nacházejí v neaktivní formě a dělí se na kaspázy efektorové a iniciační. Na základě aktivace kaspáz rozlišujeme apoptotickou dráhu vnější a vnitřní (Sankari *et al.*, 2012). Obě tyto dráhy jsou však propojeny, a proto se navzájem ovlivňují (Slabý *et al.*, 2015). Aktivované kaspázy mají schopnost štěpit buněčné substráty včetně poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP) a také kaskádovitě aktivovat další kaspázy (Cohen, 1997). Vnější apoptotická dráha je spouštěna faktory smrti, jako je tumor nekrotizující faktor (TNF) a Fas (CD95) transmembránový receptor. Seskupením faktorů smrti dojde ke vzniku smrt indukujícímu signalizačnímu komplexu (DISC) a dojde ke štěpení efektorových kaspáz.

Vnitřní apoptotická dráha je spouštěna vnitřními signály buňky a reaguje např. na poškození DNA či oxidační stres (Jacobson, 1997). S vnitřní apoptotickou dráhou jsou spojovány hlavně proteiny rodiny Bcl-2, které udržují mitochondriální integritu. Bcl-2 je anti-apoptotický mediátor zapojený v široké škále lidských nádorů, ovlivňuje proliferaci buněk a souvisí s rezistencí na protinádorovou terapii. Bcl-2 je zkoumán v souvislosti se vznikem karcinomu prostaty v závislosti na přítomnosti androgenu (Catz *et al.*, 2003). Proteiny rodiny Bcl-2 mohou působit anti-apoptoticky (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1), pro-apoptoticky (Bax) nebo mohou obsahovat pouze BH3

doménu a působit pro-apoptoticky (Bim, Bik, Bmf; Danial, 2007; Slabý *et al.*, 2015).

### **3.1.3.3 Jaderné receptory zapojené do regulace buněčných dějů karcinomu prostaty**

Jaderné receptory jsou hormonálně regulované transkripční faktory, které řídí mnoho důležitých fyziologických a vývojových procesů. Jakmile nastane porucha funkce receptoru, může dojít k rozvoji onemocnění. Díky aktivitě závislé na ligandu jsou jaderné receptory cíle pro návrh léků v mnoha terapeutických oblastech (Renaud *et al.*, 2000). Jaderné receptory rozlišujeme podle typu ligandu, který vážou. Prvními jsou jaderné receptory pro endokrinní hormony, jako jsou estrogeny a androgeny, glukokortikoidy, hormony štítné žlázy, retinoidy a vitamín D3. Druhými jsou jaderné receptory, které se podílí na metabolismu lipidů (jaderní X receptory, receptory aktivované proliferátory peroxizomů, farnesoidní<sup>4</sup> X receptory). Existují ještě tzv. „orphan“ receptory (osiřelé receptory), u kterých je ligand neznámý (Privalsky, 2004). Jaderné receptory jsou složeny z pěti až šesti domén (A-F). Nejstabilnějšími z nich jsou domény vázající DNA (C) a vázající ligand (E). N-koncové oblasti A/B jsou různě dlouhé a podílí se na regulaci. Doména F není vždy přítomna a její funkce není zcela objasněna (Renaud *et al.*, 2000). Jaderné receptory inhibují nebo zesilují transkripci pomocí kofaktorů. Kofaktory, které aktivitu snižují, se nazývají korepresory a ty co zvyšují, koaktivátory (Gelman *et al.*, 2006; Horwitz *et al.*, 1999).

Rozhodujícím faktorem pro působení androgenů (dihydrotestosteronu či testosteronu) na tkáň prostaty je androgenový receptor (AR). Tento receptor se řadí do skupiny steroidních receptorů, má 919 aminokyselin. Gen pro AR se nachází na dlouhém raménku chromozomu X v poloze Xq11-12 a má přibližně 90 kb. Nachází se nejčastěji v epiteliálních buňkách prostaty. Bez navázaného ligandu se receptor nachází v neaktivní formě v cytoplasmě a jádře buněk v komplexu s proteiny teplotního šoku (hsp, „heat shock“ proteiny), které zabraňují změnám tvaru receptoru (Balk *et al.*, 2008). Navázání androgenu na receptor vede k odloučení hsp a způsobuje typickou změnu konformace v oblasti domény vázající ligand. Vytvořením komplexu

---

<sup>4</sup> receptor aktivovaný farnesolem



se receptor dostává do aktivní formy. Vazba ligandu s receptorem vyvolá jadernou translokaci a akumulaci receptoru. Chromatin se sdružuje na více místech, které řídí genovou expresi. Následně přibývají kofaktory, jež ovlivňují a zahajují genovou expresi, která může podpořit nádorový fenotyp (Heinlein a Chang, 2004). Působení androgenů v buňkách s AR spočívá ve zvýšení aktivity cyklin-dependentních kináz (CDK) a stimulaci vstupu buněk z G<sub>1</sub> fáze do S fáze buněčného cyklu, indukci signálů podporujících aktivitu G<sub>1</sub>/CDK a fosforylaci Rb (Balk *et al.*, 2008). Androgeny tak nepřímo ovlivňují metabolismus, proliferaci a diferenciaci tkáně prostaty a většinou působí stimulačně na sekreci růstových faktorů. V epiteliálních buňkách prostatických žlázek se pod vlivem androgenů tvoří množství růstových faktorů jako např. EGF (epithelial growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta), FbGF (fibroblast growth factor) nebo IGF-I, II (insulin-like growth factor; Culig *et al.*, 2000).

Buňky karcinomu prostaty jsou závislé na aktivitě AR z hlediska proliferace a přežití. AR hraje klíčovou roli u nádorů prostaty a v současné době je terapeutickým cílem léčby. Zablokování AR může zpomalit progresi karcinomu a sloužit k terapii pacientů s metastázemi nebo těch pacientů, kteří nemohou podstoupit radikální operaci. Z počátku je většina karcinomů prostaty na odstranění androgenů citlivá, ovšem u pacientů s pokročilým stádiem onemocnění již buňky androgen k proliferaci nepotřebují a pacienti tak nemohou být léčeni endokrinní terapií (Culig a Santer, 2014). A právě tyto změny AR v nádorových buňkách prostaty jsou spojovány se vznikem hormonální rezistence karcinomu prostaty (Schiewer *et al.*, 2012). Existuje celá řada experimentálních modelů buněčných linií, u kterých bylo *in vitro* prováděno studium signalizace AR ve vývoji a progresi karcinomu prostaty. Experimentální modely napodobují různá stádia karcinomu prostaty a tím vykazují rozdíly v expresi AR a schopnosti reagovat na androgeny (Sampson *et al.*, 2013).

Kromě androgenů se na růstu a vývoji předstojné žlázy podílí v malé míře i estrogény (Bonkhoff *et al.*, 1999). Vážou se na estrogenové receptory (ER), které se rozlišují na dva základní typy - estrogenový receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) a  $\beta$  (ER- $\beta$ ). Gen ER- $\alpha$  je umístěn na chromozomu 6q25.1 a kóduje protein tvořený 595 aminokyselinami. Gen ER- $\beta$  je lokalizován na chromozomu

14q22-25 a kóduje protein z 530 aminokyselin. ER představuje dimerický protein umístěný zejména na membráně buněčných jader. Vazbou hormonu na receptor dochází prostřednictvím fosforylace k oddělení proteinů teplotního šoku, následně se změní jeho konformace a receptor se dimerizuje s dalším receptorem. Tento dimer se poté naváže na specifické DNA sekvence přítomné v promotoru genů pro estrogen. Promotor s navázanými dimery vytvoří komplex s koregulačními proteiny, které mohou ovlivnit transkripci genů pro estrogény. Tyto geny hrají významnou úlohu během buněčné proliferace, apoptózy či angiogeneze. ER jsou exprimovány v různých tkáních. ER- $\alpha$  je exprimován zejména v děloze, ovariu, mléčné žláze, kardiovaskulárním systému, zatímco forma ER- $\beta$  je přítomna v mozku, močovém měchýři, varlatech, prostatě, plicích či kostech (Ikeda *et al.*, 2019). Oba receptory mohou být v rámci dané tkáně lokalizovány v různých buněčných subtypech. U buněk prostaty se ER- $\beta$  nachází zejména v epitelu buněk, zatímco ER- $\alpha$  převažuje v buněčném stromatu (Härkönen *et al.*, 2004; Weihua *et al.*, 2002). I když růst buněk karcinomu prostaty je závislý na působení androgenů, objevuje se stále více důkazů, že estrogény a ER mohou ovlivňovat vývoj prostaty i rozvoj karcinomu (Bonkhoff, 2018).

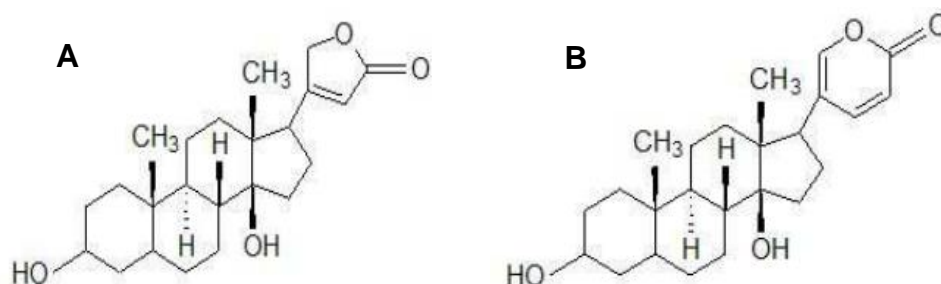
### 3.2 Srdeční glykosidy

Kardioaktivní či kardiotoxické glykosidy představují jednodílnou skupinu látek rostlinného i živočišného původu. Jsou významnými zástupci lidového léčitelství a v dnešní moderní medicíně jsou využívány taktéž (Patočka, 2008). Účinky srdečních glykosidů byly stručně popsány už v roce 1500 př. n. l. Egypťany a další zmínky pochází z konce 18. století od anglického botanika, chemika a lékaře Williama Witheringa (1785), který se zabýval léčivým účinkem listu náprstníku červeného (*Digitalis purpurea*) na srdce (Ziskind a Halioua, 2004). Extrakty srdečních glykosidů byly tradičně používány jako šípové jedy, v případě podvrtnutí či pohmoždění a odvodnění organismu (Mijatovic *et al.*, 2007; Steyn *et al.*, 1998). Rod *Digitalis* je pojmenován podle tvaru květů, jež připomínají náprstek. Zahrnuje dvouleté i vytrvalé byliny, ale také malé keře. Rostliny jsou rozšířeny v Evropě, severní Africe a západní Asii (Hollman, 1985). Srdeční glykosidy nalezneme i v běžných pokojových a dekorativních rostlinách jako vánoční hvězda

(prýšec nádherný), konvalinka, leknín a oleandr. Hlavní úlohou kardioglykosidů v rostlinách je ochrana proti škůdcům (Zalucki *et al.*, 2001). U živočišných druhů nalezneme srdeční glykosidy (bufogenin či bufotoxin) převážně u ropuch. Bylo také zjištěno, že sloučeniny podobné látkám odvozených od *Digitalisu* jsou obsaženy v savčích tkáních a tělesných tekutinách (Mijatovic *et al.*, 2007).

### 3.2.1 Chemická struktura

Z chemického hlediska se kardioglykosidy řadí mezi steroidní látky. Hlavním nositelem účinku glykosidů, tzv. aglykon, je steroid v kombinaci s cukernou složkou. Samostatně tyto složky kardiotoxické účinky nemají, účinné jsou pouze spolu. Cukernou složkou mohou být běžné cukry (D-glukóza), ale i jiné (6-deoxycukry, methylpentózy, 2,6-deoxycukry) a ke steranu jsou připojeny glykosidickou vazbou. Steroidní kardioaktivní glykosidy mají velké rozšíření a specificky působí na srdeční sval. Srdeční glykosidy rozdělujeme podle počtu, druhu a polohy substituentů, cukrů a dvojných vazeb. Chemicky je rozdělujeme na kardenolidy a bufadienolidy (obr. 6). Bufadienolidy jsou pojmenovány podle latinského názvu ropuchy obecné - *Bufo bufo* (Hollman, 1985). Aglykonem kardenolidů je derivát steranu, který v pozici 17 obsahuje pětičlenný  $\gamma$ -laktonový nenasycený kruh. Bufadienolid je také derivát steranu, jenž se liší přítomností šestičlenného  $\delta$ -laktonového kruhu. Důležitou roli má stereochemie, jejíž malá odměna může způsobit změnu biologické aktivity glykosidu (Hrdina *et al.*, 2004).



Obr. 6: Chemická struktura základních aglykonů srdečních glykosidů. Steroidní sloučeniny kardenolid (A) a bufadienolid (B). Převzato a upraveno z: Patočka, 2008.

### 3.2.2 Mechanismus účinku

Srdeční glykosidy mají schopnost vázat se na extracelulární povrch sodno-draselné pumpy a princip jejich působení je založen na její inhibici. Kontrakce

srdeční buňky je ovlivněna třemi složkami. První složkou je akční potenciál, který uvolňuje  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplazmy. Akční potenciál je vyvolán pohybem  $\text{Na}^+$  do buňky. Při následné depolarizaci dochází k otevření kanálů  $\text{Ca}^+$ , dále kanálů  $\text{K}^+$ , které jsou zodpovědné za návrat ke klidovému membránovému potenciálu. Druhou složkou je sarkoplazmatické retikulum, které  $\text{Ca}^{2+}$  uchovává v buňce a třetí složkou jsou kontraktilní proteiny. Ty generují kontrakci srdeční buňky za pomoci  $\text{Ca}^{2+}$  a adenosintrifosfátu (ATP). K posílení srdeční kontrakce je zapotřebí ovlivnit srdečním glykosidem alespoň jednu složku (Fozzard a Sheets, 1985). V roce 1957 Skou zjistil, že kardioglykosidy jsou schopné inhibovat sodno-draselnou pumpu. V krabím nervu prokázal přítomnost Na/K+-ATPázy, která je receptorem pro glykosidy. Při léčbě pacientů se srdečním selháním přispívá k účinnosti glykosidů snížená aktivace sympatického nervového systému (Hauptman *et al.*, 1999).

### 3.2.3 Protinádorová aktivita

Sloučeniny kardioglykosidů se používají převážně při léčbě srdečního městnavého selhání. Stenkvist v roce 1999 ve své studii popisuje účinnost užívání srdečních glykosidů u pacientek s karcinomem prsu. U žen užívajících srdeční glykosidy byla pozorována nižší úmrtnost. Díky tomuto poznatku vzrostl zájem výzkumu o objasnění protinádorové aktivity srdečních glykosidů. Bylo prokázáno, že kardioglykosidy indukují apoptózu v různých nádorových liniích. Je možné, že srdeční glykosidy nemění frekvenci rakoviny, ale mění se dogma života tím, že modifikuje invazivitu a schopnost metastázovat (Haux, 1999; Winnicka *et al.*, 2006). Po ovlivnění buněk rakoviny tlustého střeva bufalinem došlo k aktivaci autofagie a také k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Studie, kterou provedl Xie a kolektiv v roce 2011, otevírá možnost léčby kolorektálního karcinomu pomocí autofagie závislou na ROS. Bylo popsáno, že vazba srdečních glykosidů na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázu může aktivovat signálně transdukční cesty podílející se na regulaci růstu nádorových buněk (Dimas *et al.*, 2014). Cytotoxické mechanismy účinku těchto látek mohou zahrnovat inhibici dráhy  $\text{TNF-}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$  či inhibici DNA topoizomerázy II (Dimas *et al.*, 2014; Newman *et al.*, 2008). U některých kardioglykosidů byla prokázána aktivace signální dráhy prostřednictvím proteinkinázy Src, která by mohla negativní regulací

anti-apoptických proteinů vést k indukci apoptózy (Diederich *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2020). Src je nereceptorová proteinová tyrozinkináza, jež je součástí mnoha signalizačních drah a buněčných procesů, a narušení její regulace může způsobit řadu patologických změn v buňce. Je známo, že Src podporuje proliferaci prekancerózních buněk, reguluje buněčné adheze a invazi buněk v pokročilejších stádiích nádorové progresse. Mezi substráty Src patří proteiny fokální adheze, adaptorové proteiny i transkripční faktory. Právě tyto molekuly jsou předmětem zájmu mnoha studií, které se snaží odhalit rozdílné role Src v normálních a nádorových buňkách (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2014).

Bylo zjištěno, že některé formy srdečních glykosidů inhibují proliferaci a indukují apoptózu u nádorových buněk prostaty již v koncentracích použitelných v klinické praxi (Winnicka *et al.*, 2006). U pravidelných uživatelů digoxinu, kteří brali lék přes 10 let, bylo zjištěno nižší riziko výskytu karcinomu (Varbanov *et al.*, 2017). Protinádorové účinky srdečních glykosidů byly odhaleny u ouabainu u mamárních nádorových buněk (Kometiani *et al.*, 2004), u oleandrinu u maligního melanomu (Bao *et al.*, 2016), u bufalinu u solidních nádorů, včetně nádorů prsu (Dong *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015) a prostaty (Yu *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018), u digitoxinu u nádorových buněk prostaty (Dimas *et al.*, 2014; Haux *et al.*, 1999; Pollard *et al.*, 2019; Wimmicka *et al.*, 2006).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Přístroje a materiály

Experimentální část diplomové práce byla provedena pomocí uvedených přístrojů a materiálů.

#### 4.1.1 Přístrojové vybavení

V experimentální části diplomové práce byly použity následující přístroje.

Aparatura pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad
Autokláv	Microjet
Blotovací systém Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Centrifuga 3K30	Sigma
Centrifuga MR22i	Jouan
CO <sub>2</sub> inkubátor Heracell	Thermo Scientific
Elektroforetický zdroj MP-300V	Major Science
Flow-box s vertikálním prouděním vzduchu	Thermo Scientific
Fluorescenční mikroskop BX50F	Olympus
Odyssey Fc detekční systém	Li-Cor Biotechnology
Odsávací systém	Millipore
Průtokový cytometr BD FACSVersé™	Becton Dickinson
Spektrofotometr PowerWave XS	BIOTEK® Instruments
Stolní minicentrifuga MiniSpin	Eppendorf
Světelný mikroskop Eclipse TS100	Nikon
Termoblok AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet
Třepačka SHAKER S-3.16 L	SKYLine
Vakuová pumpa	Millipore
Vodní lázeň TW8	Julabo
Vortex MaXiMix™ II	Thermolyne

#### Výrobce/stát

Becton Dickinson Bioscience (USA), Bio-Rad (USA), BIOTEK® Instruments (USA), Li-Cor Biotechnology (USA), Eppendorf (Německo), Julabo (USA), Jouan (USA), Labnet (USA), Major Science (USA), Microjet (Taiwan),

Milipore (USA), Nikon (Japonsko), Sigma (USA), Olympus (Japonsko), SKYLine (Německo), Thermo Fisher Scientific (USA), ThermoLyne (USA)

#### 4.1.2 Použité chemikálie

V experimentální části diplomové práce byly použity následující chemikálie.

4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Aceton	Lachema
Akrylamid/bis-akrylamid 30% (AA+BIS)	Sigma-Aldrich
Amfotericin	Sigma-Aldrich
Bradfordovo činidlo	Bio-Rad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Serva
Deoxycholát sodný	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen
Ethanol 70%	Lachema
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma-Aldrich
Extrakt hovězí hypofýzy (BPE)	Life Technologies
Fetální bovinní sérum (FBS)	Invitrogen
Gentamycin	Sigma-Aldrich
Glutamin	Sigma-Aldrich
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
In-Cell ELISA Colorimetric Detection Kit	Thermo Scientific
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche
Inhibitor fosfatáz	Roche
Inhibitor proteáz	Roche
Methanol	Lachema
Mowiol	Calbiochem
MTT činidlo	Serva
N-Butanol	Lachema
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich
Penicilin	Sigma-Aldrich
Peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Propidium jodid	Sigma-Aldrich

Proteinový marker (Full-Range rainbow)	Amersham
Pyruvát sodný	Sigma-Aldrich
RNasa A	Qiagen
RPMI 1640	Sigma-Aldrich
SFM médium	Life Technologies
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
Tris(hydroxymethyl)aminometan (TRIS)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich
Tween 20	Serva

### **Výrobce/stát**

Amersham (Velká Británie), Bio-Rad (USA), Calbiochem (USA), Invitrogen (USA), Lachema (ČR), Life Technologies (USA), Qiagen (Německo), Roche (Německo), Serva (Německo), Sigma-Aldrich (USA), Thermo Scientific (USA)

### **4.1.3 Použité roztoky**

V experimentální části diplomové práce byly použity následující roztoky.

**1,5% agaróza:** 1,5 g agarózy/100 ml DMEM

**1,5 M TRIS/HCl pH 8,8:** 18,17 g TRIS/100 ml H<sub>2</sub>O, upravit pH pomocí HCl na pH 8,8

**10% APS:** 0,1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>/1 ml H<sub>2</sub>O

**10% DMEM:** 10% fetální bovinní sérum FBS (v/v), 2 mM L-glutamin, penicilin (1 U/ml), streptomycin (1 U/ml)

**10% RPMI:** 10% fetální bovinní sérum FBS (v/v), 2 M L-glutamin, 1 mM pyruvát sodný, penicilin (1 U/ml), streptomycin (1 U/ml)

**10% SDS:** 5g SDS/ 50 ml H<sub>2</sub>O

**1M TRIS/HCl pH 6,8:** 12,11 g TRIS/100 ml H<sub>2</sub>O, upravit pH pomocí HCl na pH 8,8

**20% transferový pufr:** 5,8 g glycin; 11,6 g TRIS; 0,74 g TRIS; 400 ml methanol/2 l H<sub>2</sub>O



**4% paraformaldehyd:** 20 g PFA do 450 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 ml filtrovaného 10x TBS

**5x elektroforetický pufr:** 15,1 g TRIS; 5,09 g SDS; 72 g glycin/ 1l H<sub>2</sub>O

**4x Laemliho pufr s  $\beta$ -merkaptoethanolem:** 3,5 ml H<sub>2</sub>O; 0,5 ml 1M TRIS pH 6,8; 1,6 ml glycerolu; 1,6 ml 10% SDS; 0,4 ml 0,5% bromfenolová modř, 0,4 ml  $\beta$ -merkaptoethanol

**Médium pro sféroidy** (DMEM/F-12, 3:1; 0,2 $\times$  supplement B27 bez vitaminu A; 10 ng/ml EGF; 0,4% BSA – hovězí sérový albumin)

**Mowiol:** 2,4 g mowiol; 6 g glycerol; 6 ml H<sub>2</sub>O; 12 ml 0,2 TRIS pH 8,5

**PBS 10x:** 160 g NaCl; 4 g KCl; 64,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 12 H<sub>2</sub>O; 4g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/2 l H<sub>2</sub>O, upravit na pH 7,4

**Permeabilizační roztok:** 0,1% Triton X-100 a 0,1% citrát sodný v PBS

**RIPA pufr:** 8,33 ml 0,3 M TRIS-HCl pH 8,0; 0,44 g NaCl; 0,5 ml Nonidet P-40; 0,5 ml 10% SDS; 2,5 ml 10% deoxycholát sodný doplnit do 50 ml H<sub>2</sub>O, před použitím přidat inhibitory proteáz a fosfatáz

**SFM médium:** BPE (0,05 mg/ml), EGF (5 ng/ml), penicilin (1 U/ml), streptomycin (1 U/ml), amfotericin B (1 U/ml), gentamycin (0,5 U/ml)

**TBS 1x:** 8,72 g NaCl; 1,22 g TRIS base/ 1 l H<sub>2</sub>O; upravit na pH 6,8

#### 4.1.4 Použité protilátky

V experimentální části diplomové práce byly použity následující protilátky.

##### Primární protilátky

Tab. 1: Přehled primárních protilátek.

protilátka	klon	zdroj	Ředění WB, ICE/IF	výrobce
AR	N-20	králík	1:200/1:50	Santa Cruz
Bcl-2	N-19	králík	1:200	Santa Cruz
Bcl-X <sub>L</sub>	H-62	králík	1:100	Santa Cruz
Bid	-	králík	1:1000	Cell Signaling
cas-3	-	králík	1:1000	Cell Signaling
CDK4	DCS-31	myš	1:200	Santa Cruz
cyklin A	H432	králík	1:200	Santa Cruz
cyklin B <sub>1</sub>	GNS1	myš	1:1000	Cell Signaling

<b>cyklin D<sub>1</sub></b>	72-13G	myš	1:100	Santa Cruz
<b>cyklin E</b>	He12	myš	1:200	Santa Cruz
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	D-12	myš	1:200/1:50	Santa Cruz
<b>ER-<math>\beta</math></b>	F-10	myš	1:100/1:50	Cell Signaling
<b>mcm-7</b>	141.2	myš	1:500	Santa Cruz
<b>p16</b>	JC8	myš	1:100	Santa Cruz
<b>p21</b>	12D1	králík	1:1000	Cell Signaling
<b>p53</b>	-	králík	1:800	Cell Signaling
<b>PARP</b>	46D11	králík	1:800	Cell Signaling
<b>pRb</b>	S807/811	králík	1:1000	Cell Signaling
<b>Rb</b>	4H1		1:1000	Cell Signaling
<b>Src</b>	-	králík	1:1000	Cell Signaling

### Sekundární protilátky

Tab. 2: Přehled sekundárních protilátek.

<b>protilátka</b>	<b>zdroj</b>	<b>ředění</b>	<b>výrobce</b>
<b>HRP mouse anti-rabbit Ig</b>	králičí proti myším Ig	1:6000	Cell Signaling
<b>HRP rabbit anti-goat Ig</b>	kozí proti králičím Ig	1:6000	Cell Signaling
<b>Alexa Fluor 594</b>	kozí proti myším Ig	1:1000	Life Technologies
<b>Alexa Fluor 488</b>	kozí proti králičím Ig	1:1000	Life Technologies

### Výrobce/stát

Cell Signaling (USA), Life Technologies (USA), Santa Cruz (USA)

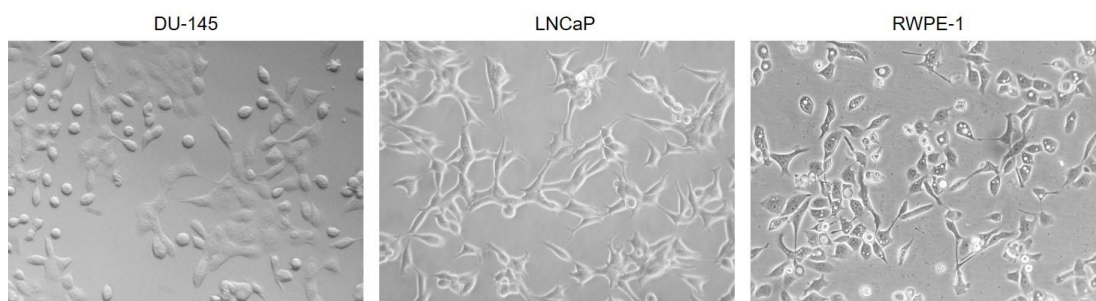
### 4.1.5 Použité buněčné linie

Experimenty byly provedeny na adherentních buněčných liniích DU-145 a LNCaP odvozených od karcinomu prostaty a na RWPE-1 nenádorových prostatických buňkách (obr. 7). Všechny tři buněčné linie byly získány od American Type Culture Collection (ATCC, USA). Každá z použitých adherentních buněčných linií má specifické požadavky pro svou kultivaci. Veškeré úkony byly provedeny ve sterilních podmínkách ve flow-boxu s vertikálním prouděním vzduchu (Thermo Scientific, USA).

Buňky DU-145 byly kultivovány v médiu DMEM (Eaglovo médium modifikované dle Dulbecco, Invitrogen) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (FBS, Invitrogen), 2 mM L-glutamin (Sigma), antibiotika penicilin

(1 U/ml, Invitrogen) a streptomycin (1 U/ml, Invitrogen). Buňky LNCaP byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Sigma), které obsahovalo 10% FBS, 2 M L-glutamin, 1 mM pyruvát sodný (Sigma) a příslušná antibiotika penicilin (1 U/ml) a streptomycin (1 U/ml). K pasážování obou nádorových linií byl použit 0,25% trypsin-EDTA (Sigma). Nenádorové buňky RWPE-1 byly kultivovány v médiu SFM (serum-free medium, Life Technologies) s přidavkem extraktu hovězí hypofýzy (BPE, 0,05 mg/ml, Life Technologies), epidermálního růstového faktoru (EGF, 5 ng/ml, Life Technologies), antibiotik penicilinu, streptomycinu, amfotericinu B (1 U/ml, Sigma) a gentamycinu (0,5 U/ml, Sigma). Při pasáži byl použit 0,05% trypsin-EDTA (Sigma) a pro zastavení jeho působení byl použit blokovací roztok 2% FBS ve fosfátovém pufru (PBS).

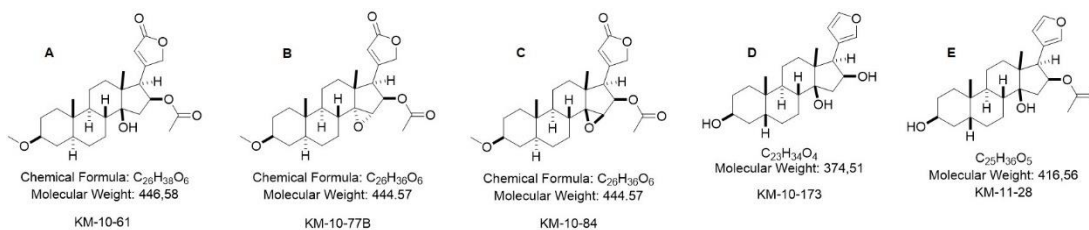
Kultivace probíhala v kultivačních láhvích (Techno Plastic Products, TPP, Švýcarsko) v inkubátoru (Thermo Scientific, USA) při 37 °C v atmosféře obsahující 5% oxidu uhličitého a 100 % vlhkosti. Pasáž buněk byla provedena dle potřeby buněk tak, aby nebyly stresovány nedostatkem místa v kultivační lahvi a výměnou čerstvého média jim bylo dodáno dostatečné množství živin pro jejich růst.



**Obr. 7: Morfologie buněk lidských nádorových prostatických buněčných linií DU-145 a LNCaP a lidské nenádorové prostatické buněčné linie RWPE-1. Zvětšení 20x.**

#### **4.1.6 Testované deriváty srdečních glykosidů**

Deriváty srdečních glykosidů byly dodány Laboratoří růstových regulátorů PŘF UP v Olomouci. Strukturální vzorce testovaných glykosidů znázorňuje obrázek 8. Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO, Sigma) na 10 mM zásobní koncentraci. Požadované koncentrace testovaných látek byly připraveny přidáním zásobních roztoků do příslušného média.



**Obr. 8: Strukturní vzorce testovaných derivátů srdečních glykosidů. (A) KM-10-61, (B) KM-10-77B, (C) KM-10-84, (D) KM-10-173, (E) KM-11-28.**

## 4.2 Metody

K vypracování experimentální části diplomové práce byly použity níže popsané metody.

### 4.2.1 Test buněčné viability (MTT test)

MTT test se používá ke stanovení závislosti účinku koncentrace testovaných látek na buněčnou viabilitu. K testu životaschopnosti buněk byly použity buněčné linie DU-145, LNCaP a RWPE-1. Každá buněčná linie byla po inkubaci sklizena příslušným trypsinem (0,25% nebo 0,05%), buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a dle výpočetního vztahu bylo určeno množství buněk v 1 ml. Jednotlivé buněčné linie byly poté nasazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček (TPP, Švýcarsko). Množství jednotlivých druhů buněk bylo stanoveno různě, v závislosti na jejich rychlosti růstu a adherence. Buněk DU-145 bylo vysazeno 4 500 na jamku ve 100  $\mu$ l kultivačního média, buněk LNCaP bylo vysazeno 5 000 na jamku v 80  $\mu$ l kultivačního média a buněk RWPE-1 bylo vysazeno 10 000 na jamku ve 100  $\mu$ l kultivačního média. Buňky byly inkubovány dle standartních podmínek dle potřeb buněk (24 nebo 48 hodin).

Po uplynutí příslušného času inkubace bylo připraveno nové médium obsahující testovanou látku. Byla připravena sestupná testovací koncentrační řada. Staré médium bylo odsáto a aplikováno bylo médium čerstvé obsahující testovanou látku, které působilo na buňky 48 h. V případě buněčné linie LNCaP se médium neodsávalo, pouze se přidalo médium čerstvé obsahující testovanou látku. V případě kontrolních buněk bylo do kultivačního média přidáno DMSO, jehož koncentrace v médiu nepřesáhla 0,3 %. Po inkubaci buněk s testovanou látkou bylo do každé jamky přidáno 10  $\mu$ l 0,5% činidla MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid, Serva). Přidáním žlutého MTT činidla došlo u metabolicky aktivních

buněk ke vzniku fialových krystalů formazanu, které byly rozpuštěny ve 100  $\mu$ l 10% SDS (dodecylsulfát sodný, Serva).

Za 24 hodin byla pomocí spektrofotometru PowerWave XS (BIOTEK®Instruments, USA) změřena absorbance roztoku při vlnové délce 570 nm, jež přímo úměrně korelovala s počtem vitálních buněk. Na základě testu byla určena koncentrace  $IC_{50}$ , která inhibuje buněčnou viabilitu z 50 % po inkubaci buněk s testovanými látkami.

#### **4.2.2 Kultivace 3D buněčných sféroidů v přítomnosti testovaných látek**

Vhodný experimentální model je základem pro správné pochopení biologie nádorových onemocnění a pro identifikaci účinných protinádorových léčiv. Běžně používané monovrstvy nádorových buněk jsou sice dobře zavedeným a finančně dostupným experimentálním modelem, ale postrádají důležité biologické vlastnosti, které ovlivňují odpověď buněk na léčbu. Použitím 3D buněčných modelů ve výzkumu a vývoji protinádorových léčiv lze získat *in vitro* experimentální model, jenž věrněji napodobuje situaci *in vivo*. Studium biologických vlastností buněk 3D sféroidů a jejich odpovědí na účinky léčiv odhaluje rozdíly ve srovnání s 2D kulturami, proto by se hodnocení účinku potenciálních protinádorových léčiv na 3D buněčných modelech mohlo stát standardní součástí preklinického testování (Barchánková *et al.*, 2019). Pro kultivaci 3D buněčných sféroidů musely být nejdříve upraveny 96-jamkové mikrotitrační destičky. Ve sterilní lahvičce obsahující médium DMEM, byla rozpuštěna agaróza o výsledné koncentraci 1,5%. Připravený roztok byl následně sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Roztok 1,5% agarózy byl ještě horký za sterilních podmínek pipetován do mikrotitračních jamek. Objem roztoku byl 50  $\mu$ l na jamku.

Do připraveného panelu s 1,5% agarózou bylo po vychladnutí aplikováno do každé jamky 3000 buněk v případě všech tří linií, které byly inkubovány v tzv. médiu pro sféroidy (DMEM/F-12, 3:1, Invitrogen; 0,2 $\times$  supplement B27 bez vitamínu A, Invitrogen; 10 ng/ml EGF, Sigma; 0,4% BSA - hovězí sérový albumin, Sigma). Kultivační panely byly po nanesení buněk centrifugovány při laboratorní teplotě a 1000  $\times$  RPM po dobu 10 minut. Následně bylo k buňkám přidáno 50  $\mu$ l čistého média. Po jednodenní inkubaci byly buňky ovlivněny testovanou látkou o koncentracích

25  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$ . V případě kontrolních buněk bylo do kultivačního média přidáno DMSO, jehož koncentrace v médiu nepřesáhla 0,3 %. Vzniklé buněčné sféroidy byly kontrolovány a foceny 1., 7. a 14. den po ovlivnění a účinek testované látky byl porovnán s kontrolními sféroidy.

#### **4.2.3 Průtoková cytometrie**

Pro analýzu buněčného cyklu byly adherentní buněčné linie DU-145 a LNCaP kultivovány ve sterilních Petriho miskách o průměru 60 mm (TPP, Švýcarsko). Buněčná linie DU-145 byla vysazená v počtu  $3 \times 10^5$  buněk a buněčná linie LNCaP v počtu  $3,5 \times 10^5$  buněk. Buňky byly následující den ovlivněny testovanou látkou v koncentraci  $\text{IC}_{50}$  na 24 h a 48 h. V případě kontrolních buněk bylo do kultivačního média přidáno DMSO, jehož koncentrace v médiu nepřesáhla 0,3 %.

Skližení buněk bylo následně provedeno pomocí trypsinizace. Veškeré kultivační médium bylo odsáno, miska byla 2x promyta 3 ml PBS a pro uvolnění adherentních buněk ze dna misky byl na 5 minut aplikován 0,25% trypsin-EDTA. Dno misky s buňkami bylo opláchnuto příslušným médiem a vzniklá suspenze byla přenesena do zkumavky s kónickým dnem. Buněčná suspenze byla centrifugována 10 min při 4 °C a  $1500 \times \text{RPM}$ . Vzniklý supernatant byl odsán a pelet opatrně resuspendován ve 3 ml PBS. Buněčná suspenze byla opět centrifugována za stejných podmínek. Vzniklý supernatant byl opět odsán a pelet rozpuštěn v 50  $\mu\text{l}$  PBS a následně jemně promíchán, aby byly získány samostatné buňky. Ke vzorkům byl za neustálého jemného míchání přikapáván vychlazený 70% ethanol (Lachema) o celkovém objemu 1 ml. Ethanol způsobí permeabilizaci membrány, což poté umožní DNA sondě proniknout do buňky. Zafixované buňky byly uloženy do dalšího zpracování na -20 °C.

Pro finální analýzu buněčného cyklu byly vzorky nejdříve centrifugovány při 4 °C,  $1000 \times \text{G}$ , po dobu 10 minut. Supernatant byl odpipetován, buňky byly promíchány v 3 ml PBS obsahující 2 % FBS a ponechány 10 minut na ledu. Poté byly buňky centrifugovány při 4 °C, 5 minut při  $1200 \times \text{RPM}$  a byl odstraněn supernatant. Vzniklý pelet byl resuspendován v 50  $\mu\text{l}$  PBS s 0,2 mg/ml RNasy A (Qiagen) a přenesen do

mikrozkumavky. Připravený vzorek byl inkubován ve vodní lázni 15 minut při 37 °C. Dále bylo přidáno 200 µl propidium jodidu (100 µg/ml, Sigma) a proběhla inkubace po dobu 15 minut na ledu a ve tmě. Vzorky byly následně analyzovány průtokovým cytometrem BD FACSVerser™ (Becton Dickinson Bioscience, USA) na základě excitace DNA sondy a emise záření odpovídající množství DNA v buňce. Zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ovlivnění testovanou látkou bylo porovnáváno s buňkami kontrolními.

#### **4.2.4 Western blot analýza**

Buněčné linie byly nasazeny do kultivačních Petriho misek o průměru 100 mm (TPP, Švýcarsko). Buňky DU-145 byly nasazeny v celkovém množství  $7 \times 10^5$  buněk do média DMEM a buněk LNCaP bylo nasazeno více, konkrétně  $9 \times 10^5$  buněk do kultivačního média RPMI 1640. Po inkubaci byly buňky ovlivněny testovanou látkou v koncentraci  $IC_{50}$  po dobu 24 a 48 hodin. V případě kontrolních buněk bylo do kultivačního média přidáno DMSO, jehož koncentrace nepřesáhla 0,3 %. Po uplynutí inkubace buněk s testovanou látkou bylo médium odsáto, byl proveden oplach buněk roztokem PBS. Připravené misky byly uchovány při teplotě -80 °C do dalšího zpracování.

Aby nedošlo ke zbytečné denaturaci proteinů, byly všechny kroky při sklizení buněk prováděny na ledě. Vychlazená na 4 °C musela být i centrifuga a použité roztoky. Pomocí sterilní škrabky byly z celé plochy misek seškrábány buňky do sterilních mikrozkumavek. Při škrábání byl použit lyzační pufr (0,3 M TRIS/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% NONIDET P-40 (Sigma); 10% SDS; 10% deoxycholát sodný (Sigma) v deionizované vodě), ke kterému byly těsně před aplikací přidány inhibitory proteáz (7x koncentrovaný roztok, Roche) a fosfatáz (10x koncentrovaný roztok, Roche) ve formě tablet. Množství lyzačního roztoku bylo zvoleno na základě množství buněk na misce. Získané vzorky byly za účelem lyzace jejich membrány a uvolnění proteinů do pufru inkubovány po dobu 60 minut na ledu a každých 10 minut byly vortexovány. Vzorky byly poté centrifugovány při  $20\,000 \times$  RPM, 4 °C; 30 minut. Vzniklý supernatant byl pipetou odsán a přenesen do čistých mikrozkumavek.

Ke zjištění koncentrace proteinů byla použita Bradfordova metoda. Byl připraven roztok Bradfordova činidla (Sigma) s deionizovanou vodou (1:4). Do každé mikrokumavky byl napipetován 1 ml připraveného činidla a 1  $\mu$ l vzorku. Následně byly přichystány standardy, u kterých byl použit hovězí sérový albumin (BSA, 1 mg/ml; Sigma) v koncentrační řadě 0,5  $\mu$ l; 1,0  $\mu$ l; 2,0  $\mu$ l a 5,0  $\mu$ l na 1 ml Bradfordova činidla. Jako blank bylo použito činidlo. Blank, hotové vzorky a standardy byly v tripletech napipetovány do 96-jamkového mikrotitračního panelu. Na spektrofotometru PowerWave XS při vlnové délce 595 nm byla změřena absorbance proteinů. Podle nejmenší hodnoty absorbance a na základě kalibrační křivky standardů byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích. K lyzátům byl přidán 4x koncentrovaný Laemmliho LSB pufr (1M TRIS pH 6,8; glycerol; 10% SDS;  $\beta$ -merkaptoethanol, Sigma; 0,5% bromfenolová modř). Na závěr byl k získání stejného objemu všech vzorků přidán 1x koncentrovaný LSB pufr. LSB pufr obsahuje SDS, který působí jako detergent a dává všem proteinům stejný záporný náboj. Při elektroforéze poté dochází k migraci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Připravená koncentrace proteinů ve vzorcích byla 15,5  $\mu$ g/10  $\mu$ l. Vzorky byly 2 minuty zahřáty na 96 °C na termobloku AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet) a uloženy do -20 °C.

Samotné polyakrylamidové gelové elektroforéze předcházela příprava elektroforetické aparatury, elektroforetického pufru a příprava polyakrylamidového gelu. Při práci bylo důležité nespěchat, správně sestavit elektroforetickou komůrku a nechat dostatečně ztuhnout gel. K separaci proteinů byl použit 12% dělicí gel a 10% zaostřovací gel (tab. 3). Jako první byl nanesen dělicí gel, který tuhnul přibližně 45 minut. Aby byl přechod dělicího a zaostřovacího gelu rovný a bez vzduchových bublin, byl přikápnut N-butanol (Lachema). Po ztuhnutí gelu a odstranění butanolu byl připraven zaostřovací gel, do kterého byl ihned po napipetování vložen 15-jamkový hřebínek. Zaostřovací gel se používá ke sjednocení pohybu vzorků. Po 20 minutách byl zaostřovací gel ztuhlý, hřebínek vytažen a gel byl připraven k použití. Byla sestavena elektroforetická aparatura naplněná elektroforetickým pufrům. Do krajních jamek byl nanášen pouze LSB pufr. Pro určení molekulové hmotnosti byl použit molekulový marker Full-Range Rainbow (Amersham). Všechny vzorky byly před nanesením postupně



zahřáty na 96 °C a nanášeny směrem zleva doprava. Pro separaci proteinů bylo nastaveno napětí 120 V na přibližně 100 minut. Separaci proteinů bylo důležité sledovat, aby byla elektroforéza včas zastavena a nedošlo ke ztrátě potřebných proteinů. Po ukončení elektroforézy byl odstraněn zaostřovací gel.

**Tab. 3: Množství chemikálií potřebných pro přípravu 2 polyakrylamidových gelů (12% dělicího a 10% zaostřovacího)**

<b>Chemikálie</b>	<b>12% dělicí gel</b>	<b>Chemikálie</b>	<b>10% zaostřovací gel</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,3 ml	<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,4 ml
<b>AA+Bis</b>	4,0 ml	<b>AA+Bis</b>	830 µl
<b>1,5 M TRIS pH 8,8</b>	2,5 ml	<b>1 M TRIS pH 6,8</b>	630 µl
<b>10% SDS</b>	100 µl	<b>10% SDS</b>	50 µl
<b>10% APS</b>	100 µl	<b>10% APS</b>	50 µl
<b>TEMED</b>	4 µl	<b>TEMED</b>	5 µl

Gel byl na 40 minut přenesen do transferového pufru (39 mM glycin; 48 mM TRIS-báze; 0,037% SDS a 20% methanol) a za mírných otáček třepán na třepačce. Následně byl seskládán tzv. blotovací sendvič složený z vlhkého filtračního papíru, nitroceluloseové membrány, gelu a uzavřen vlhkým filtračním papírem. Byl proveden přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu pomocí blotovacího systému Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) při napětí 10 V po dobu 45 minut. Po přenosu byla membrána obarvena roztokem Ponceau S (Sigma) po dobu 5 minut, který vizualizoval přenesené proteiny, opláchnuta v destilované vodě a vysušena pro další práci.

Nitrocelulózová membrána byla na základě molekulových hmotností proteinů nařezána na proužky. Aby byla odbourána místa, kde nebyly navázány proteiny a nedošlo tak k nespecifickým vazbám, byly proužky opláchnuty v PBS a blokovány v 5% blokovacím mléku (sušené odtučněné mléko Laktino, 1,3 % tuku, PML; PBS; 0,1% Tween 20, Sigma), příp. 5% BSA naředěném v TBS-T (0,01 mM TRIS; 0,0137 mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 7,6) nejméně 2 hodiny. Na připravené proužky byly nanášeny příslušné primární protilátky (tab. 1) naředěné v 5% mléku (sušené odtučněné mléko 1,3 % tuku; PBS), příp. v 5% BSA naředěném v TBS (0,01 mM TRIS; 0,0137 mM NaCl; 0,1%; pH 7,6). Inkubace protilátek proběhla přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C. Druhý den byly proužky hodinu promývány na

kývačce za účelem odmytí nenavázané primární protilátky. Promývací roztok PBS s Tweenem (příp. v TBS-T) byl každých 15 minut vyměněn za čistý. Proběhla 45 minutová inkubace se sekundární protilátkou (tab. 2) při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Následně opět proběhlo odmytí sekundární protilátky po dobu 60 minut v promývacím roztoku PBS s Tweenem (příp. v TBS-T). Roztok byl každých 15 minut vyměněn za čistý. Nyní byly proužky připraveny k detekci za pomoci chemiluminiscenčního systému DURO (1:1; Amersham), popř. FEMTO (1:1; Amersham). Křenová peroxidáza navázaná na sekundární protilátku reaguje s chemiluminiscenčním substrátem a enzymaticky jej štěpí na nestabilní produkt. Stabilizaci tohoto produktu provází vyzáření světla, čímž vzniká chemiluminiscenční signál. Tento signál představuje úměrné množství navázaného enzymu, které je přímo úměrné množství detekovaného proteinu. Detekční signál byl zaznamenán pomocí systému Odyssey Fc (Li-Cor Biotechnology).

#### **4.2.5 In Cell ELISA (ICE)**

Metoda ICE se používá pro detekci a kvantifikaci intracelulárních proteinů přímo v buňkách. K testování byl použit detekční kit (Pierce Colorimetric In-Cell ELISA kit, Thermo Scientific).

Pro detekci bylo na 96-jamkovou mikrotitrační destičku nasazeno v případě buněčné linie DU-145 8 000 buněk/jamka/100  $\mu$ l DMEM média, v případě buněčné linie LNCaP 10 000 buněk/jamka/100  $\mu$ l RPMI média. Následně byly buňky ovlivněny testovanou látkou v koncentraci  $IC_{50}$  po dobu 24 a 48 hodin.

U buněk DU-145 bylo médium po inkubaci odsáno, buňky byly promyty PBS. Buňky LNCaP promývány pomocí PBS nebyly, jelikož docházelo k jejich nadměrné ztrátě. Buňky byly následně fixovány 4% paraformaldehydem po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byl PFA odsán a řádně vysušené panely byly umístěny do  $-20$  °C pro další použití.

Detekce probíhala podle protokolu výrobce. Nejdříve byla destička 2x promyta pomocí roztoku TBS (100  $\mu$ l/jamka). Po promytí následovala aplikace 100  $\mu$ l permeabilizačního pufru (TBS, Thermo Scientific™ Surfact-

Amps™ X-100 Detergent) na jamku na 15 minut při laboratorní teplotě. Destička byla opět promyta TBS (100 µl/jamka), roztok byl odsán a na 20 minut bylo přidáno 100 µl na jamku 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který působil při laboratorní teplotě. Po odsátí následovalo promytí pomocí TBS (100 µl/jamka) a na 30 minut bylo pipetováno 100 µl na jamku blokovacího pufru. Po uplynuté době byl blokovací pufr odsán a bylo aplikováno 50 µl primární protilátky (tab. 1) naředěné v promývacím (TBS, Surfact-Amps 20 Detergent) a blokovacím pufru (1:1). Inkubace primární protilátky probíhala přes noc v lednici při 4 °C ve tmě. Jako negativní kontrola sloužila aplikace roztoku složeného z promývacího a blokovacího pufru (1:1) bez přidané protilátky.

Detekce pokračovala další den a byla zahájena odsátím primární protilátky z jamek a důkladným omytím promývacím pufrům celkem 3x. Po osušení destičky bylo do jamek na 30 minut napipetováno 50 µl na jamku HRP značeného konjugátu. Po inkubaci se destička celkem 5x promyla pomocí promývacího roztoku (200 µl/jamka) a vysušila. Do jamek bylo aplikováno 50 µl TMB substrátu, který na buňky působil 15 minut ve tmě. Nyní bylo důležité roztok neodsát a přidat k němu 50 µl TMB roztoku, jenž způsobil zastavení reakce a změnu zbarvení roztoku z modré na žlutou. Takto připravená destička se vzorky byla nachystána na měření absorbance při vlnové délce 450 nm na spektrofotometru PowerWave XS (BIOTEK®Instruments). Po detekci pokračovala práce s destičkou promytím jamek destilovanou vodou a následně bylo aplikováno 50 µl Janus Green na 5 minut. Tato barvička umožní obarvení všech buněk v jamce a slouží tak pro kontrolu množství buněk po ovlivnění testovanou látkou vzhledem ke kontrolním buňkám. Panel byl opět promyt destilovanou vodou až do vymytí zelené barvičky. Do čistého a suchého panelu bylo přidáno 50 µl elučního pufru na jamku na 10 minut. Po uplynuté době byla změřena absorbance roztoku na spektrofotometru PowerWave XS při vlnové délce 615 nm. Výsledkem je porovnání relativní exprese sledovaného proteinu u ovlivněných buněk testovanou látkou s buňkami kontrolními vzhledem k celkovému počtu buněk.

#### **4.2.6 Fluorescenční imunocytochemická detekce**

Do kultivačních Petriho misek o průměru 60 mm (TPP, Švýcarsko) byla vložena sterilní kulatá krycí sklíčka, na která byly nasazeny buňky DU-145 (v počtu  $3,5 \times 10^5$  buněk) a LNCaP (v počtu  $3,4 \times 10^5$  buněk). Po inkubaci došlo k odsátí starého média, opláchnutí buněk pomocí PBS a ovlivnění buněk testovanou látkou, jenž byla naředěna do nového média na stanovenou koncentraci dle  $IC_{50}$ . Ovlivnění buněk probíhalo po dobu 24 a 48 hodin.

Po ovlivnění bylo médium s látkou odsáto a buňky byly promyty PBS a fixovány vychlazeným roztokem aceton/methanol (1:1) po dobu 10 minut. Po fixaci byly buňky zavodněny pomocí PBS a blokovány pomocí 1% BSA při pokojové teplotě 30 minut. Na sklíčko bylo následně nanášeno 80  $\mu$ l primární protilátky (tab. 1). Její inkubace proběhla ve tmě ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Po promytí pomocí PBS byla nanášena fluorescenčně značená sekundární protilátka (Alexa Fluor 594 nebo Alexa Fluor 488, Life Technologies, USA) v množství 90  $\mu$ l na sklíčko po dobu 90 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po promytí pomocí PBS byla všechna buněčná jádra dobarvena 100  $\mu$ l 50  $\mu$ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol; Sigma) 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po promytí v PBS a následně v deionizované vodě byla sklíčka namontována na podložní skla pomocí vodného média mowiolu (Calbiochem). Detekce byla provedena na fluorescenčním mikroskopu BX50F (Olympus, Japonsko), kde byla porovnána exprese a lokalizace jaderných receptorů v buňkách kontrolních a ovlivněných testovanými látkami.

#### **4.2.7 TUNEL assay**

Metoda TUNEL byla použita pro detekci apoptotických buněk u prostatických nádorových buněk DU-145 a LNCaP po ovlivnění testovaným derivátem KM-10-77B. Principem metody je vazba enzymu TdT na volné 3'-OH konce DNA, kde tento enzym syntetizuje polymer obsahující fluorescenčně značený deoxynukleotid. Buňky byly pro tuto detekci připraveny na kulatá krycí sklíčka stejným způsobem jako pro fluorescenční barvení (viz 4.2.6) a fixovány vychlazeným roztokem aceton/methanol (1:1) po dobu 10 minut. Před samotnou detekcí byla připravená skla s buňkami zavodněna pomocí PBS

a inkubována ve vychlazeném permeabilizačním roztoku (0,1% Triton X-100 a 0,1% citrát sodný v PBS) po dobu 2 minut při 4°C. Poté byla skla opláchnuta v PBS a byla na ně aplikována reakční směs (In Situ Cell Death Detection KIT, Roche) složená z enzymu terminální deoxynukleotidyl transferázy (TdT) a tunel značící směsi fluorescenčně označených nukleotidů v poměru 1:9. Inkubace probíhala při 37°C po dobu 60 minut ve tmě. Poté byla skla opět opláchnuta pomocí PBS a jádra buněk dobarvena 50 µg/ml DAPI po dobu 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po oplachu deionizovanou vodou byla skla zamontována do vodného média mowiol a byla provedena analýza na fluorescenčním mikroskopu BX50F, kdy byl počítán poměr zelených TUNEL pozitivních jader k všem modrým buněčným jádrům obarvených pomocí DAPI. Na každém sklíčku bylo hodnoceno minimálně 150 až 200 buněk.

#### **4.2.8 Statistické zpracování dat**

Všechny experimenty byly minimálně třikrát nezávisle zopakovány. Z každé série dat byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno Studentovým t-testem a v programu MS Excel 2019 (Microsoft, USA).

## 5 VÝSLEDKY

Ke studiu derivátů srdečních glykosidů byly použity dvě lidské adherentní buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty DU-145 a LNCaP. Jejich účinek byl porovnáván s účinkem látek na nenádorovou prostatickou buněčnou linii RWPE-1. Účinky byly sledovány za pomoci sedmi laboratorních metod. MTT test byl použit za účelem stanovení koncentrace IC<sub>50</sub>, která inhibuje buněčnou viabilitu z 50 % po inkubaci buněk s testovanou látkou. Byl pozorován vliv testované látky na integritu sféroidů, byl sledován buněčný cyklus za pomoci průtokové cytometrie, Western blot analýzy a ICE. Byla detekována exprese anti- a pro- apoptotických proteinů prezentující apoptózu na základě Western blot analýzy a ICE a metodou TUNEL. Dále byla sledována lokalizace a exprese proteinů receptorů pro steroidní hormony pomocí fluorescenční imunocytochemické detekce, Western blot analýzy a metodou ICE.

### 5.1 Vliv derivátů srdečních glykosidů na viabilitu buněk

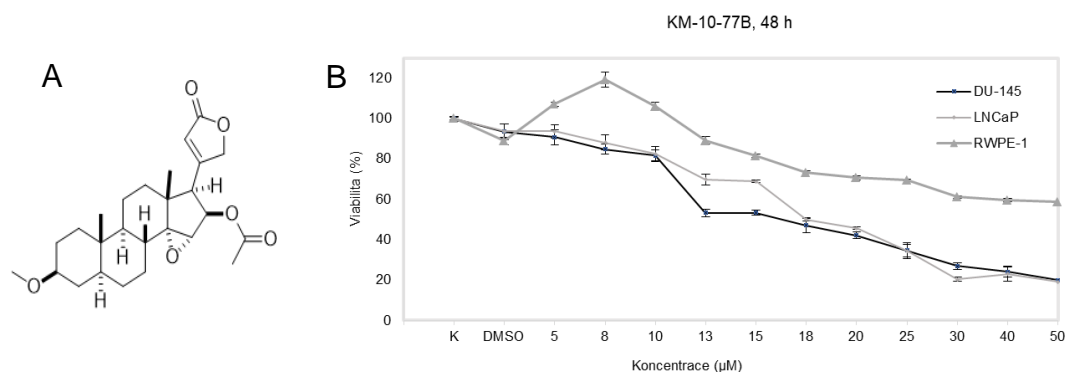
Na základě MTT testu buněčné viability byla stanovena koncentrace IC<sub>50</sub> testovaných derivátů glykosidů u buněčných linií odvozených od karcinomu prostaty DU-145 a LNCaP. Jejich účinek byl porovnáván s účinkem látek na nenádorovou prostatickou buněčnou linii RWPE-1. Výsledky MTT testu jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4: Cytotoxicita skupiny derivátů srdečních glykosidů.

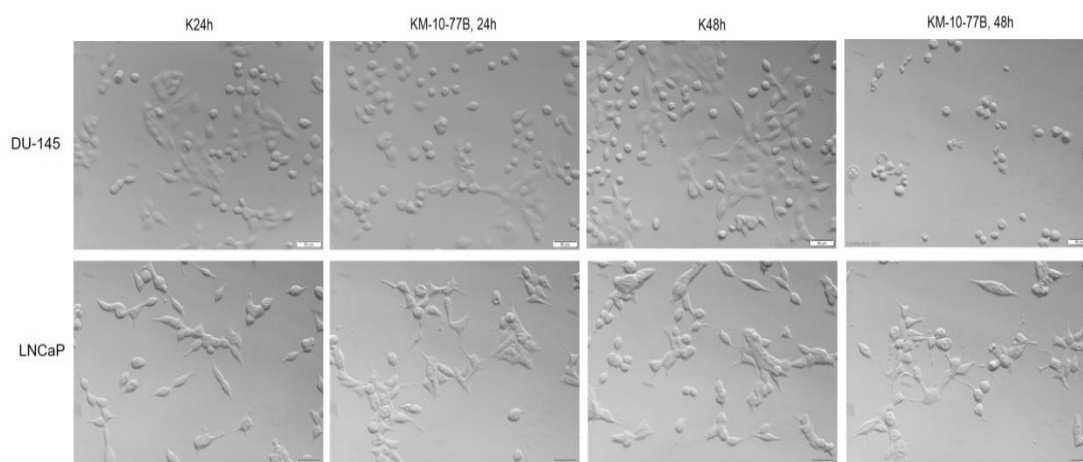
Testované látky	Cytotoxicita; IC <sub>50</sub> (μM); 48 h		
	LNCaP	DU-145	RWPE-1
KM-10-61	23,1 ± 0,4	10,1 ± 1,3	2,6 ± 1,9
KM-10-77B	18,0 ± 1,6	16,8 ± 0,3	>50
KM-10-84	5,2 ± 0,8	2,4 ± 2,2	<0,5
KM-10-173	4,4 ± 1,1	2,1 ± 1,5	<0,5
KM-11-28	14,2 ± 2,1	6,2 ± 0,6	<0,5

Některé testované látky měly na nádorové buňky zajímavý účinek, inhibovaly viabilitu nádorových buněk již při velmi nízkých koncentracích, ovšem měly i silný cytotoxický účinek na nenádorové buňky RWPE-1. Ze skupiny pěti testovaných glykosidových derivátů byla na základě MTT testu vybrána látka KM-10-77B (C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>, Mr = 444, 57; obr. 9A), která inhibovala viabilitu nádorových buněk DU-145 a LNCaP a zároveň neměla efekt na viabilitu nenádorových buněk RWPE-1 (obr. 9B).

Na základě MTT testu byla stanovena koncentrace  $IC_{50}$  pro látku KM-10-77B 16,8  $\mu\text{M}$  u buněk DU-145 a 18  $\mu\text{M}$  u buněk LNCaP. Tyto koncentrace  $IC_{50}$  byly použity pro další experimenty v časovém intervalu 24 a 48 hodin. Na nenádorovou buněčnou linii RWPE-1 neměla látka výrazný cytotoxický vliv, koncentrace  $IC_{50}$  byla větší než 50  $\mu\text{M}$ . Morfologické změny nádorových buněk po ovlivnění látkou KM-10-77B v koncentracích  $IC_{50}$  jsou zobrazeny na obrázku 10.



**Obr. 9: (A) Strukturální vzorec testovaného derivátu srdečního glykosidu KM-10-77B.; (B) Vliv látky KM-10-77B v koncentracích 5 - 50  $\mu\text{M}$  na buněčnou viabilitu buněk DU-145, LNCaP a RWPE-1 po dobu 48 h.**

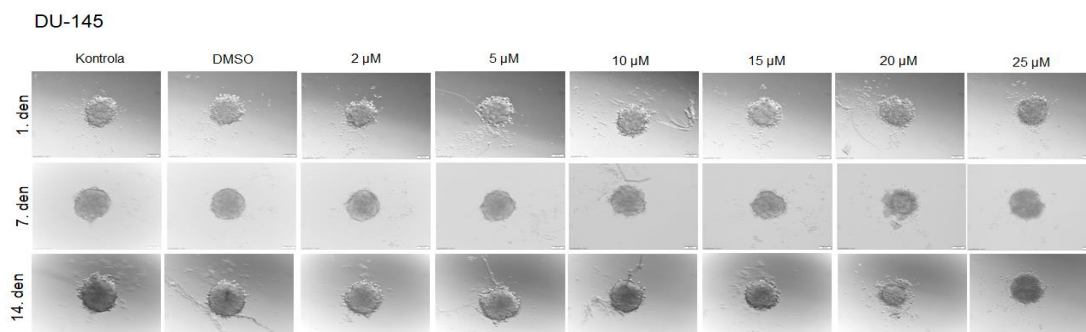


**Obr. 10: Morfologické změny buněk DU-145 a LNCaP po ovlivnění látkou KM-10-77B ( $IC_{50}$ , 24 a 48 hodin) vzhledem ke kontrolním buňkám. Zvětšení 20x.**

## 5.2 Vliv derivátů srdečních glykosidů na integritu 3D buněčných sféroidů

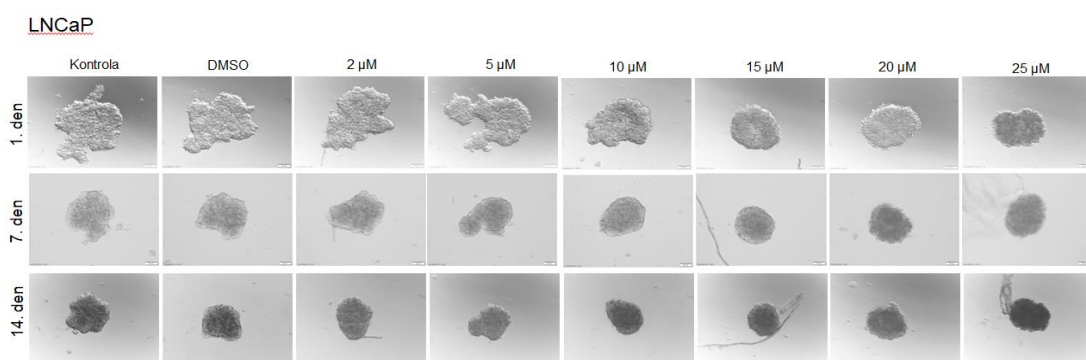
Buněčná integrita sféroidů nádorových buněčných linií DU-145 a LNCaP a nenádorové buněčné linie RWPE-1 byla sledována po ovlivnění testovanou látkou v koncentracích 2 - 25  $\mu\text{M}$  po dobu 1, 7 a 14 dní.

U linie DU-145 byl pozorován rozpad celistvosti a zmenšování sféroidů v závislosti na koncentraci i doby působení testované látky v porovnání s kontrolními buňkami, ale svůj tvar a velikost po dobu experimentu výrazně nezměnily (obr. 11).



**Obr. 11:** Vliv testované látky KM-10-77B na integritu buněčných sféroidů linie DU-145 po dobu 1, 7 a 14 dní v koncentracích od 2  $\mu$ M do 25  $\mu$ M v porovnání s kontrolními buňkami. Zvětšení 20x.

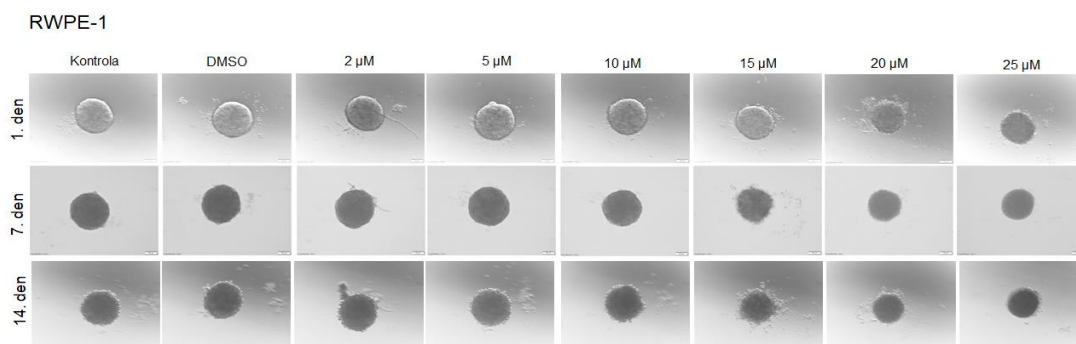
Po dobu 1, 7 a 14 dní byl taktéž sledován vliv testované látky na sféroidy buněčné linie LNCaP. Buněčné sféroidy se zmenšovaly a rozpadaly v závislosti na čase a použité koncentraci. Změna byla v porovnání s kontrolou pozorována již 1. den po ovlivnění. Sedmý den po ovlivnění bylo pozorováno zmenšení a postupný rozpad buněčných sféroidů u koncentrací 10-25  $\mu$ M a čtrnáctý den po ovlivnění byl zaznamenán rozpad buněčných sféroidů u všech testovaných koncentrací i kontrol (obr. 12).



**Obr. 12:** Vliv testované látky KM-10-77B na integritu buněčných sféroidů linie LNCaP po dobu 1, 7 a 14 dní v koncentracích od 2  $\mu$ M do 25  $\mu$ M v porovnání s kontrolními buňkami. Zvětšení 20x.

Z obrázku 13 je patrné, že testovaná látka neměla v žádném časovém úseku ani koncentraci vliv na nenádorovou buněčnou linii RWPE-1. Tento výsledek koreluje s výsledky získanými MTT testem buněčné viability.



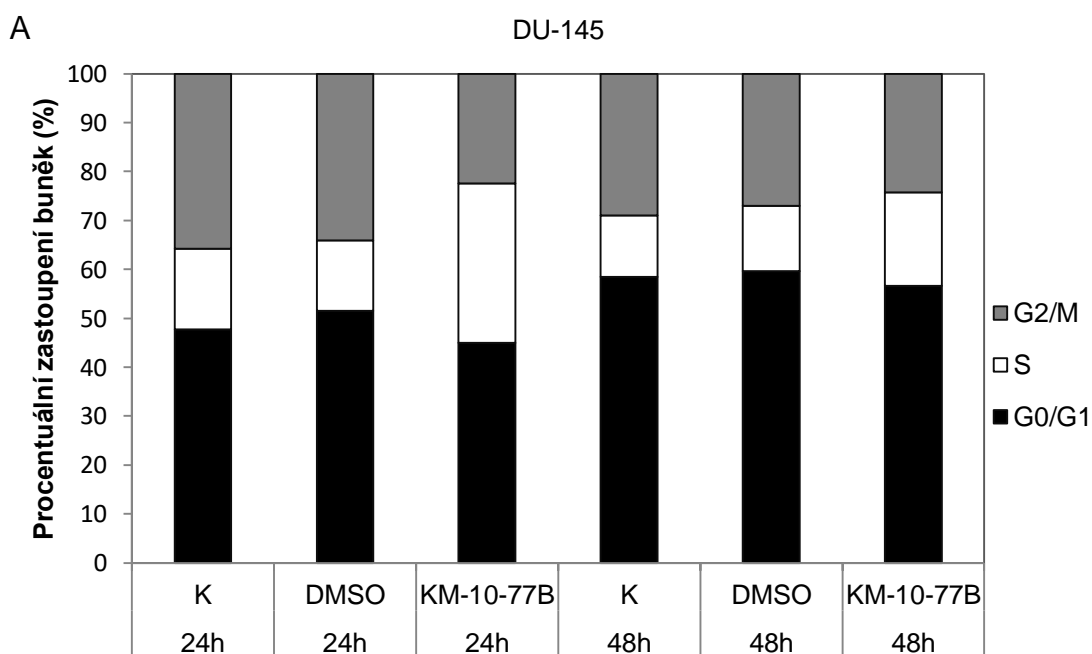


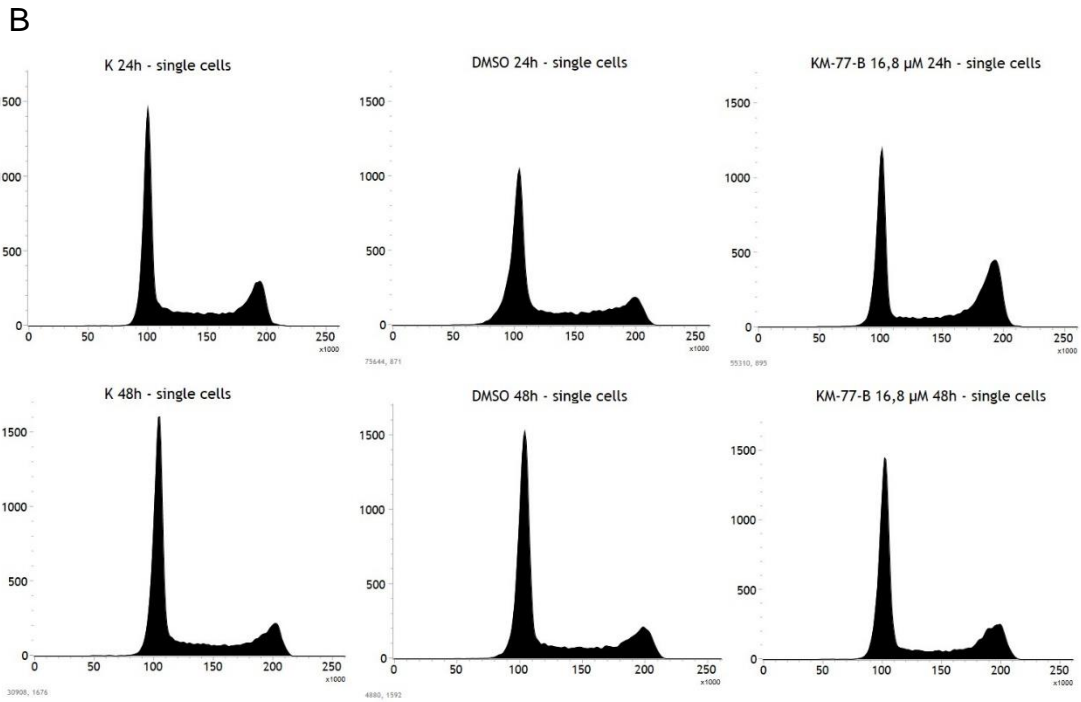
Obr. 13: Vliv testované látky KM-10-77B na integritu buněčných sféroidů linie RWPE-1 po dobu 1, 7 a 14 dní v koncentracích od 2  $\mu\text{M}$  do 25  $\mu\text{M}$  v porovnání s kontrolními buňkami. Zvětšení 20x.

### 5.3 Vliv derivátů srdečních glykosidů na buněčný cyklus

#### 5.3.1 Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

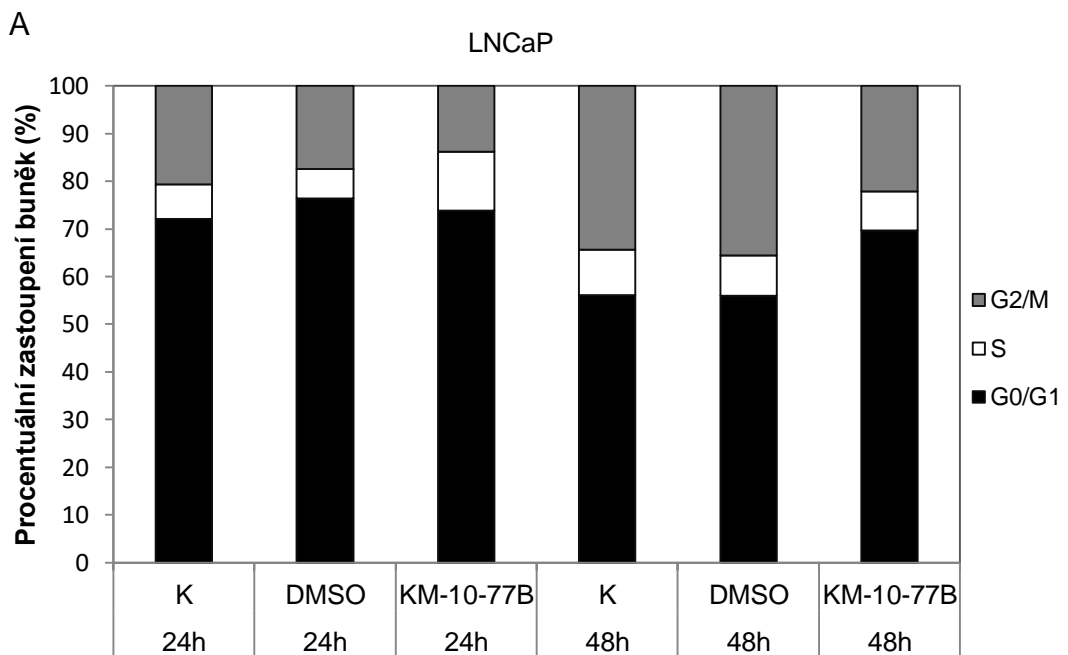
K ověření, zda testovaná látka ovlivňuje buněčný cyklus nádorových prostatických buněk, byla využita analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Na jejím základě byl změřen obsah buněčné DNA, který byl následně přepočítán na procenta vyjadřující množství buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. U buněčné linie DU-145 byla pozorována akumulace buněk v S fázi buněčného cyklu po obou časových intervalech, výrazněji po 24 hodinovém působení testované látky (obr. 14A).

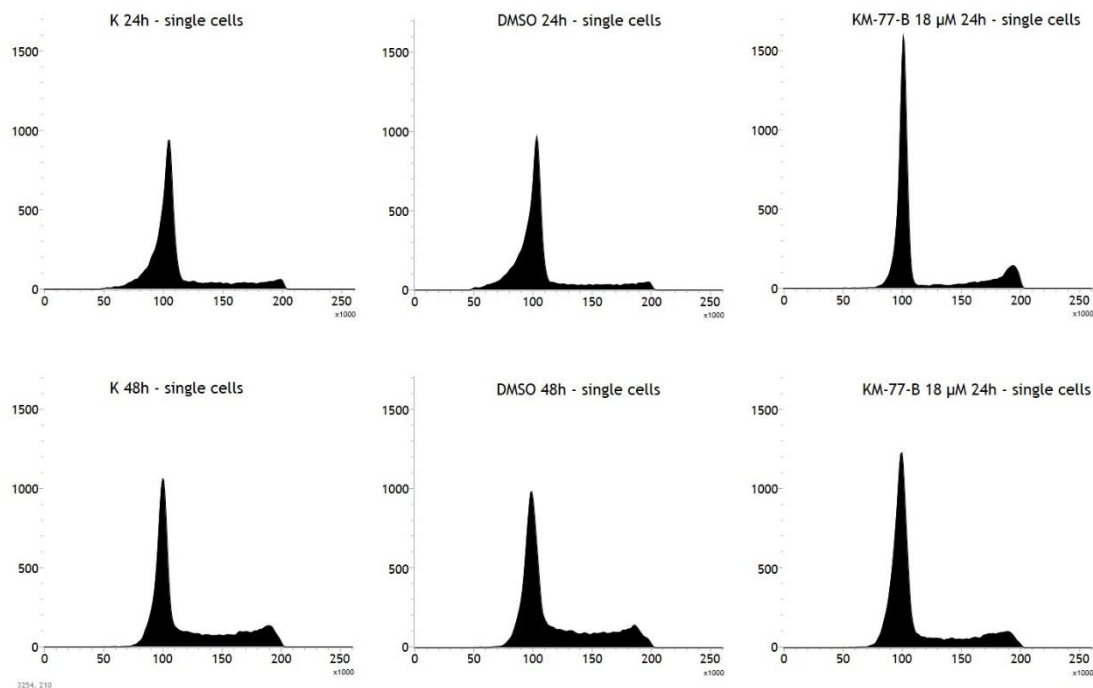




**Obr. 14: Analýza buněčného cyklu: (A) Procentuální zastoupení buněk DU-145 v jednotlivých fázích buněčného cyklu. (B) Histogramy z průtokové cytometrie zobrazující účinek testované látky na buněčný cyklus. Buněčná linie byla ovlivněna testovanou látkou po dobu 24 a 48 hodin o koncentraci 16,8 μM.**

Testovaný derivát srdečních glykosidů KM-10-77B u buněčné linie LNCaP vedl k mírnému zvýšení zastoupení buněk v S fázi cyklu po 24 hodinovém působení. Po 48 hodinovém působení látky bylo zaznamenáno zvýšené množství počtu buněk v  $G_0/G_1$  fázi vzhledem ke kontrolním buňkám (obr. 15A).

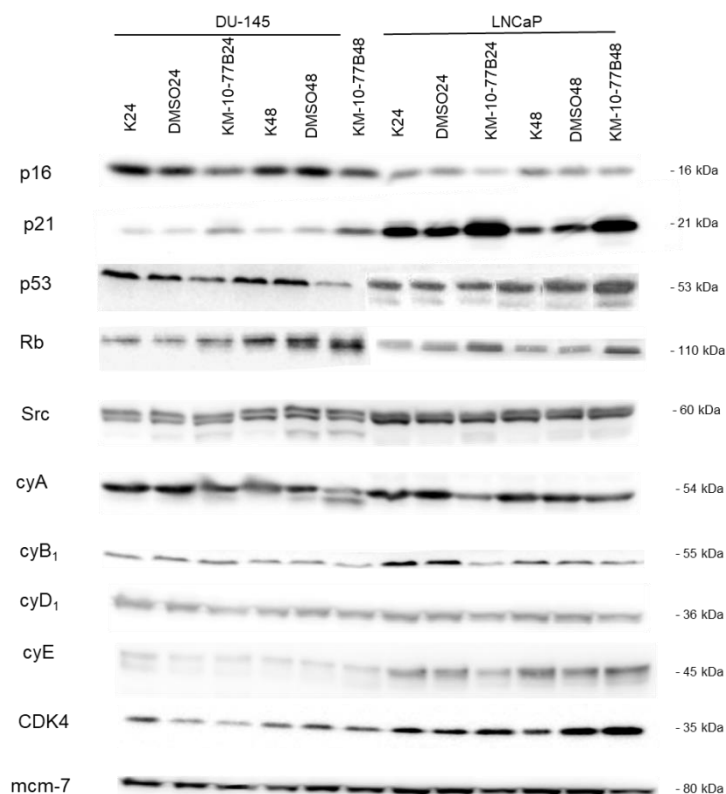


**B**

Obr. 15: Analýza buněčného cyklu: (A) Procentuální zastoupení buněk LNCaP v jednotlivých fázích buněčného cyklu. (B) Histogramy z průtokové cytometrie zobrazující účinek testované látky na buněčný cyklus. Buněčná linie byla ovlivněna testovanou látkou po dobu 24 a 48 hodin o koncentraci 18 μM.

### 5.3.2 Expres proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu metodou WB analýzy a ICE

Při regulaci buněčného cyklu dochází k expresi určitých proteinů. Expres proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu byla studována pomocí Western blot analýzy a metodou ICE. Buněčné linie DU-145 a LNCaP byly 24 a 48 hodin inkubovány s testovanou látkou o koncentraci  $IC_{50}$ . Výsledky exprese byly porovnány s kontrolními buňkami. Expres proteinů p16 (16 kDa), p21 (21 kDa), p53 (53 kDa), Rb (110 kDa), Src (60 kDa), cyklin A (54 kDa), cyklin B<sub>1</sub> (55 kDa), cyklin D<sub>1</sub> (36 kDa), cyklin E (45 kDa), cyklin-dependentní kináza 4 (CDK4; 35 kDa) a mcm-7 (80 kDa) je znázorněna na obrázku 16.



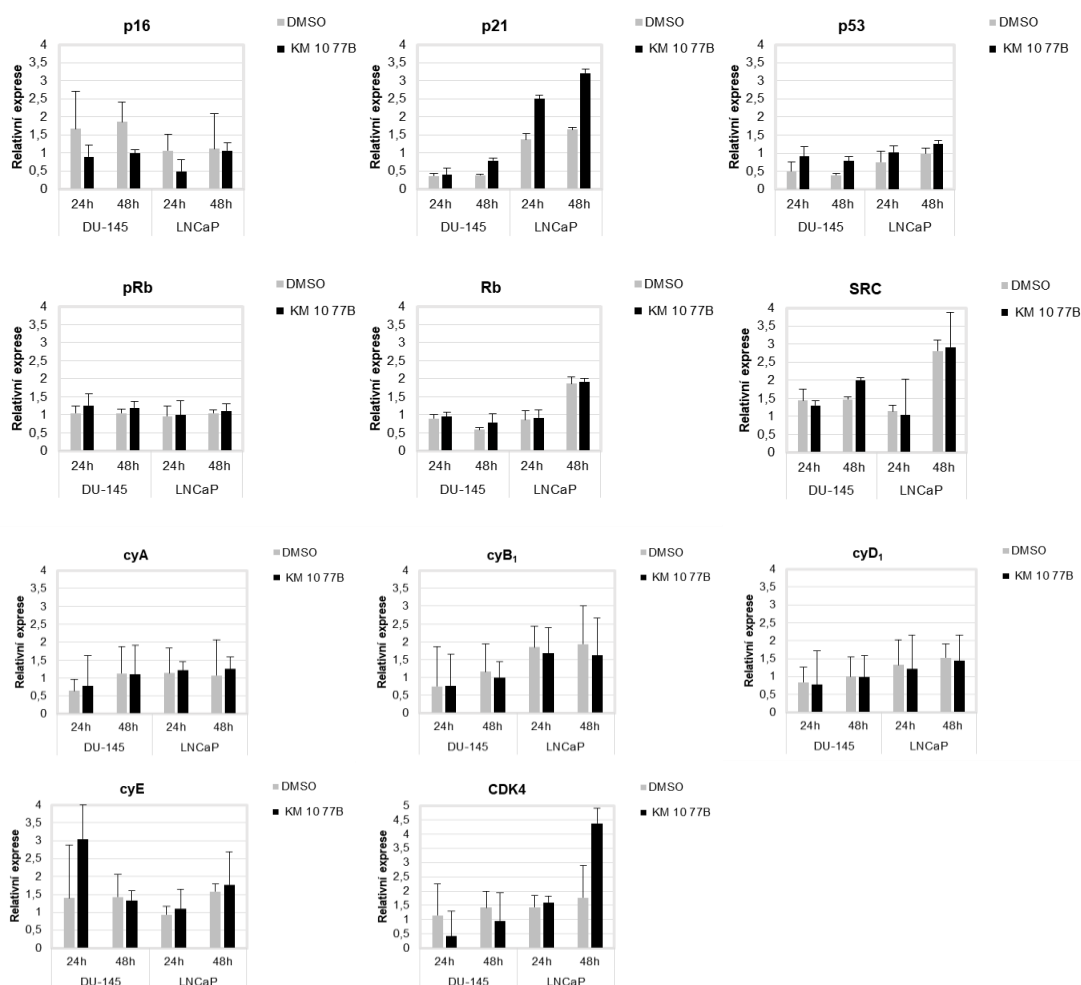
**Obr. 16: Imunodetekce proteinů regulujících buněčný cyklus u buněčných linií DU-145 a LNCaP ovlivněných testovanou látkou v koncentraci IC<sub>50</sub> po dobu 24 a 48 hodin. Expze byla vyhodnocena v porovnání s kontrolními buňkami.**

Snížená hladina expze proteinu p16 byla pozorována u obou buněčných linií po 24 i 48 hodinovém ovlivnění testovanou látkou KM-10-77B.

Hladina expze proteinu p21 byla zvýšena u obou buněčných linií po ovlivnění testovanou látkou. U buněčné linie LNCaP byla expze výrazně silnější než u buněčné linie DU-145. Expze proteinu p53 se po ovlivnění testovanou látkou KM-10-77B snížila v případě buněčné linie DU-145 již po 24 hodinovém působení. Tato buněčná linie exprimuje mutovaný typ p53. Zatímco u buněčné linie LNCaP, která obsahuje wild-type p53, byla pozorována zvýšená expze tohoto proteinu po 48 hodinách působení testované látky. K výraznému zvýšení hladiny expze retinoblastomového proteinu došlo u buněk DU-145 po 48 hodinách působení látky. V případě buněk LNCaP, byla hladina expze Rb zvýšena po ovlivnění testovanou látkou u obou časových intervalů. Expze Src kinázy byla nepatrně snížená po 24 hodinovém působení testované látky u buněk DU-145 a po 48 hodinovém působení u buněk LNCaP.

Proteiny cyklin A a cyklin B<sub>1</sub> vykazovaly snížení své exprese u buněk LNCaP po aplikaci testované látky v obou časech, u buněk DU-145 byl sledován pokles těchto cyklinů účinkem látky po 48 h ovlivnění. Výrazné změny hladin proteinů cyklinu D<sub>1</sub> a cyklinu E u buněk DU-145 nebyly pozorovány, u buněk LNCaP byl po ovlivnění testovanou látkou zjištěn slabý pokles obou cyklinů. Hladina CDK4 byla u ovlivněných buněk DU-145 (24 hodin) snížena, u buněk LNCaP byla hladina tohoto proteinu zvýšena po 48 hodinách působení testované látky. Protein mcm-7 byl využit jako kontrola množství nanesených proteinů ve vzorku.

Stejné proteiny byly detekovány také pomocí metody ICE. Buněčné linie DU-145 a LNCaP byly ovlivněny 24 a 48 hodin derivátem srdečního glykosidu KM-10-77B o koncentraci IC<sub>50</sub>. Pomocí následujících grafů (obr. 17) můžeme porovnat expresi jednotlivých proteinů na základě využití dvou detekčních metod.



Obr. 17: Relativní exprese proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu stanovená pomocí metody ICE. Nádorové linie DU-145 a LNCaP byly ovlivněny po dobu 24 a 48 hodin

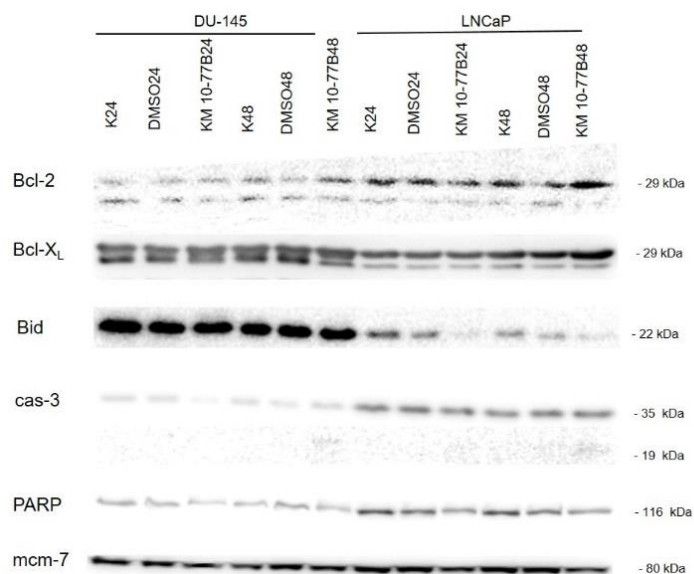
koncentrací  $IC_{50}$  studované látky. Expresse byla vyhodnocena v porovnání s kontrolními buňkami

Relativní exprese proteinu p16 byla na základě ICE metody snížena u obou buněčných linií v obou časových intervalech. Relativní exprese proteinu p21 byla po ovlivnění testovanou látkou zvýšena u obou buněčných linií, u buněk LNCaP v obou časech byla výrazně vyšší. Relativní exprese proteinu p53 byla nepatrně zvýšena ve všech ovlivněných případech. Expresse proteinu Rb byla mírně zvýšena u buněk DU-145 po 48 h působení látky, u buněk LNCaP byla exprese Rb nepatrně zvýšena v obou časech. V případě fosforylované formy pRb se jedná o nepatrné navýšení relativní exprese u buněk DU-145, zatímco u buněk LNCaP nebyla zjištěna žádná změna oproti kontrolním buňkám. Hladiny proteinu Src u obou buněčných linií variovaly, po 24 h působení byla zjištěna snížená exprese tohoto proteinu, naopak po 48 h působení byla zaznamenána mírně zvýšená hladina Src proteinu. U obou linií bylo detekováno mírné zvýšení exprese cyklinu A. Expresse cyklinu  $B_1$  a cyklinu  $D_1$  byla u obou linií mírně snižena, zatímco exprese cyklinu E byla zvýšená, zejména u buněk DU-145 po 24 h ovlivnění testovanou látkou. Expresse CDK4 byla u buněk DU-145 snížena v obou časech, zatímco u buněk LNCaP byla zvýšena, zejména po 48 h působení.

## **5.4 Vliv derivátů srdečních glykosidů na apoptotickou buněčnou smrt**

### **5.4.1 Expresse proteinů regulujících apoptózu metodou WB analýzy a ICE**

Na obrázku 18 je k vidění výsledek z Western blot analýzy exprese proteinů uplatňujících se při regulaci apoptózy. Testovaná látka KM-10-77B byla s buňkami inkubována 24 a 48 hodin o příslušné koncentraci  $IC_{50}$ . Byly sledovány exprese proteinů Bcl-2 (29 kDa), Bcl- $X_L$  (29 kDa), Bid (22, 15 kDa), kaspáza 3 (cas-3; 35, 19, 17 kDa), poly(ADP-ribóza)polymeráza (PARP; 116, 89 kDa) a mcm-7 (80 kDa) u buněk DU-145 a LNCaP. Mcm-7 byl detekován jako kontrola množství nanesených proteinů ve vzorku.



**Obr. 18:** Imunodetekce proteinů regulujících apoptózu u buněčných linií DU-145 a LNCaP ovlivněných testovanou látkou po dobu 24 a 48 hodin. Expres byla vyhodnocena v porovnání s kontrolními buňkami.

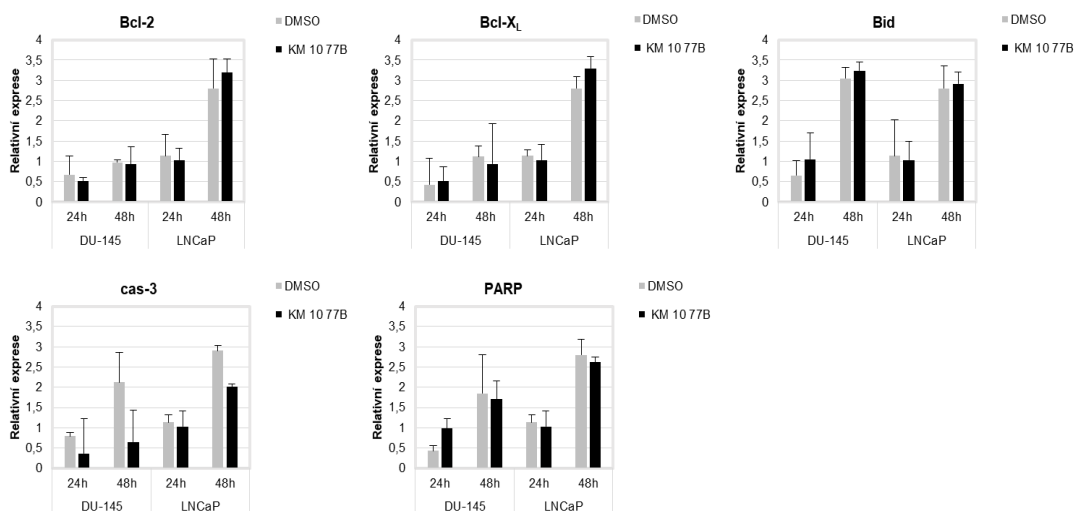
Z obrázku 18 je patrné, že testovaná látka KM-10-77B na proteiny regulující apoptózu působila u každé buněčné linie jinak. Hladina exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2 byla u buněčné linie DU-145 lehce zvýšená po 48 hodinách. U buněk LNCaP se hladina exprese proteinu Bcl-2 po 24 hodinách snížila, ale naopak po 48 hodinách je výrazně zvýšená.

Hladina exprese proteinu Bcl-X<sub>L</sub> se lehce snižovala u buněk DU-145 v obou časech, ale naopak u buněk LNCaP byla zvýšena po 48 hodinovém ovlivnění testovaným derivátem.

Štěpné fragmenty (o velikosti 15 kDa) pro-apoptotického proteinu Bid se nepodařilo detekovat, ale byl zaznamenán pokles exprese neštěpeného proteinu Bid (o velikosti 22 kDa) u buněk LNCaP po 24 i 48 hodinách působení testované látky. U buněk DU-145 nebyla detekována žádná změna hladiny exprese tohoto proteinu.

Po ovlivnění obou typů buněk testovanou látkou jsme detekovali štěpné aktivní fragmenty kaspázy 3 po 48 h aplikaci. Dále bylo u buněk LNCaP pozorováno snížení hladiny exprese proteinu PARP (116 kDa) po 24 i 48 h působení, ale nebyl pozorován žádný štěpný fragment (89 kDa). U buněk DU-145 nebyly zaznamenány výraznější změny v expresi tohoto proteinu v porovnání s kontrolními buňkami.

Expresse proteinů regulujících apoptózu byla detekována i metodou ICE. K porovnání s metodou Western blot slouží grafy na obrázku 19.



**Obr. 19: Relativní exprese anti-apoptotických a pro-apoptotických proteinů stanovená pomocí metody ICE. Nádorové linie DU-145 a LNCaP byly ovlivněny po dobu 24 a 48 hodin koncentrací IC<sub>50</sub> studované látky. Expresse byla vyhodnocena v porovnání s kontrolními buňkami.**

Relativní exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2 je v případě buněk DU-145, oproti buňkám kontrolním, lehce snižena. V případě buněk LNCaP se exprese po 48 hodinách zvýšila.

U buněk DU-145 byla exprese Bcl-X<sub>L</sub> po ovlivnění derivátem (48 h) snižena, u ovlivněných buněk LNCaP byla naopak po 48 hodinách lehce zvýšena v porovnání s kontrolními buňkami.

Relativní exprese pro-apoptotického proteinu Bid byla u obou linií po ovlivnění testovanou látkou mírně zvýšena, jen u buněk LNCaP po 24 hodinovém působení derivátu byla zaznamenána snížená relativní exprese tohoto proteinu.

Snížená hladina relativní exprese kaspázy 3 byla pozorována u ovlivněných buněk DU-145 a LNCaP v obou časových intervalech.

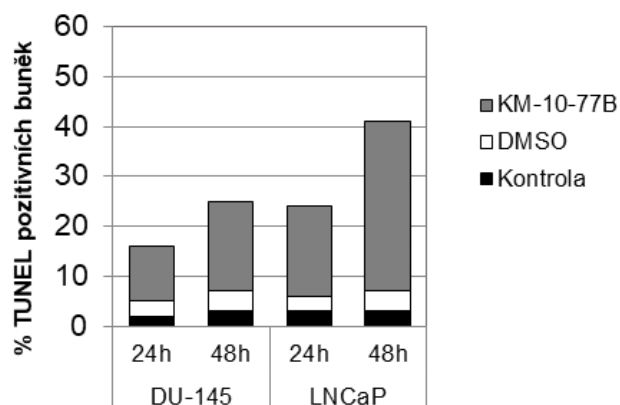
PARP měla po ovlivnění buněk DU-145 (48 h) a LNCaP (24 a 48 hodin) sníženou hladinu relativní exprese. V případě buněk DU-145 po 24 hodinách působení testované látky byla zjištěna zvýšená hladina relativní exprese PARP.

#### 5.4.2 TUNEL assay

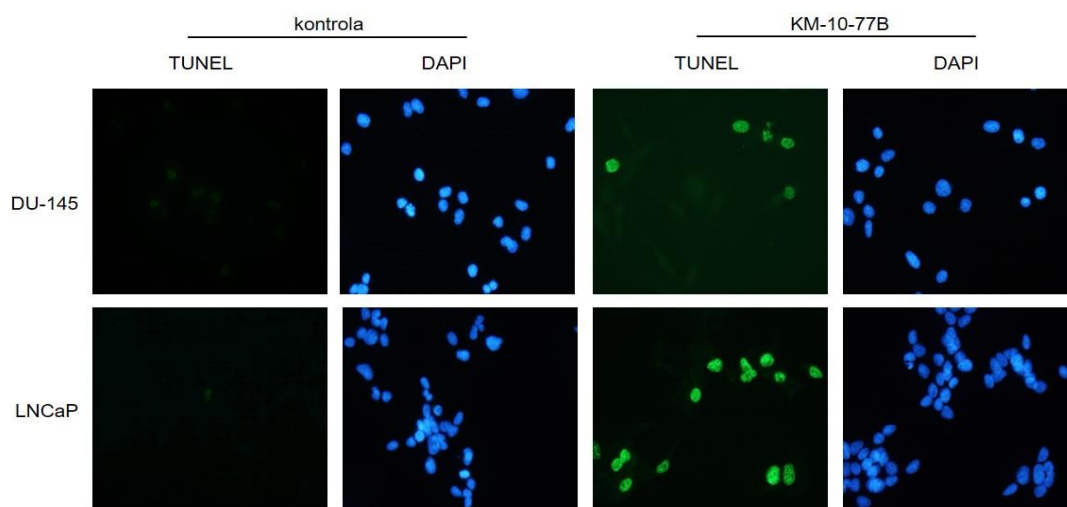
Pomocí detekce apoptotických buněk metodou TUNEL bylo zjištěno, že testovaný derivát srdečních glykosidů v koncentraci IC<sub>50</sub> vedl v obou



časových intervalech ke zvýšenému počtu apoptotických buněk u obou linií DU-145 a LNCaP (obr. 20). Zvýšené procentuální zastoupení apoptotických buněk bylo zaznamenáno zejména u buněk LNCaP po 48 hodinovém působení testované látky vzhledem ke kontrolním buňkám. Obrázek 21 znázorňuje účinky testovaného derivátu na buňky DU-145 a LNCaP vzhledem ke kontrolním buňkám.



Obr. 20: Detekce apoptotických buněk stanovená metodou TUNEL u buněk DU-145 a LNCaP ovlivněných KM-10-77B v koncentraci  $IC_{50}$  po dobu 24 a 48 hodin ve srovnání s kontrolními buňkami.



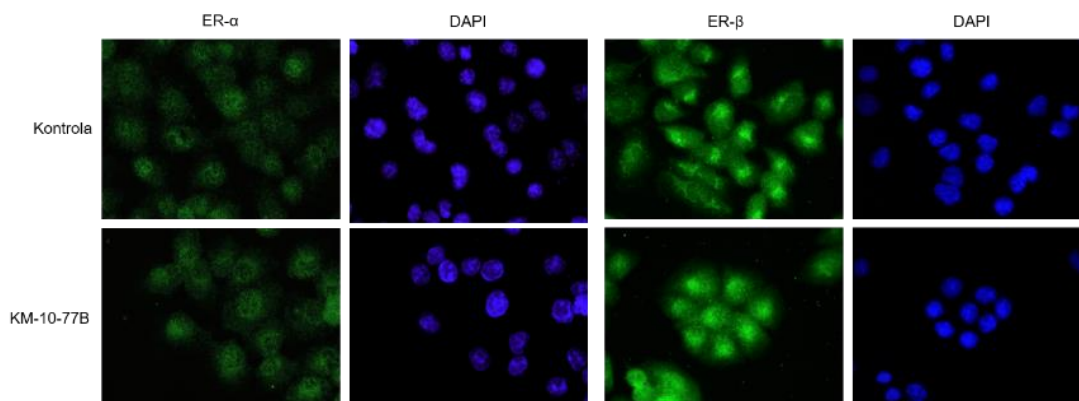
Obr. 21: Detekce DNA zlomů v jádrech apoptotických buněk metodou TUNEL u buněk DU-145 a LNCaP ovlivněných testovanou látkou KM-10-77B v koncentraci  $IC_{50}$  po dobu 48 h. Apoptotické buňky, jejichž DNA je fragmentovaná, jsou zbarveny zeleně. Buněčná jádra obarvená pomocí DAPI svítí modře. Jednotlivé obrázky v rámci jednoho vzorku znázorňují stejná zorná pole fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 40x.

## 5.5 Vliv derivátů srdečních glykosidů na expresi receptorů pro steroidní hormony

### 5.5.1 Exprese receptorů pro steroidní hormony na základě imunofluorescenčního barvení

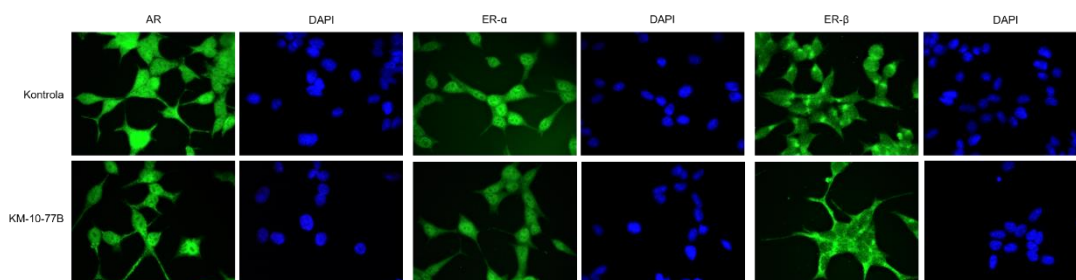
K porovnání lokalizace a exprese proteinů receptorů pro steroidní hormony u ovlivněných a kontrolních buněk byla použita detekce na základě imunofluorescenčního barvení.

U buněk DU-145 nebyla imunofluorescenčním barvením zjištěna exprese androgenového receptoru (AR) u kontrolních ani ovlivněných buněk. Velmi slabá jaderná exprese estrogenového receptoru  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) byla detekována u kontrolních i ovlivněných buněk testovanou látkou KM-10-77B. Exprese estrogenového receptoru  $\beta$  (ER- $\beta$ ) byla u kontrolních buněk DU-145 zjištěna v cytoplasmě i v jádře, po ovlivnění testovanou látkou exprese i lokalizace ER- $\beta$  zůstala stejná (obr. 22).



Obr. 22: Imunofluorescenční barvení ER- $\alpha$  a ER- $\beta$  u kontrolních buněk DU-145 a buněk ovlivněných KM-10-77B (IC<sub>50</sub>  $\mu$ M, 48 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Jednotlivé obrázky v rámci jednoho vzorku znázorňují stejná zorná pole fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 40x.

V cytoplasmě i jádrech kontrolních buněk linie LNCaP byla prokázána výrazná exprese AR. Ovlivnění látkou KM-10-77B vedlo ke snížení exprese tohoto receptoru v buňkách. V cytoplasmě i jádře kontrolních buněk LNCaP byla zjištěna i exprese ER- $\alpha$ . Po ovlivnění buněk testovanou látkou nebyla pozorována žádná změna exprese oproti kontrolním buňkám. Exprese ER- $\beta$  u kontrolních buněk byla zaznamenána v cytoplasmě zejména u vnějších jaderných pólů. Po ovlivnění testovanou látkou došlo k výraznější expresi a lokalizaci receptoru v cytoplasmě buňky (obr. 23Obr. 23).

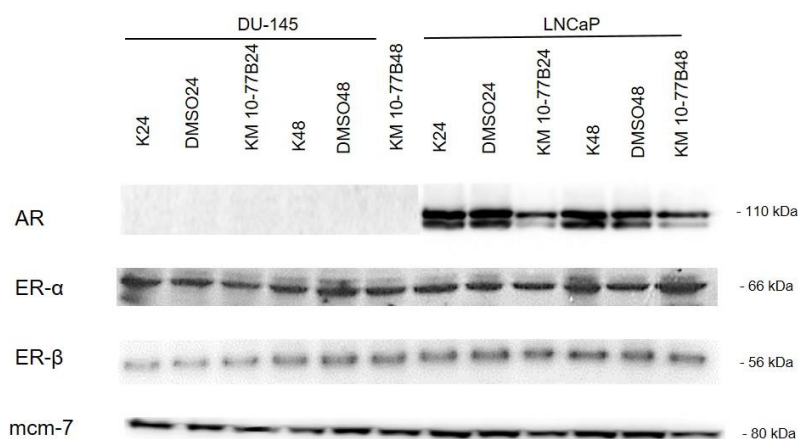


Obr. 23: Imunofluorescenční barvení AR, ER- $\alpha$  a ER- $\beta$  u kontrolních buněk LNCaP a buněk ovlivněných KM-10-77B ( $IC_{50}$   $\mu$ M, 48 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Jednotlivé obrázky v rámci jednoho vzorku znázorňují stejná zorná pole fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 40x.

### 5.5.2 Expze proteinů podílejících se na expresi receptorů pro steroidní hormony metodou WB analýzy a ICE

Pomocí Western blot analýzy byly studovány proteiny pro androgenový receptor (AR, 110 kDa), estrogenový receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ , 66 kDa) a estrogenový receptor  $\beta$  (ER- $\beta$ , 56 kDa). Buněčné linie DU-145 a LNCaP byly po dobu 24 a 48 hodin ovlivněny testovaným derivátem srdečního glykosidu o koncentraci  $IC_{50}$  (obr. 24).

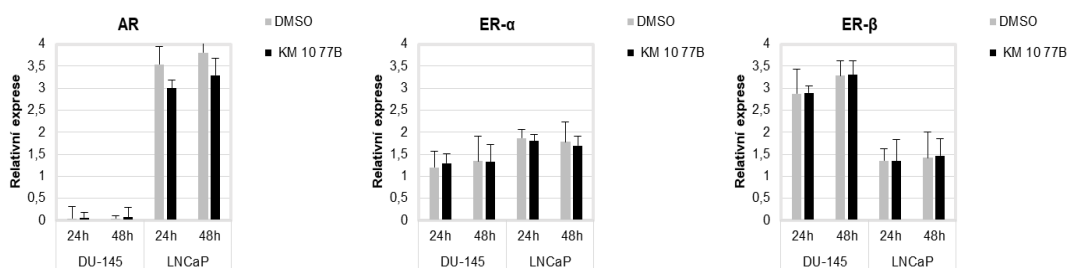
Na základě detekce nebyla u buněk linie DU-145 detekována expze AR. U buněk linie LNCaP byla imunodetekcí pozorována snížená hladina expze v obou časových intervalech. Vliv testované látky na expresi estrogenového receptoru  $\alpha$  a  $\beta$  nebyl prokázán ani u jedné buněčné linie. Protein mcm-7 prezentuje rovnoměrné nanesení proteinů ve vzorku.



Obr. 24: Imunodetekce proteinů podílejících se na expresi receptorů pro steroidní hormony u buněčných linií DU-145 a LNCaP ovlivněných testovanou látkou po dobu 24 a 48 hodin. Expze byla vyhodnocena v porovnání s kontrolními buňkami.

Metodou ICE byla provedena imunodetekce a její výsledky byly porovnány s výsledky Western blot analýzy. Dle grafů na obrázku 25 lze říci,

že výsledky použitých metod korelují a vyšly podobně. Hladina exprese AR byla u ovlivněných buněk LNCaP snížena stejně jako u Western blot analýzy v obou časech. Hladiny exprese obou estrogenových receptorů zůstaly v porovnání s kontrolními buňkami stejné u obou buněčných linií.



**Obr. 25: Relativní exprese AR, ER-α a ER-β stanovená pomocí metody ICE. Nádorové linie DU-145 a LNCaP byly ovlivněny po dobu 24 a 48 hodin koncentrací IC<sub>50</sub> studované látky. Expresse byla vyhodnocena v porovnání s kontrolními buňkami.**

## 6 DISKUZE

Srdeční glykosidy jsou sekundární metabolity rostlin, které působí zejména proti škůdcům, ale nalezneme je i u živočichů. Jejich hlavní využití je při léčbě srdečního městnavého selhání. Jsou to látky schopné inhibice sodno-draselné pumpy. Současné studie představují pro vědecký výzkum slibnou perspektivu v protinádorové léčbě, proto byly deriváty srdečních glykosidů vybrány pro studium protinádorové aktivity na buňky karcinomu prostaty.

Obecně je většina onkologických onemocnění způsobena vícečetnými mutacemi genů, ke kterým dochází v průběhu stárnutí buněk (působením fyzikálních, chemických či biologických mutagenů) a zpravidla současně na několika stupních. K těmto změnám běžně dochází v každé buňce, avšak nemusí vždy vést k maligní transformaci. V případě, že opravné procesy (buněčné či na úrovni organismu) nejsou schopny eliminovat vzniklé nádorové buňky, rozjíždí se kaskáda neregulovatelného růstu a dělení nádorových buněk, u kterých bývá potlačen proces apoptózy.

Karcinom prostaty představuje hormonálně závislý typ nádoru. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, u něhož nebyla dosud zjištěna jednoznačná a přesvědčivá příčina tohoto onemocnění. Na vzniku karcinomu prostaty se podílejí environmentální a epigenetické faktory, významnou roli hrají však onemocnění zejména faktory genetické (Sampson *et al.*, 2013; Štern *et al.*, 2008). Nasvědčuje tomu i rozdíl v četnosti incidence a mortality u bělošské populace (107/18) vzhledem k afroamerické populaci mužů (187/41) v USA (Siegel *et al.*, 2018). Primární léčbou je hormonální terapie, která je založena na blokování účinku androgenů a potlačení jejich tvorby, což má za důsledek apoptózu buněk závislých na androgenech (Vítek *et al.*, 2012). Není to ovšem spolehlivá léčba, neboť může dojít ke vzniku androgen nezávislých klonů nádorových buněk (Cannata *et al.*, 2012).

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na působení derivátů srdečních glykosidů na modelu nádorových buněčných linií odvozených od karcinomu prostaty. Cílem experimentální části diplomové práce bylo určit protinádorovou aktivitu derivátů srdečních glykosidů. Experimenty byly prováděny na nádorových prostatických buněčných liniích DU-145 a LNCaP.

Aktivita látek byla porovnána s účinky na nenádorovou prostatickou buněčnou linii RWPE-1. Buněčná linie DU-145 představuje androgen necitlivou linii, která je odvozena od metastázy v mozku. Tato linie má mutovaný tumor supresorový gen p53, exprimuje ER- $\beta$ , progesteronové receptory (PR) a slabě ER- $\alpha$ . Androgenové receptory neexprimuje. Tato buněčná linie reprezentuje model pro málo diferencovaný, agresivní a metastazující typ karcinomu prostaty. Buněčná linie LNCaP je odvozena od metastázy lymfatických uzlin, na rozdíl od buněčné linie DU-145 nemá mutovaný p53, ale disponuje nemutovanou formou p53 (wild type), reaguje na androgeny a exprimuje androgenový receptor, estrogenové receptory  $\alpha$ ,  $\beta$  a PR (Sampson *et al.*, 2013) Tato linie slouží jako buněčný model pro dobře diferencované karcinomy prostaty s nízkým metastatickým potenciálem. Buněčná linie RWPE-1 představuje epiteliální buňky pocházející z periferní zóny histologicky normální dospělé lidské prostaty imortalizované lidským papilomavirem 18.

V předložené práci byl sledován vliv derivátů srdečních glykosidů na životaschopnost buněk, integritu 3D buněčných sféroidů, buněčný cyklus, apoptotickou programovanou buněčnou smrt a vliv na expresi jaderných receptorů.

V praktické části této diplomové práce byla testována cytotoxicita 5 derivátů srdečních glykosidů, které byly dodány Laboratoří růstových regulátorů PŘF UP v Olomouci (Obr. 8). Test viability buněk byl proveden na nádorových liniích DU-145, LNCaP a porovnáván s účinkem na nenádorovou linii RWPE-1 po dobu 48 hodin. Na základě výsledných hodnot testu buněčné viability byla stanovena hodnota 50% inhibiční koncentrace (tab. 4). Ze všech testovaných derivátů byl vybrán derivát KM-10-77B odvozený od kardenolidu, jehož hodnota  $IC_{50}$  byla 16,8  $\mu$ M u buněk DU-145 a 18  $\mu$ M u buněk LNCaP, přičemž viabilita nenádorových buněk RWPE-1 nebyla tímto derivátem ovlivněna (Obr. 9B). I když některé testované deriváty (např. KM-11-84, KM-10-173) inhibovaly buněčnou viabilitu nádorových buněk ve velmi nízkých koncentracích, působily cytotoxicky i na nenádorové buňky a do dalšího testování nebyly zařazeny. Nenádorové buňky RWPE-1 byly na účinky většiny testovaných derivátů kardioglykosidů mnohem citlivější než nádorové buňky. Buňky DU-145 byly na účinky glykosidů citlivější než buňky

LNCaP. Tyto rozdíly v citlivosti buněk na působení testovaných látek mohou souviset s rozdílným genetickým základem použitých buněčných linií. Buňky DU-145 představují rychleji proliferační linii s kratším „doubling time“ v porovnání s buňkami LNCaP, které potřebují po pasáži dva dny, aby řádně adherovaly a začaly proliferovat. U buněk DU-145 se může uplatnit zásah do buněčného cyklu za danou dobu častěji, z čehož může vyplývat i nižší zjištěná koncentrace testovaných látek. V práci Rascón-Valenzuelové a kolektivu (2015) jsou popisovány antiproliferativní účinky nového kardenolidového glykosidu 12,16-dihydroxykalotropinu izolovaného z keře *Asclepias subulata* a srovnávány s účinky tří již známých glykosidů (kalotropinu, korotoxigenin 3-O-glukopyranosidu a desglucouzarinu). Izolované kardioglykosidy studovali na třech nádorových buněčných liniích různého původu: plicní buněčné linii A549, buněčné linii LS 180 odvozené od karcinomu tlustého střeva, a PC-3 buněčné linii, která je odvozena od karcinomu prostaty. Účinky látek na nádorové buňky porovnávali s účinky na normální nenádorové buňky ARPE-19. V této práci zjistili, že buňky PC-3 byly oproti ostatním buněčným liniím nejméně citlivé k účinkům testovaných glykosidů. Hodnoty cytotoxicity po 48 hodinovém ovlivnění PC-3 buněk byly pro 12,16-dihydroxykalotropin  $11,7 \pm 2,48 \mu\text{M}$ , kalotropin  $0,41 \pm 0,11 \mu\text{M}$ , korotoxigenin 3-O-glukopyranosid  $6,62 \mu\text{M} \pm 0,42 \mu\text{M}$  a desglucouzarin  $9,68 \pm 0,58 \mu\text{M}$ . Zatímco na normální nenádorové buňky testované kardioglykosidy efekt neměly (Rascón-Valenzuela *et al.*, 2015). V práci Yeh *et al.* (2003) testovali efekt srdečních glykosidů (bufalinu a cinobufaginu) na buněčné linie karcinomu prostaty a zjistili, že obě látky vyvolaly u buněk LNCaP, DU-145 a PC-3 inhibici buněčného růstu v závislosti na aplikované koncentraci a čase. Buňky LNCaP byly na aplikaci látek citlivější než buňky DU-145 a PC-3.

Dalším experimentem byl studován vliv vybraného derivátu srdečního glykosidu KM-10-77B na integritu 3D buněčných sféroidů buněčných linií DU-145, LNCaP a RWPE-1 po dobu 1, 7 a 14 dní v koncentrační škále 2-25  $\mu\text{M}$ . 3D buněčné sféroidy představují modelový systém, který vykazuje vlastnosti bližší reálné situaci *in vivo* (Thoma *et al.*, 2014). V takovém uspořádání se v rámci sféroidu tvoří gradienty živin, kyslíku či odpadních metabolitů a zároveň je možné popřípadě uskutečnit kokultivaci různých

buněčných typů nebo zahrnout interakce buněk s extracelulární matrix (ECM). Přirozenými interakcemi pak buňky získávají morfologické a jiné buněčné charakteristiky podobné těm v solidních nádorech *in vivo* (Nath a Devi, 2016). V současné době je pro studium nádorů *in vitro* využíváno několik typů 3D modelových systémů, které se od sebe liší zdrojem buněk, kultivačními postupy a aplikacemi. Pro všechny platí, že se kultivují za podmínek, které neumožňují adhezi ke kultivačnímu plastiku. Kultivují se v médiu bez séra obohaceném o specifické růstové faktory. Nejběžnějším typem 3D modelů jsou multicelulární nádorové sféroidy, které jsou připravovány z buněčných linií běžně se vyskytujících ve výzkumných laboratořích (Weiswald *et al.*, 2015). Buňky jsou kultivovány v prostředí s omezenou možností adherovat k povrchu, tím jsou upřednostněny mezibuněčné interakce a dochází k přirozené tvorbě agregátů. Toho lze docílit kultivací sféroidů v povrchově upravených kultivačních nádobách. V našem případě jsme využili 1,5% agarózu k potažení dna 96-jamkových panelů. Touto metodou lze jednoduchým způsobem docílit sféroidů o stejné velikosti, přičemž v každé jamce je přítomen jeden sféroid (Langhans, 2018).

U buněčných sféroidů linie DU-145 jsme zaznamenali rozpad celistvosti a zmenšování sféroidů v závislosti na koncentraci i doby působení testované látky v porovnání s kontrolními buňkami. Svůj tvar a velikost ovšem po dobu experimentu (14 dní) výrazně nezměnily. Byly vůči testované látce odolnější i po ovlivnění nejvyšší koncentrací. Naopak účinek derivátu kardenolidu KM-10-77B byl patrný u buněčných sféroidů linie LNCaP, u kterých došlo ke zmenšení a rozpadu sféroidů v závislosti na čase a použité koncentraci. Vliv testovaného derivátu byl pozorován již první den po ovlivnění. Sféroidy nenádorové buněčné linie RWPE-1 nebyly ovlivněny testovanou látkou v daných koncentracích ani časech. Citlivější na aplikaci testované látky byly sféroidy buněk LNCaP, zatímco na základě MTT testu byly na aplikaci látky citlivější buňky DU-145. Z uspořádání a charakteristik sféroidů může vyplývat, že odpověď tohoto buněčného modelu na účinky potenciálních léčiv nemusí být totožná s odpovědí buněk kultivovaných v monovrstvě, ačkoliv jsou oba systémy tvořeny stejnými buňkami. U sféroidů je obecně pozorována nižší citlivost vůči léčivu (Barchánková *et al.*, 2019). Rezistence sféroidů vůči některým látkám může být způsobena především



nedostatečným průnikem a distribucí látky v rámci sféroidu, přítomností neproliferující populace buněk uvnitř sféroidu, silnějšími mezibuněčnými kontakty, produkcí složek ECM, zvýšenou expresí proteinů zodpovědných za vyloučení léčiva a dalšími faktory (Gong *et al.*, 2015; Smalley *et al.*, 2006). V práci Chao *et al.* (2017) porovnávali vliv doxycyklinu na buňky PC-3 odvozené od karcinomu prostaty v monovrstvě a v 3D buněčných sféroidech vytvořených z PC-3 buněk. Sféroidy buněk PC-3 byly vůči doxycyklinu rezistentní, zatímco u buněk PC-3 ve 2D uspořádání byla stanovena nízká hodnota  $IC_{50}$  160 nM. V práci Dos Santos *et al.* (2018) se zabývali studiem protinádorových účinků derivátu thiofenů na buňky MCF-7 odvozené od karcinomu prsu. V porovnání s 2D kulturami byly 3D sféroidy buněk MCF-7 více rezistentní vůči testovaným derivátům. Do budoucna by bylo zajímavé provést další experimenty na 3D buněčných modelech a porovnat je s výsledky na monovrstvách buněčných linií.

Na základě zjištění inhibičních účinků srdečních glykosidů na viabilitu nádorových buněk prostaty byl pomocí průtokové cytometrie studován vliv derivátu KM-10-77B na distribuci buněk v rámci buněčného cyklu. Je známo, že časně genetické změny spojené s tumorigenezí zahrnují geny, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu. Tyto změny vedou u nádorových buněk často ke ztrátě  $G_1$  kontrolního bodu a narušení průběhu buněčného cyklu. Rozdílné dráhy normálních a nádorových buněk jsou využívány ke studiu nových chemopreventivních či chemoterapeutických přístupů (Lomazzi *et al.*, 2002). Na základě průtokové cytometrie bylo u buněk DU-145 zjištěno výrazné zvýšení procentuálního zastoupení buněk ve fázi S zejména po 24 hodinách působení testované látky. Po 48 hodinovém ovlivnění nebyla změna tak markantní. U buněk LNCaP testovaný derivát KM-10-77B vedl k mírnému zvýšení počtu buněk v S fázi po 24 hodinách působení. Naopak po 48 hodinách testovaná látka brání vstupu do fáze S, byla zjištěna blokáda buněk v  $G_0/G_1$  fázi buněčného cyklu. Reevesiozid A patří do skupiny kardenolidových glykosidů, který byl izolovaný z kořene *Reevesia formosana*, byl studován na buněčných liniích PC-3 a DU-145. U buněk PC-3 došlo po 48 hodinové inkubaci k akumulaci buněk v S fázi buněčného cyklu. (Leu *et al.*, 2014). V práci Chou a kolektivu (2021) byl studován vliv digoxinu a digitoxinu na nádovou ovariální buněčnou linii SKOV-3. Po ovlivnění buněk

digoxinem bylo pozorováno shlukování buněk ve fázi  $G_0/G_1$  po časovém intervalu 48 hodin. Akumulace buněk v  $G_0/G_1$  po ovlivnění digitoxinem byla pozorována již po 24 hodinách.

Na regulaci buněčného cyklu se podílí řada proteinů. Expres proteinů regulující buněčný cyklus byla detekována pomocí Western blot analýzy a ICE. Zajímalo nás porovnání obou těchto metod, zda by do budoucna bylo možné WB analýzu nahradit rychlejší a efektivnější metodou ICE. WB analýza je časově náročnější, dražší metoda, ale vyniká svou specifičností. Naopak ICE metoda, která slouží pro kvantifikaci intracelulárních proteinů přímo v buňkách, je rychlejší, levnější a umožňuje kombinovat výhody jednoduché techniky s kvantitativním výstupem.

Protein p16 je tumor supresor, jenž je inhibován cyklin-dependentními kinázami CDK4 a CDK6 a je významný při regulaci progresu buněčného cyklu zejména v  $G_1$  fázi (Boice *et al.*, 1996). Western blot analýzou i ICE metodou byla zjištěna snížená hladina exprese proteinu p16 u obou buněčných linií v obou časových intervalech. Tento pokles může představovat sníženou schopnost p16 zabránit vazbě cyklinu  $D_1$  na příslušnou cyklin dependentní kinázu. Kontrolní body buněčného cyklu  $G_1$  a  $G_2$  jsou řízeny proteinem p21 (Gomez-Manzano *et al.*, 1997). Zvýšená hladina proteinu p21 byla detekována u obou buněčných linií po 24 i 48 hodinách. Expres byla výrazně silnější u linie LNCaP jak na základě WB analýzy tak ICE. Dalším detekovaným proteinem je nádorový supresor p53, který je nazýván jako strážce genomu reagující na buněčné poškození. WB analýzou byla zjištěna zvýšená exprese p53 u buněk LNCaP po 48 hodinovém působení látky. Buňky LNCaP exprimují nemutovaný typ nádorového supresoru p53. U buněk DU-145 s mutovaným typem p53 byla WB analýzou detekována snížená exprese v obou časech. Metodou ICE byla relativní exprese proteinu p53 nepatrně zvýšena ve všech ovlivněných případech. Retinoblastomový protein Rb je regulátor buněčného cyklu zodpovědný za zahájení replikace a dělení buňky. Jeho funkce je narušena u malignit, a dochází tak k neregulovanému buněčnému růstu a podpoře růstu nádoru (Dick *et al.*, 2013). U buněk DU-145 byla pozorována zvýšená exprese Rb proteinu po 48 hodinách na základě obou metod. U buněk LNCaP byla zvýšená u obou časů na základě WB analýzy. Detekce pomocí

ICE neodhalila výrazné změny, zvýšená exprese byla velmi nepatrná u obou časových intervalů. Dalším detekovaným proteinem je Src nереceptorová proteinová tyrozinkináza, která byla objevena jako onkogenní protein retrovirového Rousova sarkomu. Účastní se přenosu informací, které řídí buněčný růst, migraci i smrt buněk (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2014). Stimulace EGFR, jež vede k buněčné proliferaci a k aktivaci Src kinázy během přechodu G<sub>2</sub>/M (Roskoski, 2004). Výsledky exprese Src kinázy WB analýzou a ICE spolu korelovaly v případě 24 hodinového ovlivnění derivátem KM-10-77B, kdy byla zjištěna snížená exprese tohoto proteinu.

Úspěšný průchod buněčným cyklem je podmíněný správným načasováním aktivace cyklin-dependentních kináz (CDK), které tvoří komplexy s příslušnými cykliny. Vytvoření vazby umožní průchod kontrolními uzly buněčného cyklu (Slabý *et al.*, 2015). V G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu působí především cykliny D (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>) tvořící funkční komplexy s CDK4 a CDK6. Na stimulaci přechodu G<sub>1</sub>/S buněčného cyklu se také podílí cyklin E ve spojení s CDK2. Zvýšená exprese těchto cyklinů má za následek zkrácení G<sub>1</sub> fáze buněčného cyklu a rychlejší přechod do S fáze. U buněk LNCaP, u kterých byla na základě průtokové cytometrie zjištěna blokáda buněčného cyklu v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi, byla pozorována slabě snížená hladina cyklinu D<sub>1</sub>, E a zvýšená hladina CDK4. U buněk DU-145 nebyly pozorovány změny hladin proteinů cyklinu D<sub>1</sub> ani cyklinu E. Průběh S fáze je kontrolován cyklinem A v asociaci s CDK2. Tato kináza je po G<sub>1</sub>/S přechodu uvolněna ze vzájemné interakce s cyklinem E. U obou linií bylo pozorováno snížení hladiny cyklinu A, zejména u delšího času působení testované látky. Mezi mitotické cykliny patří především cykliny A a B působící v komplexu s CDK1. Vytvořené komplexy se podílejí na fosforylaci řady proteinů, které jsou nezbytné pro G<sub>2</sub>/M přechod. Snížená exprese hladiny cyklinu B<sub>1</sub> byla pozorována u obou buněčných linií po ovlivnění testovanou látkou. Výsledky WB analýzy se v některých případech rozcházejí s výsledky ICE. Metodou ICE byla zjištěna zvýšená hladina cyklinu A u obou linií a zvýšená hladina exprese cyklinu E u buněk DU-145 po 24 hodinové působení látky. Ostatní výsledky se shodují.

Podobné účinky na expresi proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu byly testovány na lidské buněčné linii Ishikawa, odvozené od endometriálního karcinomu. Buňky byly ovlivněny bufalinem po dobu 24

a 48 hodin v koncentraci 1 ng/ml. Změny v expresi byly pozorovány zejména po 48 hodinách ovlivnění. Protein p21 měl zvýšenou hladinu exprese. Hladina exprese cyklinu A se snížila (Takai *et al.*, 2008). Podobně jako v našem případě byla pozorována zvýšená exprese proteinu p53 a p21 u buněčné linie LNCaP v koncentraci bufalinu 5-100 nmol/l po 48 hodinách Zhangem a kolektivem (2018). Po ovlivnění buněčné linie A549 digoxinem o koncentraci 250 nM došlo ke snížení exprese Src kinázy již po 2 hodinách od ovlivnění (Lin *et al.*, 2015). Michalak se svým kolektivem (2020) popisují ve své práci účinky derivátů oleandrigeninů, označených čísly 21 a 25, na buněčné linii HeLa odvozené od cervikálního karcinomu. Po aplikaci těchto látek na buňky HeLa došlo ke snížení exprese fosforylovaného i celkového Rb proteinu po 24 hodiném ovlivnění v koncentraci 1 i 10  $\mu$ M. Efekt kardenolidu konvalatoxinu na cyklin B<sub>1</sub> byl pozorován u plicní nádorové linie A549. Po 24 hodinovém ovlivnění byl pozorován pokles hladin cyklinu B<sub>1</sub> již při 10 nM koncentraci (Schneider *et al.*, 2016, 2017). Kardenolidem askleposidem o koncentraci 100 nM bylo u buněk PC-3 pozorováno snížení hladiny cyklinu D<sub>1</sub> již po 3 hodinách ovlivnění. V této studii byly detekovány i další cykliny (A, B, E), u kterých ale nedošlo k žádné změně v hladině exprese (Leu *et al.*, 2020). Chang a kolektiv (2018) detekovali ve své studii sníženou hladinu cyklinu D<sub>1</sub> po 2 hodinovém ovlivnění buněk DU-145 bufandienolidem o koncentraci 1, 5 a 10  $\mu$ g/ml. Kaushik s kolektivem v roce 2017 studovali efekt kardioglykosidů konvalatoxinu a peruvodisu na plicní buněčné linii NCI-H460 po 12 a 24 hodinové inkubaci. Již po 12 hodinách ovlivnění konvalatoxinem došlo ke snížení exprese hladiny CDK4. Po ovlivnění peruvodisem se hladina exprese CDK4 snížila po 24 hodinách.

Uvádí se, že inhibice buněčného růstu může mít souvislost se zvýšenou apoptózou buněk. Proto byl v této práci také studován vliv glykosidu na indukci apoptózy u nádorových buněk prostaty pomocí metody TUNEL, Western blot analýzou a metodou ICE. Pomocí metody TUNEL byl zjištěn zvýšený počet apoptotických buněk u obou buněčných linií po 48 hodinách ovlivnění testovaným derivátem KM-10-77B. Nejvyšší vliv na indukci apoptózy měl kardenolidový derivát na buňky LNCaP po 48 hodinách ovlivnění. Zvýšený počet apoptotických buněk byl na základě metody TUNEL

pozorován i po ovlivnění bufalinem (1, 10  $\mu$ M) a cinobufaginem (1, 10  $\mu$ M) u buněčných linií DU-145 a LNCaP po 24 hodinách (Yeh *et al.*, 2003).

Apoptotická programovaná smrt buněk je regulována pro-apoptotickými a anti-apoptotickými proteiny. Vnitřní mitochondriální dráha apoptózy je regulována anti-apoptotickými proteiny genové rodiny Bcl-2. Dysregulace členů genové rodiny Bcl-2 je hlavním cílem pro zlepšení výsledků pacientů s nádory, a proto mnoho nově vyvinutých léků inhibuje Bcl-2 i ostatní příbuzné proteiny (Weyhenmeyer *et al.*, 2012). Testovaný derivát KM-10-77B působil na expresi proteinů genové rodiny Bcl-2 u studovaných buněčných linií rozdílně. U buněk DU-145 byla hladina anti-apoptotického proteinu Bcl-2 po 48 hodinovém ovlivnění zvýšena, ale hladina proteinu Bcl-X<sub>L</sub> se snížila po 24 i 48 hodinách. Na základě In cell ELISA metody se hladiny Bcl-2 snížily v obou časech, hladina Bcl-X<sub>L</sub> se po 24 hodinách mírně zvýšila a po 48 hodinách snížila. U buněk LNCaP byl WB analýzou po 24 hodinách pozorován pokles exprese proteinu Bcl-2, ale naopak zvýšená hladina po 48 hodinách. Výsledky WB analýzy se shodují s ICE. Protein Bcl-X<sub>L</sub> měl v porovnání s kontrolními buňkami zvýšenou expresi po 48 hodinách. Snížení hladiny exprese proteinu Bcl-2 pozorovali v práci Wu a kolektivu (2016) po ovlivnění 2  $\mu$ M bufalinem v buňkách NCI-H460, které jsou odvozeny od karcinomu plic. Snížená exprese byla pozorována již po 24 hodinách ovlivnění. Snížená hladina proteinu Bcl-2 a Mcl-1, patřící taktéž do genové rodiny Bcl-2, byla pozorována i v případě ovlivnění buněk PC-3 přírodním kardenolidem askleposidem po 48 hodinách již při 30 nM koncentraci (Leu *et al.*, 2020). Pro-apoptotický protein Bid nevykazoval u buněk DU-145 žádnou změnu hladiny exprese ani nebyl pozorován žádný štěpný fragment. Lehký pokles celkové hladiny neštěpeného proteinu Bid byl pozorován u LNCaP (24 i 48 h). Výsledky WB analýzy a ICE se shodují jen u buněk LNCaP ovlivněných testovanou látkou po 24 hodinách. Snížená exprese proteinu Bid byla taktéž detekována u buněk Hep3B odvozených od hepatocelulárního karcinomu po 18 hodinovém ovlivnění 0,6  $\mu$ M srdečním glykosidem Lanatosidem C (Chao *et al.*, 2017).

Cysteinové proteázy, neboli kaspázy, se v buňce nacházejí v neaktivní formě, která je v případě zahájení apoptózy štěpena na formu aktivní

(Sankari *et al.*, 2012). Snížení hladiny exprese kaspázy 3 bylo WB analýzou pozorováno u obou buněčných linií v obou časech a štěpení kaspázy 3 (35 kDa) na aktivní fragment (19 kDa) bylo slabě pozorováno v případě ovlivněných buněk obou linií po 48 hodinách. Metodou ICE se hladina kaspázy 3 snižovala u obou buněčných linií i obou časových intervalů. V případě, že je aktivována kaspáza, dochází ke štěpení jejího substrátu (např. PARP). WB analýzou ovšem u ovlivněných buněk žádný štěpný fragment proteinu PARP nebyl detekován. U buněk DU-145 nebyla pozorována žádná výrazná změna hladiny PARP. U buněk LNCaP byl v obou časových intervalech pozorován pokles hladiny exprese PARP. Metodou ICE byla zjištěna snížená hladina PARP po ovlivnění buněk DU-145 (48 h) a LNCaP (24 a 48 h). Imunodetekce Western blot analýzou ve studii Leu a kolektivu (2020) ukázala, že v buňkách PC-3 po 48 hodiném ovlivnění 100 nM přírodním kardenolidem askleposidem došlo k aktivaci kaspázy 3 a byl pozorován její štěpný fragment. Taktéž byla pozorována lehce snížená hladina exprese štěpného fragmentu PARP.

Výsledky detekce apoptózy buněk by bylo vhodné ještě doplnit o další detekce, aby bylo zřejmé, jakou signální dráhou je buněčná smrt po ovlivnění srdečních glykosidů indukována a zda je zapojena mitochondriální cesta aktivace dalších kaspáz.

Z chemického hlediska se kardioglykosidy řadí mezi steroidní látky, jejichž molekula se skládá ze steroidního skeletu, který je substituován methylovými skupinami v polohách C-10 $\beta$ , C-13 $\beta$ , hydroxylovou skupinou v poloze C-14 $\beta$  a nenasyceným laktonem v poloze C-17 $\beta$  (Bejček *et al.*, 2021). V souvislosti se strukturou testovaných kardenolidů podobnou živočišným hormonům odvozených od cholesterolu byl v této práci sledován vliv testovaného derivátu srdečního glykosidu KM-10-77B na expresi a lokalizaci jaderných receptorů pro steroidní hormony AR, ER- $\alpha$ , ER- $\beta$  u prostatických nádorových buněčných linií DU-145 a LNCaP na základě imunofluorescence, WB analýzy a metody ICE. U androgen necitlivé buněčné linie DU-145 byla imunofluorescenčním barvením pozorována slabá jaderná exprese ER- $\alpha$  a výraznější exprese ER- $\beta$  jak v jádře tak i v cytoplazmě kontrolních buněk. Po ovlivnění testovaným derivátem nebyly

zjištěny žádné změny. Výsledky doplněné Western blot analýzou a ICE rovněž neukázaly žádné změny v porovnání s neovlivněnými buňkami.

U androgen citlivé buněčné linie LNCaP imunofluorescenční detekce prokázala sníženou expresi AR v jádře buněk ovlivněných testovaným derivátem a zároveň byl Western blot analýzou i metodou ICE zaznamenán pokles hladiny AR v obou časech působení látky. Při sledování exprese ER- $\alpha$  a ER- $\beta$  u buněk LNCaP imunofluorescence prokázala cytoplazmatickou expresi u kontrolních buněk, v případě ER- $\beta$  bylo zjištěno zakoncentrování proteinu u vnějších jaderných pólů. Po ovlivnění buněk testovaným derivátem nebyla zjištěna výrazná změna exprese estrogenových receptorů vzhledem ke kontrolním buňkám. Podobně i Western blot analýza i ICE nezjistily žádné výrazné změny v expresi těchto proteinů po ovlivnění buněk testovaným glykosidem.

Western blot analýzou byla v buňkách hepatocelulárního karcinomu HepG2.2.15 zjištěna snížená exprese AR po ovlivnění bufalinem (10 nM; 12 h; Yu *et al.*, 2020). Po 48 hodinovém ovlivnění buněk LNCaP bufalinem došlo k poklesu exprese androgenového receptoru při 20 nM koncentraci (Zhang *et al.*, 2018).

Praktická část diplomové práce přinesla zajímavé výsledky v oblasti studia protinádorových účinků srdečních glykosidů na nádorové buňky prostaty. Bylo by zajímavé v dalších experimentech pokračovat i v budoucnu.

Co se týká porovnání Western blot analýzy a ICE metody, můžeme říci, že obě metody mají své výhody. WB analýza představuje finančně poměrně drahou a zdlouhavou metodu, která ovšem vyniká svojí specifikou. In-Cell ELISA je podstatně levnější a rychlejší metoda, která kombinuje výhody jednoduché techniky s kvantitativním výstupem, velkým dynamickým rozsahem s použitím dobře charakterizovaných protilátek. ICE metoda je vhodná pro detekci sledovaných cílů v mnoha buněčných podmínkách a mohla by být více zapojena mezi výzkumné techniky.

## 7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla studována a charakterizována protinádorová aktivita derivátů srdečních glykosidů na nádorových prostatických buněčných liniích DU-145 a LNCaP. Testovaná látka s označením KM-10-77B byla odvozena od struktury kardenolidu. Na základě výsledné hodnoty cytotoxicity byla na buňky DU-145 aplikována koncentrace 16,8  $\mu\text{M}$  a na buňky LNCaP 18  $\mu\text{M}$  koncentrace. Buňky byly s testovanou látkou inkubovány 24 a 48 hodin.

V experimentální části jsme studovali integritu 3D buněčných sféroidů po ovlivnění testovaným derivátem, vliv testované látky na buněčný cyklus, apoptózu a expresi proteinů jaderných receptorů u nádorových buněk prostaty. Z metod provedených během experimentální části diplomové práce byly stanoveny následující závěry. Celistvost 3D buněčných sféroidů byla více narušena po ovlivnění buněčných sféroidů LNCaP, které byly na aplikaci testované látky citlivější. Byly zjištěny změny v distribuci fází buněčného cyklu s rozdílnými výsledky u každé linie. U buněčné linie DU-145 byla pozorována akumulace buněk v S fázi, kdežto u buněčné linie LNCaP došlo ke zvýšení množství buněk v  $G_0/G_1$  fázi a ke zvýšení procentuálního zastoupení apoptotických buněk. Detekce proteinů regulujících buněčný cyklus a apoptózu byla provedena pomocí dvou metod, jejíž výsledky byly porovnávány. Vliv derivátů srdečních glykosidů na jaderné receptory buněk DU-145 nebyl prokázán. U buněk LNCaP měla testovaná látka vliv na změny v lokalizaci a expresi jaderných receptorů pro steroidní hormony, zejména na AR.

Získané výsledky otevírají možnost dalších studií hodnotících antiproliferační a protinádorové účinky srdečních kardenolidů. Výsledky mohou být v budoucnu využity ve studiích pro přípravu nových derivátů srdečních glykosidů či v případě vývoje nových léčebných postupů a látek, které by mohly přispět k léčbě karcinomu prostaty.



## 8 POUŽITÁ LITERATURA

**Ablin R. J., Soanes W. A., Bronson P., Witebsky E.** Precipitating antigens of the normal human prostate. *Journal of reproduction and fertility*. 1970, **22**, 573-574.

**Arellano M., Moreno S.** Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1997, **29** (4), 559-573.

**Balk S. P., Knudsen K. E.** AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nuclear Receptor Signaling*. 2008, **6** (1), 1-12.

**Bao Z., Tian B., Wang X., Feng H., Liang Y., Chen Z., Li W., Shen H., Ying S.** Oleandrin induces DNA damage responses in cancer cells by suppressing the expression of Rad51. *Oncotarget*. 2016, **7** (37), 59572-59579.

**Barchánková L., Magdolenová A., Hájek M.** 3D buněčné sféroidy jako modely solidních nádorů. *Bioprospect*. 2019, **29**, 35-40.

**Bartůňková J., Špišek R., Podrazil M., Kuklík R.** Imunoterapie karcinomu prostaty. *Onkologie*. 2014, **8** (1), 6-8.

**Bejček J., Spiwok V., Kmoníčková E., Ruml T., Rimpelová S.** Kardioglykosidy: terapeutický potenciál pro léčbu nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2021, **115**, 4-12.

**Boice J. A., Fairman R.** Structural characterization of the tumor suppressor p16, an ankyrin-like repeat protein. *Protein Science*. 1996, **5** (9), 1776-1784.

**Bonkhoff H.** Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression. *Prostate*. 2018, **78** (1), 2-10.

**Bonkhoff H., Fixemer T., Hunsicker I., Remberger K.** Estrogen Receptor Expression in Prostate Cancer and Premalignant Prostatic Lesions. *The American Journal of Pathology*. 1999, **155** (2), 641-647.

**Bradford T. J., Tomlins S. A., Wang X., Chinnaiyan A. M.** Molecular markers of prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2006, **24** (6), 538-551.

**Bussemakers M. J., VanBokhoven A., Verhaegh G. W., Smit F. P., Karthaus H. F., Schalken J. A., Debruyne F. M., Ru N., Isaacs W. B.** DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*. 1999, **59** (23), 5975-5979.

**Cannata D. H. Kirschenbaum A., Levine A. C.** *Androgen Deprivation Therapy as Primary Treatment for Prostate Cancer*. 2012, **97** (2), 360-365.

**Catz S. D., Johnson, J. L.** BCL-2 in prostate cancer: A minireview. *Apoptosis*. 2003, **8**, 29-37.

**Cohen G. M.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. 1997, **326** (1), 1-16.

**Culig Z., Hobisch A., Bartsch G., Klocker H.** Androgen receptor – an update of mechanisms of action in prostate cancer. *Urology Research*. 2000, **28**, 211-219.

**Culig Z., Santer F. R.** Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2014, **33** (2-3), 413-427.

**Daniel N. N.** BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research*. 2007, **13** (24), 7254-7263.

**Day J. R., Jost M., Reynolds M. A., Groskopf J., Rittenhouse H.** PCA3: From basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Letters*. 2011, **301** (1), 1-6.

**Dick F., Rubin S.** Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013, **14**, 297-306.

**Diederich M., Muller F., Cerella C.** Cardiac glycosides: From molecular targets to immunogenic cell death. *Biochemical Pharmacology*. 2017, **125**, 1-11.

**Dimas K., Papadopoulou N., Baskakis C., Prousis K. C., Tsakos M., Alkahtani S., Honisch S., Lang F., Calogeropoulou T., Alevizopoulos K., Stournaras C.** Steroidal cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitors exhibit strong anti-cancer potential in vitro and in prostate and lung cancer xenografts in vivo. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2014, **14** (5), 762-770.

**Doležel M.** *Cílená radioterapie karcinomu prostaty*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-81-9.

**Dong Y., Yin S., Li J., Jiang C., Ye M., Hu H.** Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. *Apoptosis*. 2011, **16** (4), 394-403.

**Dos Santos F. A., Pereira M. C., de Oliveira T. B., Mendonça Junior F. J. B., de Lima M. D. C. A., Pitta M. G. D. R., Pitta I. D. R., de Melo Rêgo M. J. B., da Rocha Pitta M. G.** Anticancer properties of thiophene derivatives in breast cancer MCF-7 cells. *Anticancer Drugs*. 2018, **29** (2), 157-166.

**Dušek L., Mužík J., Kubásek M., Koptíková J., Žaloudík J., Vyzula R.** Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 22. 3. 2021]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802-8861.

**Dvořáček J.** *Nádory prostaty*. In: Dvořáček J., Babjuk M. *Onkourologie*, 1. vydání. Praha, 2005 Galén, 225-242. ISBN 80-7262-349-4.

**Elbaz H. A., Stueckle T. A., Tse W., Rojanasakul Y., Dinu C.** Digitoxin and its analogs as novel cancer therapeutics. *Experimental Hematology and Oncology*. 2012, **1** (1), 1-10.

**European association of urology.** *European Association of Urology* [online]. 2017. Dostupný na WWW: <https://patients.uroweb.org/cz/benignizvetseni-hyperplazie-prostaty-bph/> [cit. 15. 4. 2021].

**Fozzard H. A., Sheets M. F.** Cellular mechanism of action of cardiac glycosides. *Journal of the American College of Cardiology*. 1985, **5** (5), 10A-15A.

**Funk J. O.** Cell cycle checkpoint genes and cancer. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2005, 1-6. ISBN: 9780470015902.

**Gelman L., Feige J. N., Tudor C., Engelborghs Y., Wahli W., Desvergne B.** Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. *Nucl Recept Signal*. 2006, **4**, e010.

**Gomez-Manzano C., Fueyo J., Kyritsis A. P., Stesk P. A., Levin V. A., Alfred Yung W. K., Mcdonell T. J.** Characterization of p53 and p21 Functional Interactions in Glioma Cells en Route to Apoptosis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1997, **89** (14), 1036-1044.

**Gong X., Lin C., Cheng J., Su J., Zhao H., Liu T., Wen X., Zhao P.** Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing. *PLoS One*. 2015, **10** (6), e0130348.

**Gottlieb T. M., Oren M.** P53 and apoptosis. *Seminars in Cancer Biology*. 1998, **8** (5), 359-368.

**Gurumurthy S., Vasudevan K. M., Rangnekar V. M.** Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2001, **20**, 225-243.

**Hanahan D., Weinberg R. A.** The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000, **100** (1), 57-70.

**Hara M., Inorre T., Fukuyama T.** Some physico – chemical characteristics of gamma-seminoprotein, an antigenic component specific for human seminal plasma. *Japanese Journal of Legal Medicine*. 1971, **25**, 322-324.

**Härkönen P. L., Mäkelä S.** Role of estrogens in development of prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004, **92** (4), 297-305.

**Hauptman P. J., Garg R., Kelly R. A.** Cardiac glycosides in the next millennium. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1999, **41** (4), 247-254.

**Haux J.** Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Medical Hypotheses*. 1999, **53** (6), 543-548.

**Heinlein C. A., Chang C.** Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews*. 2004, **25** (2), 276-308.

**Hirama T., Koeffler P. H.** Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *The Journal of The American Society of Hematology*. 1995, **86** (3), 841-854.

**Hollman A.** Plants and cardiac glycosides. *British Heart Journal*. 1985, **54** (3), 258-261.

**Horoszewicz J. S., Kawinski E., Murphy G. P.** Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Research*. 1987, **7** (5B), 927-935.

**Horwitz K. B., Jackson T. A., Bain D. L., Richer J. K., Takimoto G. S., Tung L.** Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Molecular Endocrinology*. 1996, **10** (10), 1167-1177.

**Hradil D., Študent V. jr., Král M., Študent V.** Diagnostika a staging karcinomu prostaty. *Onkologie*. 2014, **8** (1), 15-18.

**Hrdina V., Hrdina R., Jahodář L., Martinec Z, Měrka V.** *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Galén, 2004. ISBN 8072622560.

**Chang H., Li J., Cao Y., Liu T., Shi S., Chen W.** Bufadienolides from *Venenum Bufonis* Inhibit mTOR-Mediated Cyclin D1 and Retinoblastoma Protein Leading to Arrest of Cell Cycle in Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018, **2018**, 1-9.

**Chao M., Chen T., Huang H., Chang Y., Huanghu W., Lee Y., Teng C., Pan S.** Lanatoside C, a cardiac glycoside, acts through protein kinase C $\delta$  to cause apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*. 2017, **7** (1) 1-12.

**Chou J., Li J., Chen Ch., Chen Ch., Lin H., Wang P. S.** Inhibitory Effects of Digoxin and Digitoxin on Cell Growth in Human Ovarian Cancer Cell Line SKOV-3. *Integrative Cancer Therapies*. 2021, **20**, 1-8.

**Ikeda K., Horie-inoue K., Inoue S.** Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2019, **191**, 1-7.

**Jacobson M. D.** Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. *Current Biology*. 1997, **7** (5), R277-R281.

**Jamaspishvili T., Kral M., Khomeriki I., Student V., Kolar Z., Bouchal J.** Urine markers in monitoring for prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2010, **13** (1), 12-19.

**Kaushik V., Yakisich J. S., Azad N., Kulkarni Y., Venkatadri R., Wright C., Rojanasakul Y., Iyer A. K. V.** Anti-Tumor Effects of Cardiac Glycosides on Human Lung Cancer Cells and Lung Tumorspheres. *Journal of Cellular Physiology*. 2017, **232** (9), 2497-2507.

**Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R.** Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972, **26** (4), 239-257.

**Klečka J., Holubec L., Pešta M., Hora M., Topolčan O., Eret V.** Nádorové markery karcinomu prostaty. *Česká urologie*. 2008, **12** (3), 173-185.

**Kometiani P., Liu L., Askari A.** Digitalis-Induced Signaling by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Human Breast Cancer Cells. *Molecular Pharmacology*. 2004, **67** (3), 929-936.

**Král M., Vyhnánková V., Študent V., Bouchal J.** Genetické riziko karcinomu prostaty. *Česká Urologie*. 2010, **14** (3), 139-147.

**Langhans S. A.** Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*. 2018, **9**, 6.

**Leu W., Chang H., Chan S., Hsu J., Yu Ch., Hsu L., Chen I., Guh J., Chuu Ch.** Reevesioside A, a Cardenolide Glycoside, Induces Anticancer Activity against Human Hormone-Refractory Prostate Cancers through Suppression of c-myc Expression and Induction of G1 Arrest of the Cell Cycle. *PLoS ONE*. 2014, **9** (1), 1-13.

**Leu W., Wang Ch., Hsu J., Chen I., Chang H., Guh J.** Ascleposide, a natural cardenolide, induces anticancer signaling in human castration-resistant prostatic cancer through Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase internalization and tubulin acetylation. *The Prostate*. 2020, **80** (4), 305-318.

**Lin S., Chang H., Lai Y., Lin Ch., Chen M., Chang G., Tsai M., Chen J., Chellappan S. P.** Digoxin Suppresses Tumor Malignancy through Inhibiting Multiple Src-Related Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE*. 2015, **10** (5), 1-14.

**Lomazzi M., Moroni M. C., Jensen M. R., Frittoli E., Helin K.** Suppression of the p53- or pRB-mediated G1 checkpoint is required for E2F-induced S-phase entry. *Nature Genetics*. 2002, **31** (2), 190-194.

**Lukeš M., Záleský M., Zchoval, R., Urban M., Heráček J.** Prostatický specifický antigen a karcinom prostaty. *Klinická onkologie*. 2001, **14**, 114-119.

**Mačák J., Mačáková J., Dvořáčková J.** *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.

**Makarov D. V., Loeb S., Getzenberg R. H., Partin A. W.** Biomarkers for prostate cancer. *Annual Review of Medicine*. 2009, **60**, 139-51.

**Matoušková M.** Farmakoterapie karcinomu prostaty. *Remedia*. 2006, 84-90.

**Michalak K., Rárová L., Kubala M., Štenclová T., Strnad M., Wicha J.** Synthesis and evaluation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-ase inhibiting and cytotoxic in vitro activities of oleandrogenin and its selected 17 $\beta$ -(butenolidyl)- and 17 $\beta$ -(3-furyl)- analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, **202**, 1-13.

**Nath S., Devi G. R.** Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics*. 2016, **163**, 94-108.

**Newman R. A., Yang P., Pawlus A. D., Block K. I.** Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Molecular Interventions*. 2008, **8** (1), 36-49.

**Mijatovic T. Van Quaquebeke E., Delest B., Debeir O., Darro F., Kiss R.** Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2007, **1776** (1), 32-57.

**Patočka J.** Kardiotoxické glykosidy. *Vojenské zdravotní listy*. 2008, **77** (4), 160-168.

**Pešl M., Zámečník L., Soukup V., Dvořáček J.** Prostatický specifický antigen a odvozené parametry. *Urologie pro praxi*. 2005, **5** (2), 59-63.

**Podrazil M., Špíšek R., Bartůňková J.** Imunoterapie karcinomu prostaty. *Urologie v praxi*. 2016, **17** (4), 159-166.

**Pollard B. S., Suckow M. A., Wolter W. R., Starr J. M., Eidelman O., Dalgard C. L., Kumar P., Battacharyya S., Srivastava M., Biswas R., Wilkerson M. D., Zhang X., Yang Q., Pollard H. B.** Digitoxin Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal-Transition in Hereditary Castration Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2019, **9**, 630.

**Privalsky M. L.** The Role of Corepressors in Transcriptional Regulation by Nuclear Hormone Receptors. *Annual Review of Physiology*. 2004, **66** (1), 315-360.

**Quinn D. I., Henshall S. M., Sutherland R. L.** Molecular markers of prostate cancer outcome. *European Journal of Cancer*. 2005, **41** (6), 858-87.

**Rascón-Valenzuela L., Valázquez C., Garibay-Escobar A., Medina-Juárez L. A. Vilegas W., Robles-Zepeda R. E.** Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015, **171**, 280-286.

**Renaud J. P., Moras D.** Structural studies on nuclear receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000, **57**, 1748-1769.

**Roskoski R.** Src protein–tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, **324** (4), 1155-1164.

**Sampson N., Neuwirt H., Pühr M., Klocker H., Eder I. E.** In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2013, **20** (2), R49-R64.

**Sankari S. L., Masthan K. M. K., Aravindha Babu N., Bhattacharjee T., Elumalai M.** Apoptosis in Cancer - An Update. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012, **13** (10), 4873-4878.

**Shen J. J., Zhan Y. C., Li H. Y., Wang Z.** Ouabain impairs cancer metabolism and activates AMPK-Src signaling pathway in human cancer cell lines. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020, **41** (1), 110-118.

**Schiewer M. J., Augello M. A., Knudsen K. E.** The AR dependent cell cycle: Mechanisms and cancer relevance. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012, **352** (1-2), 34-45.

**Schneider N. F., Geller F. C., Persich L., Marostica L. L., Pádua R. M., Kreis W., Braga F. C., Simões C. M.** Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by the cardenolides digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin in human lung cancer cell line. *Natural Product Research*. 2016, **30** (11), 1327-1331.

**Schneider N. F., Silva I. T., Persich L., de Carvalho A., Rocha S. C., Marostica L., Ramos A. C. P., Taranto A. G., Pádua R. M., Kreis W., Barbosa L. A., Braga F. C., Simoes C. M. O.** Cytotoxic effects of the cardenolide convallatoxin and its Na,K-ATPase regulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017, **428** (1-2), 23-39.

**Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A.** Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018, **68** (1), 7-30.

**Skou J. C.** The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta*. 1957, **23** (2), 394-401.

**Slabý et al.** Molekulární medicína. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-121-6.



**Smalley K. S., Lioni M., Herlyn M.** Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. 2006, **42** (8-9), 242-247.

**Song X., Zhang C., Zhao M., Chen H., Liu X., Chen J., Lonard D. M., Qin L., Xu J., Wang X., Li F., O'Malley B. W., Wang J.** Steroid Receptor Coactivator-3 (SRC-3/AIB1) as a Novel Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer and Its Inhibition with a Phospho-Bufalin Prodrug. *PLoS One*. 2015, **10** (10), e0140011.

**Stenkvist B.** Is digitalis a therapy for breast carcinoma? *Oncology reports*. 1999, **6**, 493-499.

**Steyn P. S., Van Heerden F. R.** Bufadienolides of plant and animal origin. *Natural product reports*. 1998, **15**, 397-413.

**Štern P., Vranovský K., Šafařík K.** Karcinom prostaty – molekulární podstata, diagnostika a ekonomika prevence. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2008, **16** (37), 19-26.

**Takai N., Ueda T., Nishida M., Nasu K., Narahara H.** Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2008, **21**, 637-643.

**Thoma C. R., Zimmermann M., Agarkova I., Kelm J. M., Krek W.** 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, **69-70**, 29-41.

**Trojanowsky M., Vidovic D., Simanski S., Penas C., Schurer S., Ayad N. G.** Screening of cell cycle fusion proteins to identify kinase signaling networks. *Cell Cycle*. 2015, **14** (8), 1274-1281.

**Varbanov H. P., Kuttler F., Banfi D., Turcatti G., Dyson P. J., Ahmad A.** Repositioning approved drugs for the treatment of problematic cancers using a screening approach. *PLOS ONE*. 2017, **12** (2), e0171052.

**Vlaeminck-Guillem V., Gillet G., Rimokh R.** SRC: marker or actor in prostate cancer aggressiveness. *Frontiers in Oncology*. 2014, **4**, 222.

**Vítek P., Novotný J.** Karcinom prostaty (C61). In: Novotný J., Vítek P., Adámková Krákorová D., Büchler T., Feranec R., Fischerová D., Foldyna M., Fraňková S., Gürlich R., Hakl M., Halámková J., Holečková P., *et al.* *Onkologie v klinické praxi*. Standardní přístupy v diagnostice a léčbě

vybraných zhoubných nádorů. 1. vydání. Praha. Mladá fronta a.s. s. 2012, 337-358.

**Wang M. C., Valenzuela L. A. Murphy G. P.; Chu T. M.** Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*. 1979, **17**, 159-163.

**Wang Y., Lonard D. M., Yu Y., Chow D. C., Palzkill T. G., Wang J., Qi R., Matzuk A. J., Song X., Madoux F., Hodder P., Chase P., Griffin P. R., Zhou S., Liao L., Xu J., O'Malley B. W.** Bufalin is a potent small-molecule inhibitor of the steroid receptor coactivators SRC-3 and SRC-1. *Cancer Research*. 2014, **74** (5), 1506-1517.

**Weihua Z., Warner M., Gustafsson J. A.** Estrogen receptor beta in the prostate. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002, **193**, 1-5.

**Weyhenmeyer B., Murphy A. C., Prehn J. H., Murphy B. M.** Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Experimental Oncology*. 2012, **34**, 192-199.

**Wilding G., Soulie P., Trump D., Das-Gupta A., Smali E.** Results from a pilot phase I trial of gefitinib combined with docetaxel and estramustine in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*. 2006, **106**, 1917-1924.

**Winnicka K., Bielawski K., Bielawska A.** Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2006, **63** (2), 109-15.

**Withering W.** An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases. *G. G. J. and J. Robinson*, London, 1785.

**Wu N., Liu S., Guo C., Hou Z., Sun M. Z.** The role of annexin A3 playing in cancers. *Clinical and Translational Oncology*. 2013, **15** (2), 106-10.

**Wu S., Bau D., Hsiao Y., Li K., Hsia T., Lien J., Ko Y., Hsu W., Yang S., Huang Y., Chung J.** Bufalin induces apoptosis in vitro and has Antitumor activity against human lung cancer xenografts in vivo. *Environmental Toxicology*. 2017, **32** (4), 1305-1317.

**Xie Ch., Chan W. Y., Yu S., Zhao J., Cheng Ch. H. K.** Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through

reactive oxygen species generation and JNK activation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011, **51** (7), 1365-1375.

**Yao V., Berkman C. E., Choi J. K., O'keefe D. S., Bacich D. J.** Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid. *The Prostate*. 2010, **70** (3), 305-316.

**Yeh J., Huang W. J., Kan S., Wang P. S.** Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *The Prostate*. 2003, **54** (2), 112-124.

**Yu C. H., Kan S. F., Pu H. F., Jea Chien E., Wang P. S.** Apoptotic signaling in bufalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. *Cancer Science*. 2008, **99**, 2467-2476.

**Yu Z., Feng H., Zhuo Y., Li M., Zhou X., Huang L., Zhang X., Zhou Z., Zheng C., Jiang Y., Le F., Yu D., Cheng A., Su X., Gao Y.** Bufalin inhibits hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma development through androgen receptor dephosphorylation and cell cycle-related kinase degradation. *Cellular Oncology*. 2020, **43**, 1129–1145.

**Zalucki M. P., Lincoln P. Brower L. P., Alonso-M A.** Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth of first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. *Ecological Entomology*. 2001, **26** (2), 212-224.

**Zhang Y., Dong Y., Melkus M. W., Yin S., Tang S. N., Jiang P., Pramanik K., Wu W., Kim S., Ye M., Hu H., Lu J., Jiang C.** Role of P53-Senescence Induction in Suppression of LNCaP Prostate Cancer Growth by Cardiotonic Compound Bufalin. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2018, **17** (11), 2341-2352.

**Zhai X. F., Fang F. F., Liu Q., Meng Y. B., Guo Y. Y., Chen Z.** MiR-181a contributes to bufalin-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2013, **13**, 325.

**Zellweger T., Ninck C., Bloch M., et al.** Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *International Journal of Cancer*. 2005, **113**, 619-628.

**Ziskind B., Halioua B.** Contribution of Ancient Egypt to cardiovascular medicine. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux – Pratique*. 2004, **97**, 370-374.