

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



**Štúdium vplyvu šafranu siateho (*Crocus sativus* L.) na
životaschopnosť nádorových buniek a ich schopnosť
odpovedi na poškodenie DNA**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Samuel Školuda
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný obor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Lucie Béresová, Ph.D.
Rok	2019

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

Podpis

Na tomto mieste by som chcel poďakovať svojej vedúcej bakalárskej práce Mgr. Lucii Béresovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a v neposlednom rade za nekonečnú trpezlivosť. Ďalej ďakujem celému kolektívu z Laboratória Integrity Genómu, Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny za umožnenie spracovania mojej bakalárskej práce práve na tomto pracovisku. Špeciálne poďakovanie patrí kancelárii (3.58), ktorej osadenstvo bolo vždy ochotné mi pomôcť bez ohľadu na veľkosť danej úlohy. Moje poďakovanie patrí aj mojej rodine a priateľom za podporu a pomoc počas štúdia.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Samuel Školuda
Názov práce	Štúdium vplyvu šafranu siateho (<i>Crocus sativus</i> L.) na životaschopnosť nádorových buniek a ich schopnosť odpovedi na poškodenie DNA
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Ústav molekulárnej a translačnej medicíny
Vedúci práce	Mgr. Lucie Béresová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Nádorové ochorenia sú pretrvávajúcim celosvetovým problémom s vysokou úmrtnosťou a nedostačujúcou liečbou. Okrem klasických, stále nezastupiteľných konvenčných metód liečby (chemoterapia, ožarovanie) sa výskum zaujíma aj o prírodné látky, ktoré môžu pôsobiť prevenčne voči nádorovým ochoreniam. Zaujímavé je tiež štúdium účinku prírodných látok v kombinácií s konvenčnými metódami. Príkladom práve takýchto látok sú koreniny, pod ktoré spadá aj šafran siaty (<i>Crocus sativus</i> L.). Témou bakalárskej práce je štúdium vplyvu celkového extraktu šafranu na životaschopnosť nádorovej línie HCT116 WT a overenie, či môže šafran zvýšiť citlivosť tejto línie k ionizujúcemu žiareniu alebo práve naopak, vykazovať ochranné účinky. Teoretická časť obsahuje zhrnutie všeobecných poznatkov o šafrane a mechanizmoch pôsobenia extraktu šafranu a jeho zložiek na životaschopnosť rôznych nádorových línií. Zahrnutá je taktiež problematika poškodenia DNA ionizujúcim žiarením (IR), mechanizmy opravy dvojvláknových zlomov DNA, regulácia kontrolných bodov bunkového cyklu a signálnych dráh vedúcich k oprave poškodenej DNA alebo bunkovej smrti. Experimentálna časť práce je zameraná na štúdium vplyvu celkového extraktu šafranu na životaschopnosť nádorovej línie HCT116 WT bez, a spolu</p>

s pôsobením IR. Po ošetrovaní buniek extraktom šafranu a následnom vystavení IR bola pomocou prietokovej cytometrie sledovaná distribúcia buniek v bunkovom cykle, hlavne prítomnosť sub-G1 populácie. Pomocou Western blotu v kombinácii s imunologickou detekciou bolo sledované, či ošetrovanie šafranom vyvoláva aktiváciu proteínov regulujúcich odpoveď bunky na poškodenie DNA a taktiež aktiváciu kontrolných bodov bunkového cyklu. Imunofluorescenčné farbenie ukazovateľov poškodenia DNA ako je γ H2AX, 53BP1 a BRCA1 v spojení s priamou mikroskopiou umožnilo overiť aktiváciu proteínov bunkovej odpovedi na poškodenie DNA vyvolanej pomocou IR. Výsledky tejto práce naznačujú, že ošetrovanie buniek celkovým extraktom šafranu znižuje proliferáciu nádorovej línie HCT116 WT, predlžuje S fázu a mierne zvyšuje G2 fázu bunkového cyklu. Imunodetekciou pro-apoptických proteínov a proteínov odpovedajúcich na poškodenie DNA bol dokázaný vplyv šafranu na životaschopnosť bunkovej línie HCT116 WT a pokles schopnosti aktivácie proteínov podieľajúcich sa na regulácii schopnosti bunkovej odpovedi na DNA poškodenie po vystavení IR. Zároveň bol v kombinácii s IR pozorovaný senzitivizujúci vplyv extraktu šafranu na nádorovú líniu HCT116 WT. Na základe získaných dát sa môžeme domnievať, že celkový extrakt šafranu má mierny cytotoxický a senzitivizujúci vplyv na nádorovú líniu HCT116 WT, ktorý by mohol byť zosilnený spolu s použitím IR, čo bude predmetom ďalšieho štúdia.

Kľúčové slová	šafran, nádorová línia HCT116 WT, krocín, Western blot, ionizujúce žiarenie, oprava DNA
Počet strán	65
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Samuel Školuda
Title of thesis	Study of saffron (<i>Crocus sativus</i> L.) influence on viability of tumor cell lines and its ability to repair DNA damage
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	Mgr. Lucie Béresová, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>Tumor diseases are a global persistent problem with high mortality and insufficient treatment. Aside from classical, still not replaceable conventional methods of treatment (chemotherapy, irradiation), research has begun to look for alternatives such as natural substances, that can act as preventive agents against cancer. Interesting is also the study of effect of natural substances in combination with conventional methods of treatment. An example of such substances are spices, which also include saffron (<i>Crocus sativus</i>, L.) The aim of this bachelor thesis is to study the effect of the total extract of saffron on the viability of HCT116 WT tumor cell line and to verify that saffron can increase the sensitivity of this line to ionizing radiation or, on the contrary, prove the protective attributes of saffron. The theoretical part summarizes the general knowledge of saffron and the mechanisms of action of saffron extract and its components, on the viability of various tumor cell lines. Covered are also DNA damage by ionizing radiation (IR) repair mechanisms for double-stranded DNA breaks, regulation of cell cycle checkpoints and signaling</p>

pathways leading to repair of damaged DNA or cell death. The experimental part is a study of the effect of the total extract of saffron on the viability of HCT116 WT tumor cell line without, and with IR. After treatment of the cells with saffron extract and subsequent IR exposure, cell distribution was monitored by flow cytometry with emphasis on presence of sub-G1 population. Using Western blot in combination with immunological detection proved to be a valuable tool in examining whether saffron treatment induced activation of the cell-responsive proteins to DNA damage and activation of cell cycle checkpoints. Immunofluorescence staining of DNA damage markers such as γ H2AX, 53BP1 and BRCA1 followed by direct microscopy allowed verification of activation of cellular response proteins to IR-induced DNA damage. The results of this work demonstrate that treatment of cells with complete extract of saffron decreases proliferation of tumor cell line HCT116 WT, prolongs S phase and slightly increases G2 phase of cell cycle. With help of immunodetection of pro-apoptotic proteins and DNA damage response proteins an effect of saffron was proved on cell viability HCT116 WT tumor cell line and decrease of ability to activate proteins regulating cell response to DNA damage after exposure to IR. Furthermore, we have observed that saffron extract has sensitizing effect on HCT116 WT tumor cell line to IR. On the basis of acquired data we are suggesting that complete extract of saffron has mild cytotoxic and sensitizing effect on tumor cell line HCT116 WT and could be increased in combination with IR, which is a subject of further studies.

Keywords	saffron, tumor cell line HCT116 WT, crocin, Western blot, ionizing radiation, repair of DNA damage
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1 ÚVOD	12
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	14
2.1 Šafran siaty	14
2.1.1 Chemické zloženie	14
2.1.2 Účinok šafranu a jeho jednotlivých zložiek na nádorové línie	16
2.1.2.1 Pro-apoptický účinok	17
2.1.2.2 Inhibícia proliferácie	18
2.1.2.3 Interakcia s DNA štruktúrami	19
2.1.2.4 Potlačenie polymerizácie mikrotubúl	19
2.2 Bunkový cyklus	20
2.2.1 Kontrolné body bunkového cyklu a ich regulácia	21
2.3 Poškodenie DNA	23
2.3.1 Efekt ionizujúceho žiarenia	24
2.3.2 Odpoveď na poškodenie DNA vyvolané ionizujúcim žiarením	24
2.3.2.1 Nehomológne spájanie koncov	25
2.3.2.2 Homológna rekombinácia	27
2.4 Bunková smrť	29
2.4.1 Nekróza	29
2.4.2 Apoptóza	30
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	33
3.1 Materiál	33
3.1.1 Biologický materiál	33
3.1.2 Chemikálie a súpravy	33
3.1.3 Roztoky	35
3.1.4 Prístroje	36
3.1.5 Software	36
3.2 Metódy	37
3.2.1 Kultivácia bunkovej línie	37
3.2.2 Rozmrazovanie/zamrazovanie bunkovej línie	37
3.2.3 Príprava vodného extraktu šafranu	37
3.2.4 Detekcia cytotoxického efektu šafranu pomocou prietokovej cytometrie a farbenia propidium jodidom	38
3.2.5 Elektroforetická separácia proteínov v polyakrylamidovom géle za prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	39
3.2.6 Western blot a imunologická detekcia proteínov	40
3.2.7 Cytospin a imunofluorescenčná analýza ukazovateľov DNA poškodenia pomocou mikroskopie	41

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA	43
4.1 Štúdium cytotoxického vplyvu šafranu na nádorovú líniu HCT116 WT	43
4.2 Štúdium vplyvu extraktu šafranu na schopnosť odpovedi línie HCT116 WT na poškodenie DNA	47
4.3 Imunofluorescenčná analýza ukazovateľov poškodenia DNA po ošetrovaní buniek extraktom šafranu a IR pomocou mikroskopie	50
5 ZÁVER.....	54
6 LITERATÚRA	55
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	64

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

- Objasnenie významu témy bakalárskej práce vďaka kritickému zhodnoteniu súčasnej literatúry:
 - Spracovanie aktuálnych poznatkov o šafrane so zameraním sa na vplyv celkového extraktu šafranu na životaschopnosť nádorových buniek
 - Zhrnutie problematiky opravných dráh DNA po poškodení ionizujúcim žiarením so zameraním sa na mechanizmy opravy dvojlákových zlomov, regulácie kontrolných bodov bunkového cyklu a mechanizmov bunkovej smrti

Experimentálna časť

- Overenie cytotoxického efektu celkového extraktu šafranu na nádorovú líniu HCT116 WT bez, i spolu s pôsobením ionizujúceho žiarenia
- Využitie metódy Western blot na sledovanie aktivácie dráh programovanej bunkovej smrti, kontrolných bodov bunkového cyklu a proteínov podieľajúcich sa na oprave poškodenej DNA
- Štúdium vplyvu extraktu šafranu na opravné mechanizmy DNA u buniek vystavených ionizujúcemu žiareniu pomocou imunofluorescenčnej mikroskopie

1 ÚVOD

V porovnaní s klasickými ochoreniami sú práve nádorové ochorenia považované za nebezpečnú hrozbu pre celý svet vďaka svojmu rýchlemu postupu, stupňu invazívnosti a nepravidelnej odpovede na liečbu. Samozrejme existujú konvenčné metódy a liečebné postupy ako chemoterapia, rádioterapia či katalytická terapia a neustále sa skúmajú a vyvíjajú nové prostriedky na boj proti rakovine. Zaujímavým však môže byť aj zameranie sa na prírodné látky, ktoré môžu pôsobiť chemoprevenčne.

Chemoprevencia sa dá definovať ako využívanie prírodných zložiek schopných zastavenia procesu vedúcemu k vzniku nádorového ochorenia. Prírodné zlúčeniny vykazujúce chemopreventívne účinky v kombinácii s konvenčnou terapiou predstavujú nový pohľad na liečbu rakoviny, ktorý sa zdá byť sľubný (Rejhová *et al.*, 2018).

Koreniny sú známe už tisícky rokov vďaka svojmu využitiu ako doplnok stravy pre svoju chuť a farbu. Avšak v ľudovej medicíne sa niektoré z nich používali aj ako prírodné liečivá práve pre svoj obsah biologicky aktívnych, chemopreventívnych zlúčenín a priaznivý vplyv na zdravie (Zheng *et al.*, 2016).

Šafran používaný ako korenine, sú vysušené predĺžené piestiky modrej kvitnúcej rastliny Šafranu siateho (*C. sativus* L.), spadajúcej do čeľade kosatcovitých (*Iridaceae*), s pôvodom v Stredomorí. Vďaka svojim chemoprevenčným účinkom, ktoré vykazuje, sa o šafran začína zaujímať aj moderná medicína. Je známe, že šafran znižuje proliferáciu nádorových buniek, má antioxidantné účinky, spúšťa mechanizmy vedúce k apoptóze ale takisto pôsobí protizápalovo a stimuluje imunitnú odpoveď (Bolhassani *et al.*, 2014).

Extrakty šafranu pôsobi na široké spektrum nádorových línií vrátane kolorektálneho karcinómu, kde zvyšuje indukciu DNA poškodenia a následnej apoptózy (Bajbouj *et al.*, 2012). Testujú sa hlavne jednotlivé zložky šafranu ako je krocín, krocetín či safranal. Zaujímavým však môže byť účinok celkového extraktu šafranu, pretože obsahuje pomer všetkých aktívnych zložiek tak, ako sa v prírode vyskytujú a ako sú prijímané v potrave (Nair *et al.*, 1991; Abdullaev a Espinosa-Aguirre, 2004; Feizzadeh *et al.*, 2008; Kianbakht a Mozaffari, 2009; Magesh *et al.*, 2009).

V bakalárskej práci sme sa venovali štúdiu účinku celkového vodného extraktu šafranu na bunkovú líniu kolorektálneho karcinómu HCT116 WT. Sledovaná bola hlavne životaschopnosť tejto línie a schopnosť bunkovej odpovedi na poškodenie DNA po ošetrení vodným extraktom šafranu a to bez, a spolu s pôsobením IR, ktoré sa využíva

ako konvenčná terapia pri nádorových ochoreniach (Badiyan *et al.*, 2017; Haque *et al.*, 2017).

Táto práca vznikla v rámci spolupráce s výskumom prof. Hassan Ashktoraba z Howard University vo Washingtone, ktorý sledoval zníženie proliferácie nádorovej línie HCT116 WT po ošetrovaní buniek vodným extraktom šafranu a prejavil záujem o štúdium mechanizmu pôsobenia šafranu v kombinácii s IR. Zároveň nám poskytol vzorky šafranu, ktorého účinky sme sledovali. Táto práca môže byť prínosná hlavne z dôvodu, že tematike sledovanie bunkovej odpovedi na poškodenie DNA po ošetrovaní vodným extraktom šafranu v kombinácii s IR sa zatiaľ nikto nevenoval.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Šafran siaty

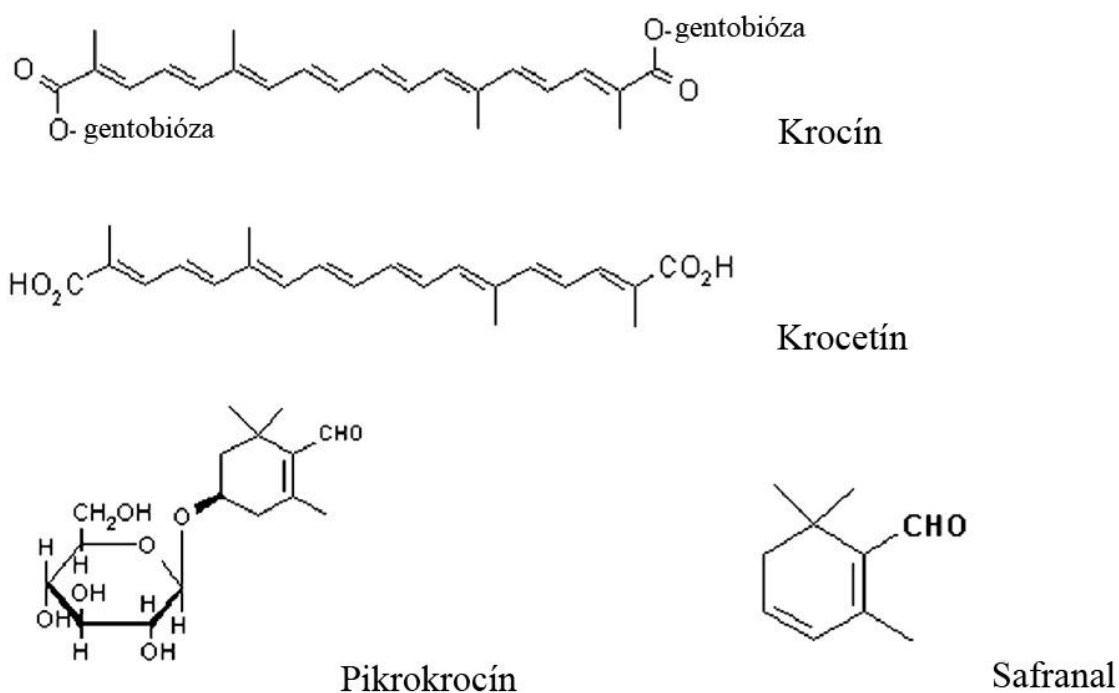
Šafran so svojou jedinečnou arómou a farbou sa nedá pokladať za novinku keď sa spomína spolu s kuchyňou. Jeho využitie sa dá sledovať až 3000 rokov dozadu keď bol používaný na dochucovanie jedál, vo farbiarskom priemysle, ale aj ako platidlo. Jeho meno pochádza z Arabského slova *zafaran*, čo znamená žltý, ukazujúc na spojitosť medzi jeho typickou farbou a zároveň vysokým obsahom karotenoidov v jeho piestiku (Caballero-Ortega *et al.*, 2007).

Šafran, ktorý sa používa ako korenie, sú rozdrvené piestiky na modro kvitnúcej rastliny Šafranu siateho (*Crocus sativus* L.) Rastlina spadá do čeľade kosatcovitých (*Iridaceae*) a pestuje sa na viacerých miestach so suchým a miernym podnebím, kam spadá napríklad Španielsko, Mexiko, India, Nový Zéland, Austrália, Azerbajdžan a Irán. Šafran je hlavne známy ako najdrahšie korenie na svete a preto si vyslúžil aj pomenovanie „červené zlato“, ktoré získal v Iráne (Christodoulou *et al.*, 2015). Na vyprodukovanie jedného kilogramu sa využije odhadom 150 000 kvetov Šafranu siateho. Piestiky využívané ako korenie, musia byť ručne spracované ihneď po rozkvitnutí, aby sa ochránili požadované prchavé zložky pred vyparením sa v horúcom dni (Melnyk *et al.*, 2010). Celosvetová produkcia šafranu je odhadovaná na 190 ton, z čoho až 90 % pochádza z Iránu (Caballero-Ortega *et al.*, 2007).

Už v minulosti bol šafran používaný nielen ako pochutina a farbivo, ale svoje uplatnenie našiel aj v ľudovej medicíne. Doktori ho využívali ak pacient trpel kŕčmi, astmou, menštruačnými poruchami a problémami s pečťou. V rámci medicíny bol a aj je šafran využívaný ako stimulant, afrodiziakum a ako antidepresívum (Schmidt *et al.*, 2007).

2.1.1 Chemické zloženie

Analýza chemického zloženia šafranu ukázala, že šafran sa skladá z 63 % cukrov, 12 % proteínov, 10 % vody, 5 % tukov, 5 % vlákniny, 5 % minerálov a stopového množstva thiamínu a riboflavínu (Ríos *et al.*, 1996). Šafran siaty obsahuje štyri hlavné aktívne látky zaujímavé najmä z farmakologického hľadiska. Ide o pikrokrocín, safranal, krocetín a krocín (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Safranal je najmenej obsiahnutý v šafrane so zastúpením v priemere 0,22 %, nasleduje pikrokrocín v priemernom obsahu 14,04 % a najviac zastúpené sú krocín a krocetín v priemere s 29 % (Lage a Cantrell, 2009).



Obr. 1 Chemická štruktúra krocínu, krocetínu, pikrokrocínu a safranal (prevzaté a upravené od Melnyk et al., 2010)

Krocín spolu s krocetínom sú vďaka svojmu bohatému zastúpeniu zároveň najčastejšie testovanými látkami (Festuccia *et al.*, 2019; Jafarisani *et al.*, 2018; Kalalinia *et al.* 2018).

Pikrokrocín je zodpovedný za horkastú chuť šafranu. Je to monoterpénový glykozid a zároveň prekursor safranal, ktorý vzniká vysušením. 70 % všetkých prchavých zložiek v šafrane je práve safranal. Ide o cyklický terpénový aldehyd zodpovedný hlavne za arómu šafranu. Na čerstvých piestikoch sa však žiadna aróma nenachádza. Špecifická vôňa sa objavuje až pri sušení a skladovaní spracovaného šafranu (Christodoulou *et al.*, 2015).

Krocetín je 20-uhlíková dikarboxylová kyselina spadajúca do skupiny prírodných karotenoidov ale nemá provitamínovú funkciu. Presný mechanizmus ochranného účinku, ktorý krocetín vykazuje nie je zatiaľ známy. Jedna z hypotéz spomína inhibíciu aktivity DNA syntézy a RNA polymerázy II (Gutheil *et al.*, 2012). Zároveň je to prekursor krocínu.

Krocín, ktorý dáva šafranu jeho typickú farbu, je esterom krocetínu a jedná sa o veľmi zaujímavú zložku z hľadiska medicíny. Ide o dokázaný antioxidant a vykazuje neuroprotektívny účinok (Ochiai *et al.*, 2007). Takisto bol pozorovaný inhibičný efekt na proliferáciu nádorových línií *in vitro* (Escribano *et al.*, 1996)

Na extrakciu aktívnych šafranových zložiek sa používajú rôzne rozpúšťadlá a postupy. Okrem vody sú na extrakciu používané roztoky metanolu, etanolu alebo vodné roztoky týchto alkoholov v rôznych pomeroch (Kyriakoudi *et al.*, 2012; Kyriakoudi a Tsimidou, 2018). Podľa dostupnosti šafranu a potrebnej extrahovanej zložky sa ďalej volí vhodný postup extrakcie. Medzi najčastejšie používané spôsoby extrakcie patrí klasická mechanická extrakcia šafranu v rozpúšťadle pomocou trenia alebo vystavením mechanickým vibráciám. Jej nevýhodami je však spotrebovanie veľkých množstiev potrebného materiálu a často nízke výnosy (Sujata *et al.*, 1992; Cusano *et al.*, 2018). Ďalším možným prístupom je extrakcia za prítomnosti ultrazvuku. Hlavnou prednosťou tejto metódy je zníženie spotreby extrahovaného materiálu, či významné skrátenie času potrebného na extrakciu (Ameer *et al.*, 2017; Chemat *et al.*, 2017). Medzi významné pokročilé techniky extrakcie patrí však aj extrakcie za použitia mikrovln (Da Porto a Natolino 2018). Využitie mikrovln je nezávadné pre životné prostredie z dôvodu nízkej spotreby energie a možnosti použitia širokého spektra netoxických rozpúšťadiel (Kaufmann a Christen, 2002; Angiolillo *et al.*, 2015).

Pikrokrocín je možné izolovať z šafranových piestikov pomocou Soxhletovej extrakcie s použitím dietyléru, petroléru a metanolu (Tarantilis *et al.*, 1994) a prchavé zložky sa dajú získať pomocou destilácie s vodnou parou (Melnik *et al.*, 2010). Extrahovať celkový obsah šafranu so zachovanými pomermi aktívnych zložiek je však dôležité pri výskume použitia extraktu šafranu vo svojom prirodzenom stave.

2.1.2 Účinok šafranu a jeho jednotlivých zložiek na nádorové línie

Už bolo poznamenané, že šafranové karotenoidy vykazujú chemopreventívny efekt v prípade viacerých nádorových línií a *in vivo* modelov (García-Olmo *et al.*, 1999; Jagadeeswaran *et al.*, 2000). Väčšina štúdií sa však zaoberá jednotlivými zložkami, hlavne krocínom a nie kompletným extraktom (Bakshi *et al.*, 2010; Festuccia *et al.*, 2014). Účinnosť celkového extraktu šafranu ale aj jeho jednotlivých zložiek sa v publikáciách líši. Táto variabilita môže byť daná biologickým pozadím použitím nádorovej línie napr. defekt, prípadne strata signálneho proteínu (Bajbouj *et al.*, 2012) alebo vo variácií metód, ktoré boli použité na extrakciu aktívnych zložiek zo šafranu (Bakshi *et al.*, 2010 Samarghandian *et al.*, 2011; D'Alessandro *et al.*, 2013).

Povrchová aplikácia šafranového extraktu inhibovala iniciáciu a postup kožných nádorov indukovaných 7,12-dimetylbenz(a)antracénom (DMBA) v modelových myšiach

(Salomi *et al.*, 1991). Podobne aj Nair *et al.* (1991b) zaznamenali, že myšie modely, ktoré boli ošetrované cisplatinou a následne im bol podaný extrakt šafranu vykazovali značný rozdiel medzi poklesom telesnej váhy, počtu leukocytov a hladiny hemoglobínu v porovnaní s kontrolnými modelmi. Extrakt šafranu podaný myšiam ošetrovaných cisplatinou im taktiež predĺžil dĺžku života a to takmer trojnásobne.

Je dokázané, že šafranový extrakt inhibuje syntézu nukleových kyselín a rast nádorových buniek, zatiaľ čo nenádorové bunky sú necitlivé k extraktu alebo len mierne citlivé (Jagadeeswaran *et al.*, 2000; Samarghandian *et al.*, 2011).

Etanolové ale aj vodné extrakty šafranu vykazujú antioxidantnú aktivitu, vplyv na imunitný systém, zvýšenie bunkovej diferenciácie a takisto reguláciu bunkového cyklu (Hosseinzadeh a Noraei, 2009; Bakshi *et al.*, 2010; Karimi *et al.*, 2010; Festuccia *et al.*, 2014; Bhandari, 2015; Bukhari *et al.*, 2018; Khorasanchi *et al.*, 2018).

2.1.2.1 Pro-apoptický účinok

Najpravdepodobnejším protirakovinovým účinkom karotenoidov obsiahnutých v šafranovom extrakte je aktivácia apoptózy, inak nazývanej aj programovaná bunková smrť (PCD; z angl. programmed cell death). Apoptóza bunkových línií ošetrovaných šafranom bola najčastejšie zistená na základe merania fragmentovanej DNA farebnej pomocou PI a merania bunkového cyklu, kde bunky s fragmentovanou DNA sú viditeľné ako nárast sub-G1 populácie (Tavakkol-Afshari *et al.*, 2008; Bakshi *et al.*, 2010) a taktiež najčastejšie pomocou Western blotu a detekciou pro-apoptických proteínov ako je BAX, p53, kaspáza 3, 8, 9 apod. (D'Alessandro *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Hlavne účinok krocínu a krocetínu bol pozorovaný ako zvýšenie apoptózy viacerých druhov nádorových línií *in vitro* a ako inhibícia rastu nádoru *in vivo* vrátane ľudských pankreatických, prsníkových a kolorektálnych nádorových buniek (Escribano *et al.*, 1996; Bakshi *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013).

Apoptóza nastáva primárne prostredníctvom dvoch dráh – vnútornej (mitochondriálnej), pomocou zníženia mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP) a vypustenia cytochrómu c do cytoplazmy, alebo vonkajšej, cez receptory smrti, ktorej sa zúčastňujú kaspáza 8 a kaspáza 9. Tieto ďalej spúšťajú kaskádu kaspáz, ktoré v konečnom dôsledku aktivujú kaspázu 3, tzv. proteín smrti. Kaspáza 3 nezvratne spúšťa apoptózu štiepením proteínov a fragmentáciou DNA, čo vyúsťuje do smrti bunky (Patel *et al.*, 2017). Podrobný mechanizmus apoptózy je detailnejšie popísaný v kapitole 2.4.2.

Experimentálne sa potvrdilo, že za východiskový bod pre zmenu MMP sa pokladá DNA poškodenie a agregácia bunkových receptorov smrti. Meranie MMP u bunkovej línie BGC-823 (žalúdočná nádorová línia) ukázalo, že po ošetrení kroacetínom bol MMP znížený, čo značí, že kroacetín spúšťa apoptózu cez vnútornú (mitochondriálnu) dráhu (He *et al.*, 2013).

Využitím metód Western blot a ELISA sa potvrdila zvýšená expresia proapoptických proteínov kaspázy 3, 8 a 9 v pľúcnej nádorovej línii A549 po ošetrení vodným extraktom šafranu. Tieto výsledky naznačujú, že aplikácia vodného extraktu šafranu môže spúšťať apoptózu pomocou vonkajšej cesty (Samarghandian *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014).

2.1.2.2 Inhibícia proliferácie

Karotenoidné zložky šafranového extraktu zastavujú bunkový cyklus na viacerých kontrolných bodoch v G0/G1, S a G2/M fáze. To vedie k zastaveniu bunkovej proliferácie, inhibícii mitózy a nakoniec k bunkovej smrti (Aung *et al.*, 2007; Chryssanthi *et al.*, 2007; Ashrafi *et al.*, 2015).

Je známe, že existujú viaceré proteíny, ktoré majú na starosti reguláciu udalostí, ktoré sa udejú počas bunkového cyklu. Strata takýchto proteínov alebo ich funkcie môže viesť k rozvoju nádorového ochorenia. Medzi hlavné kontrolné proteíny, ktoré regulujú bunkový cyklus spadajú cyklíny a cyklín-závislé kinázy (CDK). Cyklín D je nukleárnou podjednotkou CDK ako CDK-4 alebo CDK-6. Špecifická asociácia CDK-4 a cyklínu D je esenciálna pre bunkový cyklus, aby postúpil z G1 fázy a pokračoval ďalej. Nesprávna regulácia kontrolných proteínov a zvýšená expresia faktorov, ktoré indukujú rast ako práve cyklín D znamená počiatok onkogenézy (Diehl, 2002). Krocin indukuje zastavenie bunkového cyklu v G0/G1 a G2/M fáze vďaka zníženiu expresii cyklínu D1 čo vedie k potlačeniu proliferácie viacerých nádorových línii rakoviny prostaty (D'Alessandro *et al.*, 2013).

Možným mechanizmom pôsobenia krocinu a kroacetínu, ktoré inhibujú rast nádoru je potlačenie syntézy RNA a DNA a taktiež inhibícia aktivity RNA polymerázy II (Nair *et al.*, 1995; D'Alessandro *et al.*, 2013). Kroacetín značne znížil distribúciu buniek v S fáze a zároveň potlačil syntézu DNA. Ako dôsledok bola značne zvýšená distribúcia buniek v G2/M fáze bunkového cyklu. Skúmaný bol Cdc-2, jeden z kontrolných proteínov regulujúci G2/M fázu, pretože jeho fosforylácia aktivuje ďalšie kontrolné proteíny

potrebné pre postup bunkovým cyklom. Po ošetrení krocetínom vykazoval Cdc-2 hyperfosforyláciu, čo potlačilo jeho aktivitu vyúsťujúcu do inhibície postupu buniek v bunkovom cykle (Dhar *et al.*, 2009).

2.1.2.3 Interakcia s DNA štruktúrami

DNA je častým cieľom liečiv, pretože ich interakcia s DNA priamo ovplyvňuje replikáciu a transkripciu, čo je hlavným krokom pri delení a raste buniek. Práve ovplyvnenie delenia buniek je kritické pre svoju náchylnosť k vytvoreniu nádoru (Bathaie *et al.*, 2007).

Existujú tri hlavné cesty, akými sa môže liečivo viazať na DNA. Prvá je cez interakciu liečiva a proteínov, ktoré sa viažu na DNA a teda ovplyvňujú transkripciu DNA. Druhá je pomocou interakcie liečiva s RNA, ktorá sa naviaže na dvojzávitnicu DNA, čo vytvorí trojzávitnicový RNA-DNA hybrid s odhalenými jednovláknovými DNA regiónmi, ktoré môžu brániť transkripcii. Tretia je priame viazanie sa liečiva na dvojzávitnicu DNA (Chaires, 1998; Bathaie *et al.*, 2007)

Možný mechanizmus protirakovinového účinku šafranu môže byť zasahovanie krocetínu do štruktúry histónu H1 a interakcia histónu H1 s DNA (Dhar *et al.*, 2009). Medzi interakciu šafranových karotenoidov s DNA spadá aj ich viazanie sa do malého žliabku DNA (Geierstanger a Wemmer, 1995; Bathaie *et al.*, 2007). Nebolo zistené žiadne preferenčné viazanie sa pre AT alebo GC sekvencie (Hoshyar *et al.*, 2012).

Zložky šafranu majú zároveň vplyv na telomerázovú aktivitu. Telomeráza je enzým zodpovedný za udržiavanie telomér na eukaryotických chromozómoch, ktoré sa prirodzene skracujú pôsobením nekompletnej replikácie DNA pomocou DNA polymeráz. V nádorových bunkách je jej aktivita zvýšená takmer o 90 % a vo vzorkách ošetrených krocetínom aktivita telomerázy poklesla o polovicu (Noureini a Wink, 2012).

2.1.2.4 Potlačenie polymerizácie mikrotubúl

Safranal ako jeden z metabolitov šafranu vykazuje protirakovinové účinky, ale presný mechanizmus nie je zatiaľ známy. Jedna z hypotéz je, že na to aby šafranové zložky, akou je safranal, prejavili svoj účinok na syntézu makromolekulárnych látok a cytotoxicitu, potrebujú dodatočnú cytoplazmatickú zložku (Nair *et al.*, 1995). Takouto zložkou môžu byť práve mikrotubulárne proteíny, keďže bývajú často napádané protirakovinovými liečivami (Naghshineh *et al.*, 2015).

Mikrotubuly sú predĺžené štruktúry zložené z tubulínových heterodimérov s α a β podjednotkami. Spolu s aktínom tvoria základný cytoskelet vo všetkých eukaryotických bunkách. Dokážu sa prirodzene predlžovať a skracovať a pomocou napríklad kinezínu v eukaryotických bunkách sa pozdĺž nich prepravujú dôležité komponenty za hydrolýzy ATP. Dynamická nestabilita je dôležitá pri bunkovom delení, konkrétne pri segregácii chromozómov (Valiron *et al.*, 2001) Preto je práve polymerizácia mikrotubúl častým cieľom protirakovinových liečiv.

Naghshineh *et al.* (2015) uvádzajú, že safranal môže narušiť túto dynamickú nestabilitu vďaka jeho častému viazaniu sa na tubulínový dimér medzi α a β podjednotky. Tým pádom je potlačovaná interakcia tubulín-tubulín a tubulín-nukleotid a je ovplyvnený aj polymerizačný proces mikrotubúl. To vyúsťuje do nevhodného prichytenia sa chromozómov a ich pohybu, čo bráni rozdeleniu bunky.

2.2 Bunkový cyklus

Bunkový cyklus je komplexný proces, ktorý zahŕňa proliferáciu buniek, ich vývoj a diferenciáciu. Cyklus zahŕňa množstvo regulačných proteínov, ktoré dohliadajú jeho správny priebeh a úspešné zakončenie mitózou. Medzi hlavné proteíny regulujúce postup bunky cez jednotlivé fázy nazývané G1, S, G2 a M patria cyklíny a CDK (Schafer, 1998).

G1 a G2 fáza predstavujú „medzery“ (z angl. gaps) medzi dvoma udalosťami, mitózou (M fáza) a syntézou DNA (S fáza). V G1 fáze sa bunka regeneruje po práve prebehnutej mitóze a pripravuje sa na syntézu DNA, ktorá prebieha v nasledujúcej S fáze (Vermeulen *et al.*, 2003). V G2 fáze prebieha príprava bunky na fázu mitotickú. Existuje aj pojem G0 fáza, ktorý sa používa pre bunky, ktoré existujú v kľudovom stave. Takéto bunky nevstupujú do ďalšieho bunkového cyklu, ale po zvyšok svojho života vykonávajú svoju funkciu a zostávajú metabolicky aktívne (Park a Koff, 2001).

Hlavným zmyslom bunkového cyklu je zabezpečiť správne delenie, tzn. prenos bezchybnej genetickej informácie z materskej bunky na dcérske. V prípade deficitu alebo straty funkcie jedného či viacerých regulačných proteínov môže dôjsť k deleniu buniek s nesprávnou genetickou informáciou a prípadnému vzniku nádorového ochorenia (Pitts *et al.*, 2014; Park a Koff, 2001).

2.2.1 Kontrolné body bunkového cyklu a ich regulácia

Bunkový cyklus je regulovaný kontrolnými bodmi, inak nazývanými aj checkpointy, ktoré udržiavajú dohľad nad integritou a správnosťou dôležitých udalostí. Medzi takéto udalosti patrí napríklad správna replikácia DNA, oprava poškodenej DNA a segregácia chromozómov pri mitóze (Barnum a O'Connell, 2014) Ako tri najdôležitejšie kontrolné body bunkového cyklu môžeme označiť prechody G1/S, G2/M a M.

Základná kontrola bunkového cyklu bola dobre objasnená štúdiami v kvasinkách. Tieto organizmy majú jedinú CDK, ktorá im slúži na kontrolu celého bunkového cyklu. V *Saccharomyces cerevisiae* to je Cdc28 a v *Schizosaccharomyces pombe* Cdc2, ktoré sa viažu na špecifické cyklíny v priebehu bunkového cyklu. Počas evolúcie sa počet CDK a cyklínov značne zvýšil, avšak za kontrolné sú považované len určité špecifické cyklín-CDK komplexy (Malumbres a Barbacid, 2005).

Správnou funkciou kontrolného bodu G1 je zaistiť aby bunkovým cyklom pokračovala zdravá bunka bez defektov. V prípade prítomnosti nejakého nedostatku je bunka buď eliminovaná, alebo sa dostane do G0 fázy, v ktorej zotráva až do odstránenia nedostatku. Počas prechodu bunky cez kontrolný bod G1 sa cyklíny D (D1, D2, D3) viažu špecificky na CDK-4 a CDK-6 za tvorby komplexov, ktoré čiastočne inaktivujú proteíny ako RB, RBL1 a RBL2 aby sa mohli cyklíny E (E1 a E2) naviazať a aktivovať CDK2. Vytvorený komplex cyklín E-CDK2 ďalej fosforyluje proteíny RB, RBL1 (známy aj ako p107) a RBL2 (známy aj ako p130) a inaktivuje ich kompletne (Harbour *et al.*, 1999; Lundberg a Weinberg, 1998).

V prípade detekcie poškodenia DNA alebo inej poruchy je inhibovaná tvorba komplexov cyklín-CDK. Ak sa nevytvorí požadovaný cyklín-CDK komplex, RB proteín nie je fosforylovaný, môže sa naviazať na E2F transkripčný faktor a inhibovať ho. E2F transkripčný faktor prepisuje gény proteínov, ktoré sú potrebné na prechod z G1 do S fázy a ak je inhibovaný naviazaným RB proteínom, dôjde k zastaveniu bunkového cyklu (Wenzel a Singh, 2018).

Cyklíny A, B a ich CDK sú aktivované neskôr v bunkovom cykle a ich úlohou je udržiavať RB v hyperfosforylovanom stave až do konca mitózy a následne sa RB vráti do svojho pôvodného stavu a viaže sa s E2F (Ludlow *et al.*, 1990).

p53 je proteín, ktorý odpovedá na poškodenie DNA počas G1 fázy akou je napríklad jednovláknová DNA alebo nesprávne spárovanie báz transkripciou p21 (He *et al.*, 2005). Interakcia p21 s CDK inhibuje ich aktivitu, ktorá je potrebná na fosforyláciu

RB (Elbendary *et al.*, 1996). V ľudských nádorových ochoreniach sú extrémne časté mutácie p53. Toto vyúsťuje do nedostatku množstva p21 a v konečnom dôsledku bunkový cyklus pokračuje s poškodenou DNA (Greenblatt *et al.*, 1994).

Kontrolný bod G2 nachádzajúci sa pred mitotickou fázou bunkového cyklu kontroluje integritu DNA a kompletnosť replikácie. Ak sa pri kontrole zistí chybná alebo poškodená DNA, aktivujú sa jej mechanizmy opravy a zároveň sa bunkový cyklus pozastaví pred mitózou. Mitóza nasleduje po replikácii DNA v S fáze za aktivácie mitotickej CDK1. CDK1 tvorí komplex s cyklínom B potrebným pre vstup do mitotickej fázy. Regulácia CDK1 zahŕňa fosforyláciu pomocou Wee1 kinázy, ktorej aktivita je počas vstupu do mitózy znížená pomocou Cdc25 kinázy s duálnou špecifickosťou. Tá defosforyluje CDK1 a prenáša fosfát na Wee1 kinázu, čo znižuje aktivitu Wee1 a zvyšuje aktivitu CDK1. Cdc25 je pod kontrolou Chk1, ktorá ju fosforyluje. Tento jav predchádza defosforyláciou CDK1 čo udržiava cyklín B-CDK1 komplex v neaktívnom stave. Aktivácia Chk1 v prípade signálu vykazujúcom poškodenie DNA je nasledovaná fosforyláciou Cdc25 a inaktiváciou komplexu cyklín B-CDK1. Z toho vyplýva, že na postup bunky cez G2/M kontrolný bod je vyžadovaná aktivácia Cdc25 a teda neprítomnosť Chk1 (Perry a Kornbluth, 2007; DiPaola, 2002).

V prípade poškodenia DNA existujú dve dráhy signalizácie a regulácie kontrolného bodu G2/M v závislosti od typu poškodenia. Ako kľúčovými signalizačnými zložkami v bunkách cicavcov sa ukázali proteínové kinázy ATM a ATR, ktoré sú aktivované v dôsledku DSB a jednovláknovou DNA (ssDNA) pokrytou replikačným proteínom A (Shiloh Y., 2003; Cimprich a Cortez, 2008; Jackson a Bartek, 2009). Medzi najštudovanejšie ciele ATM a ATR patria Chk1 a Chk2 proteínové kinázy, ktoré spolu s ATM a ATR účinkujú ako inhibítory CDK aktivity pomocou viacerých mechanizmov, medzi ktoré patrí aj aktivácia transkripcie p53 (Kastan a Bartek, 2004; Bartek a Lukas, 2007; Riley *et al.*, 2008; Jackson a Bartek, 2009). Inhibícia CDK spôsobí spomalenie alebo zastavenie bunkového cyklu v jeho kontrolných bodoch, čo zaisťuje dostatok času na opravu DNA pred replikáciou. Opravné proteíny DNA môžu byť však aktivované pomocou ATM a ATR signalizačných dráh aj transkripčne alebo post-translačne napríklad fosforyláciou či ubikvitináciou (Huen a Chen, 2008; Jackson a Bartek, 2009).

Ktorá signalizačná dráha sa aktivuje závisí od typu zlomu DNA. V prípade DSB je aktivovaná ATM-Chk2 a na SSB odpovedá ATR-Chk1 signalizačná dráha. DSB aktivuje ATM, ktorý fosforyluje Chk2, ktorý zároveň fosforyluje Cdc25 a inaktivuje cyklín B-CDK1 komplex zabraňujúc vstúpiť bunke do mitotickej fázy. Chk2 navyše

interaguje s niekoľkými ďalšími proteínmi, medzi ktoré patrí aj p53, BRCA1 či 53BP1 (Lavin, 2008; Smith *et al.*, 2010).

Signalizačná dráha ATR-Chk1 SSB je podobná ako pri DSB. Za efektívnu aktiváciu ATR sú zodpovedné dva mediátorové proteíny TopBP1 a claspin. TopBP1 obsahuje doménu, ktorá stimuluje aktivitu ATR a claspin po fosforylácii viaže Chk1 a prenáša ho do blízkosti ATR, ktorý ho následne môže fosforylovať (Kumagai a Dunphy, 2003). Nasleduje už známa kaskáda inaktívacie Cdc25 a komplexu cyklín B-CDK1 potrebného pre vstup do mitózy.

Po prechode do mitózy, komplex cyklín B-CDK1 už nie je ďalej potrebný a je kompletne degradovaný pri postupe mitózy do anafázy. Kontrolný bod v mitotickej fáze sa nazýva M checkpoint a súvisí s kontrolou správnej väzby kinetochór mitotického vretienka. Mitotické vretienko má na starosť segregáciu sesterských chromatíd v mitóze a je zložené z mikrotubúl a niekoľkých pohybových proteínov na centrozomálnych a kinetochórnych koncoch (Wittmann *et al.*, 2001). Keď sú všetky kinetochóry prichytené a zoradené v metafáznej rovine, môže prebehnúť anafáza sprostredkovaná aktivitou E3 ubikvitín ligázy známej ako Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C), ktorý degraduje cyklín B-CDK1 komplex. Funkciou M kontrolného bodu je zabrániť aktiváciou APC/C v prípade, že kinetochóry sú nesprávne naviazané na mikrotubuly mitotického vretienka alebo nenaviazané vôbec. Kinetochóry produkujú aktívny signál, ktorý zastaví bunkový cyklus negatívnou reguláciou Cdc20 proteínu, ktorý s APC/C komplexom tvorí aktívny holoenzým. Ak je negatívne regulovaný Cdc20, APC/C je neaktívny a bunky nemôže prejsť do anafázy (Barnum a O'Connell, 2014).

2.3 Poškodenie DNA

Integrita genómu všetkých organizmov je ohrozená poškodením DNA vplyvmi z vonkajšieho či vnútorného prostredia bunky každý deň. Medzi vnútorné faktory patrí napríklad akumulácia reaktívnych kyslíkových radikálov vedúcich k oxidatívne poškodeniu DNA, lipidová peroxidácia, alkylácia či hydrolýza DNA báz (De Bont a van Larebeke, 2004; Hakem, 2008). DNA poškodenie vo väčšine prípadov vzniká práve vplyvom vonkajších faktorov ako je UV žiarenie, chemické pôsobenie alebo ionizujúce žiarenie (Doll a Peto, 1981; De Bont a van Larebeke; 2004, Hakem, 2008). Neopravené poškodenie DNA môže viesť k nestabilite genómu, mutáciám, starnutiu bunky a vzniku

rakoviny. Z týchto dôvodov disponuje bunka opravnými a kontrolnými mechanizmami, ktoré jej umožňujú takéto poškodenie opraviť alebo eliminovať trvalo poškodené bunky.

2.3.1 Efekt ionizujúceho žiarenia

Rádioterapia využívajúca γ -žiarenie (ionizačné žiarenie, IR) je konvenčná liečba odporúčaná v až 50 % prípadoch výskytu nádoru (Delaney *et al.*, 2005). Počas liečby pomocou IR však dochádza aj k poškodeniu zdravého a nepoškodeného tkaniva v okolí nádoru. Výsledkom je oxidácia DNA báz, nežiaduce previazanie DNA s proteínmi tzv. „cross-link“ či jednovláknové (SSB; z angl. single-stranded break) a dvojvláknové zlomy DNA (DSB; z angl. double-stranded break) (Cadet *et al.*, 1999; Sudprasert *et al.*, 2006; Mladenov *et al.*, 2013). Takéto poškodenie musí byť opravené, inak môže dochádzať k vzniku mutácií, prípadne vzniku rakoviny alebo viesť k bunkovej smrti (Frankenberg-Schwager, 1990; Lindahl, 1993).

SSB je poškodenie jedného vlákna v dvojvláknovom DNA helixe zvyčajne spojené s poškodeným 5' a/alebo 3' koncom na mieste zlomu a stratou jedného nukleotidu (Caldecott, 2008). Najpravdepodobnejším dôsledkom neopravených SSB je zastavenie či kolaps replikačnej vidličky počas S fázy bunkového cyklu (Caldecott, 2008). Kolaps replikačnej vidličky v dôsledku narazenia na chýbajúci nukleotid ďalej môže vyvolať DSB (Kuzminov, 2001).

DSB sú extrémne poškodenie DNA, pri ktorých je dvojvláknový helix DNA poškodený na oboch vláknach zároveň s medzerami obsahujúcimi voľné 3' alebo 5' fosfáty (Povirk, 2012). Takéto poškodenia sú vytvárané náhodne v genómovej DNA (Mladenov *et al.*, 2013).

2.3.2 Odpoveď na poškodenie DNA vyvolané ionizujúcim žiarením

Aby genetický kód mohol fungovať správne a bol replikovaný v poriadku, bunka musí opraviť poškodenú DNA opravnými mechanizmami. V závislosti od typu poškodenia je aktivovaný príslušný opravný mechanizmus. Odpoveď bunky na poškodenie DNA (DDR; z angl. DNA damage response) zahŕňa aktiváciu signálnych dráh, ktoré rozoznávajú typ DNA poškodenia, aktiváciu opravných faktorov a opravných dráh, reguláciu postupu v bunkovom cykle a prípadnú apoptózu (Li *et al.*, 2016).

V prípade SSB sú poškodenia opravované mechanizmami ako napríklad: oprava vystrihnutím bázy pre poškodenú bázu, korekcia správneho párovania pre nesprávne

inkorporované bázy a oprava odstraňujúca medzivláknové kríženie tzv. kroslinky (Sirbu a Cortez, 2013). Veľmi závažné DSB sú opravované homológnu rekombináciou (HR) a nehomológny spájaním koncov (NHEJ).

Ak je však DNA poškodenie natoľko vážne, že nie je možné ho opraviť, nasleduje spustenie apoptózy alebo bunkovej senescencie (permanentné zastavenie replikácie bunky) (Campisi a di Fagagna, 2007).

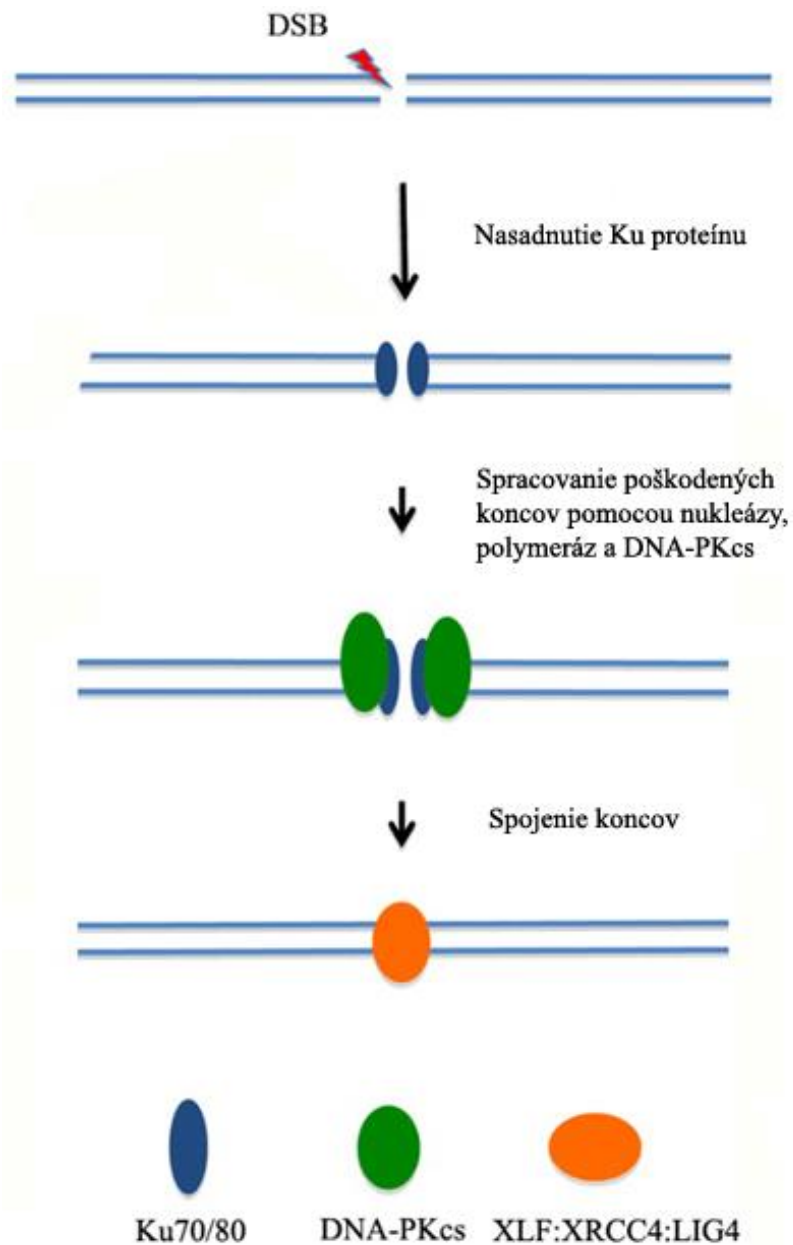
2.3.2.1 Nehomológne spájanie koncov

Nehomológne spájanie koncov je najčastejšou opravnou dráhou pri vzniku DSB. Až 80 % všetkých prípadov DSB po vystavení IR je opravovaných NHEJ (Kakarougas a Jeggo, 2014), ale spôsob opravnej cesty DSB závisí aj na štádiu bunky v bunkovom cykle. Faktory, ktoré podporujú rozsiahle štiepenie poškodených koncov DNA a aktiváciu HR sú aktivované hlavne v S a G2 fáze bunkového cyklu keď je prítomná sesterská chromatída. Z tohto dôvodu je NHEJ preferované počas celého bunkového cyklu okrem S a G2 fázy (Chang *et al.*, 2017). Pri DSB vznikajú v závislosti na mieste zlomu rôzne zakončené DNA konce. NHEJ je zaujímavé z toho dôvodu, že dokáže akceptovať široké spektrum týchto zakončení ako substrát na opravu (Lieber, 2010).

Podobne ako veľká časť procesov zaoberajúcich sa opravou DNA, aj NHEJ potrebuje 3 typy enzýmov – nukleázu na odštiepenie prebytočnej poškodenej DNA, polymerázu na doplnenie novej DNA a ligázu na obnovenie integrity DNA vlákien (Lieber, 2010).

Prvým proteínom, ktorý odpovedá na DSB poškodenie je Ku proteín (Obr. 2). Po jeho väzbe na poškodený koniec DNA Ku zmení konformáciu oproti svojej voľnej forme v roztoku a vytvorí Ku:DNA komplex. Dôvodom pre zmenu konformácie je neschopnosť tvorby stabilných komplexov s DNA závislými proteínovými kinázami (DNA-PKcs) (Yaneva *et al.*, 1997). Ku je po zmene konformácie schopný interagovať s nukleázou, polymerázami a ligázou potrebnou pre NHEJ (Lieber, 2008).

Nukleázou v NHEJ opravnej dráhe je Artemis. Táto nukleáza má široké spektrum funkcií medzi ktoré patrí 3' a 5' endonukleázová aktivita, 5' exonukleázová aktivita a schopnosť štiepiť vlásenky (Ma *et al.*, 2002). Artemis naviazaná na DNA-PKcs komplex dokáže štiepiť rozmanité poškodené konce DNA a preto nie je potrebná ďalšia nukleáza (Ma *et al.*, 2005; Yannone *et al.*, 2008).



Obr. 2 Schéma opravy DSB pomocou NHEJ (prevzaté a upravené od Kee a D'Andrea, 2010)

Po úprave poškodených koncov DNA nasleduje syntéza chýbajúcich častí pomocou dvoch polymeráz. Polymeráza μ je schopná syntézy závislej na vzorovom vlákne DNA z dNTP a rNTP a zároveň je schopná syntetizovať novú DNA nezávisle na vzorovom vlákne podobne ako terminálna deoxynukleotidyl transferáza (TdT) (Moon *et al.*, 2007). Druhá polymeráza λ je aktívna hlavne pri syntéze DNA závislej na vzorovom vlákne v pufoch obsahujúcich Mg^{2+} , ale vykazuje aj aktivitu nezávislú na vzorovom vlákne DNA v Mn^{2+} pufoch (Ramadan *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2007; Lieber, 2010).

Na spájanie novo syntetizovanej DNA slúži zložitý komplex XLF:XRCC4:DNA ligáza IV. DNA ligáza IV je schopná spájať nielen zárezy v DNA ale aj kompatibilné

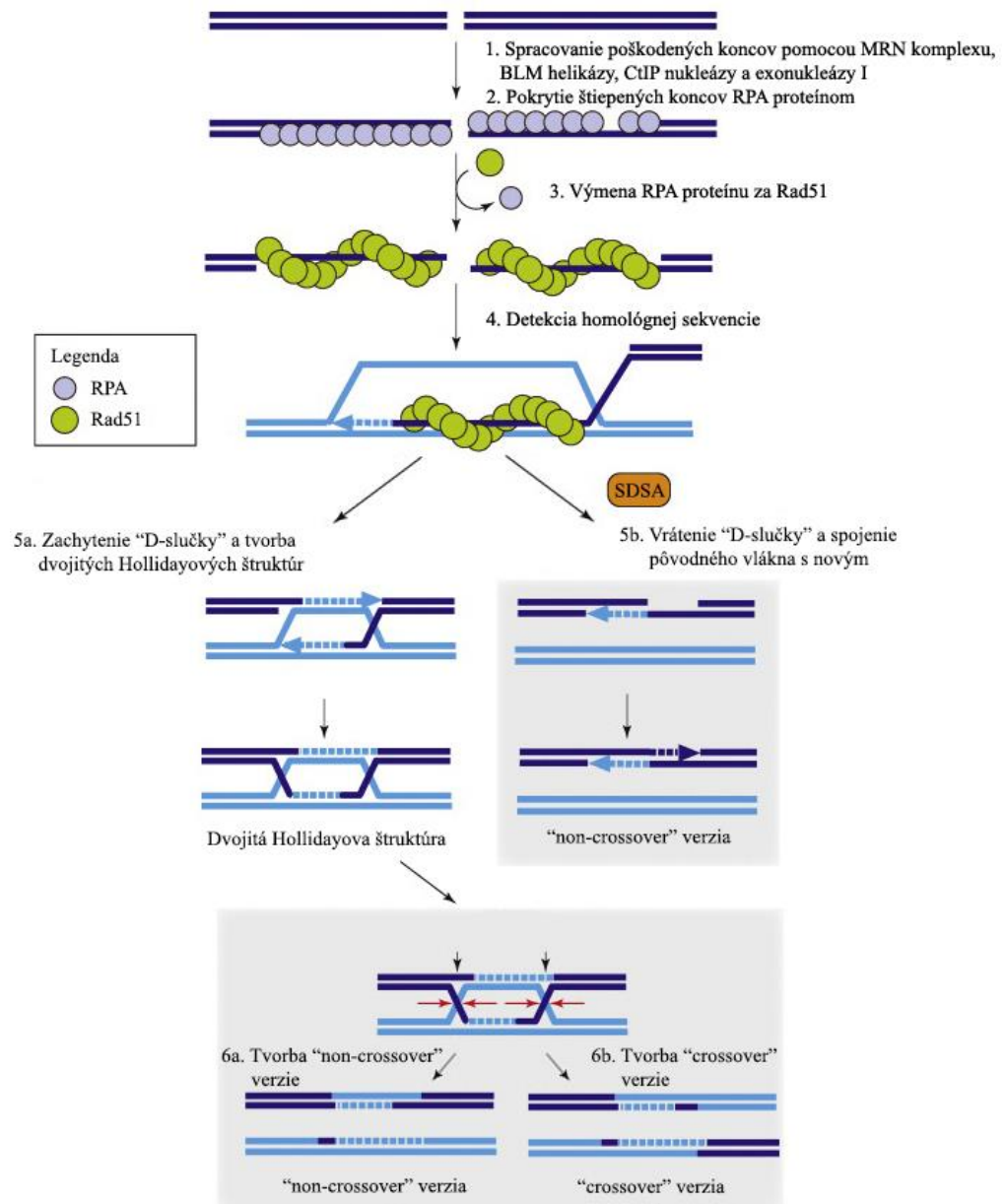
konce dvojláknovej DNA aj bez prítomnosti XRCC4 a XLF (Grawunder *et al.*, 1997; Lieber, 2010). Po väzbe s XRCC4 je jej aktivita zlepšená a dokáže spájať aj konce, ktoré majú 2bp mikrohomoologiu a medzeru o veľkosti 1 nukleotid. V prítomnosti Ku proteínu je jej aktivita zväčšená až 10-násobne a dokáže spájať aj nekompatibilné DNA konce (Gu *et al.*, 2007a). Ak je komplex XRCC4:DNA ligáza IV v prítomnosti Ku proteínu spojený navyše s XLF, spájanie nekompatibilných koncov DNA prebieha efektívnejšie (Gu *et al.*, 2007b; Tsai *et al.*, 2007).

2.3.2.2 Homológna rekombinácia

Uprednostňovaná dráha na opravu DSB poškodenia pre bunky v S/G2 fáze bunkového cyklu je HR (Chang *et al.*, 2017). Podstúpenie rozsiahleho štiepenia poškodených koncov DNA a vznik dlhých, 3' presahujúcich, koncov DNA, je potrebné na určenie opravnej cesty HR (Symington a Gautier, 2011; Chapman *et al.*, 2012).

Tento proces začína odbúraním 53BP1 proteínu pomocou BRCA1, ktorý bráni rozsiahlemu štiepeniu DNA koncov a voľby opravnej cesty pomocou HR zamedzením prístupu CtIP k poškodeným koncom (Bunting *et al.*, 2010; Daley a Sung, 2014; Ceccaldi *et al.*, 2016). Nasleduje počiatkové štiepenie poškodených koncov za prítomnosti MRE11-RAD50-NBS1 komplexu a CtIP nukleázy a spracovanie výsledných 3' koncov DNA pomocou endonukleázy Dna2 v spojení s BLM helikázou a 5'-3' exonukleázou I za vytvorenia dlhých 3' ssDNA koncov (Obr. 3, krok 1) (Sartori *et al.*, 2007; Gravel *et al.*, 2008; Mimitou a Symington, 2008; Nimonkar *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Mimitou a Symington, 2011). Tvorba ssDNA koncov štiepením slúži aj ako aktivačný bod pre spustenie kontrolných bodov a zastavenie bunkového cyklu, čo umožňuje získať čas na opravu poškodenej DNA (Raynard *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2009).

Následne je ssDNA koniec pokrytý replikačným proteínom A (RPA) aby sa zabránilo tvorbe sekundárnych štruktúr ako napríklad DNA vlásieniek (Obr. 3, krok 2) (Chen *et al.*, 2013). RPA proteín je neskôr odstránený a namiesto neho je naviazaný Rad51 proteín, ktorý je nevyhnutne potrebný pre ďalší priebeh opravy DSB pomocou HR (Obr. 3, krok 3) (Chen *et al.*, 2013).



Obr. 3 Schéma opravy DSB pomocou HR (prevzaté a upravené od Mimitou a Symington, 2009)

Rad51 tvorí vlákno, ktoré v sesterskej chromatíde „hľadá“ homológnu sekvenciu DNA k poškodenému vláknu (Heyer *et al.*, 2006). Hneď ako je správna sekvencia nájdená, nasleduje rekombinácia vlákien začínajúca tvorbou „D-slučky“. Tá vzniká naviazaním sa voľného 3'-OH konca fungujúceho ako primer na sesterskú chromatídu (Obr. 3, krok 4) a syntézu novej DNA podľa vzoru sesterskej chromatídy pomocou polymerázy η (Heyer *et al.*, 2006).

Dráha SDSA (z angl. synthesis-dependent strand annealing) spočíva v spojení novej časti vlákna so štiepeným koncom pôvodného vlákna a vrátením „D-slučky“ (Obr. 3, krok 5b). Touto dráhou sa eliminuje proces „crossing-over“ vlákien (Paques a Haber, 1999; Heyer *et al.*, 2010).

Druhá dráha je tvorba dvojitého Hollidayových štruktúr, čo zahŕňa zachytenie rozšírenej „D-slučky“ druhým koncom DSB a syntézu ďalšieho vlákna DNA podľa vzoru „D-slučky“ (Obr. 3, krok 5a) (Morrical, 2015). Tento medziprodukt je možné rozštiepiť do konečnej verzie, ktorá bude odpovedať nekříženiu (angl. non-crossover) (Obr. 3, krok 6a) alebo kříženiu (angl. crossover) (Obr. 3, krok 6b) pôvodných sesterských chromatíd (Heyer *et al.*, 2010; Godin *et al.*, 2016). „Crossover“ produkt vzniká pomocou endonukleáz Mus81-Eme1 a GEN1 (Boddy *et al.*, 2001; Heyer, 2004) a „non-crossover“ produkt hlavne pomocou komplexu topoizomerázy III α -RMI1 a BLM helikázy (Obr. 3) (Schwartz a Heyer, 2011; Ip *et al.*, 2008; Godin *et al.*, 2016).

2.4 Bunková smrť

Bunková smrť je neoddeliteľnou súčasťou každej bunky buď z dôvodu vplyvu faktorov ako poškodenie či už DNA alebo všeobecne, infekcie, nedostatku kyslíku či často len z dôsledku nahradenia starých buniek novými. Je to proces, ktorého výsledkom je ukončenie biologickej aktivity bunky. Na rozdiel od dormancie, ktorá je veľmi často charakterizovaná ako zníženie enzymatických a biologických aktivít, zmeny ktoré sprevádzajú bunkovú smrť sú nezvratné (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Existujú viaceré druhy bunkových smrtí spadajúcich do kategórie tzv. regulovaných bunkových smrtí (RCD; z angl. regulated cell death). Okrem apoptózy, ktorá je najčastejším typom RCD poznáme aj ďalšie druhy ako MPT-hnaná nekróza, ferroptóza, pyroptóza, parthanatos, nekroptóza, entóza, NETóza a RCD závislá na lyzozómoch a autofágoch (Bergsbaken *et al.*, 2009; Brinkmann a Zychlinsky, 2012; Aits a Jäättelä, 2013; Berghe *et al.*, 2014; Fatokun *et al.*, 2014; Linkermann a Green, 2014; Krishna a Overholtzer, 2016; Yang a Stockwell 2016; Galluzi *et al.*, 2018). Ako celkom odlišný typ bunkovej je možné označiť nekrózu.

2.4.1 Nekróza

Nekróza je nekontrolovaný zánik bunky, ktorý je dôsledkom rôznych externých alebo interných faktorov. Medzi externé patrí najčastejšie mechanické poškodenie, vysoké teploty či odmrznutie. Pod interné faktory spadá najčastejšie otrava spôsobená uhrýznutím toxickými živočíchmi, genetická porucha, nedostatok živín alebo nedostatočné prekrvenie. Nekróza sa pokladá za pasívny proces, pretože nevyžaduje syntézu nových proteínov a nie je regulovaná žiadnymi mechanizmami. Jej priebeh je

spojený s rozkladom chromatínu, poškodením membrán vnútorných organel, vakuolizáciou endoplazmatického retikula a roztrhnutím plazmatickej membrány spolu s vypustením svojho obsahu do mimobunkového priestoru (Syntichaki a Tavernarakis, 2002).

2.4.2 Apoptóza

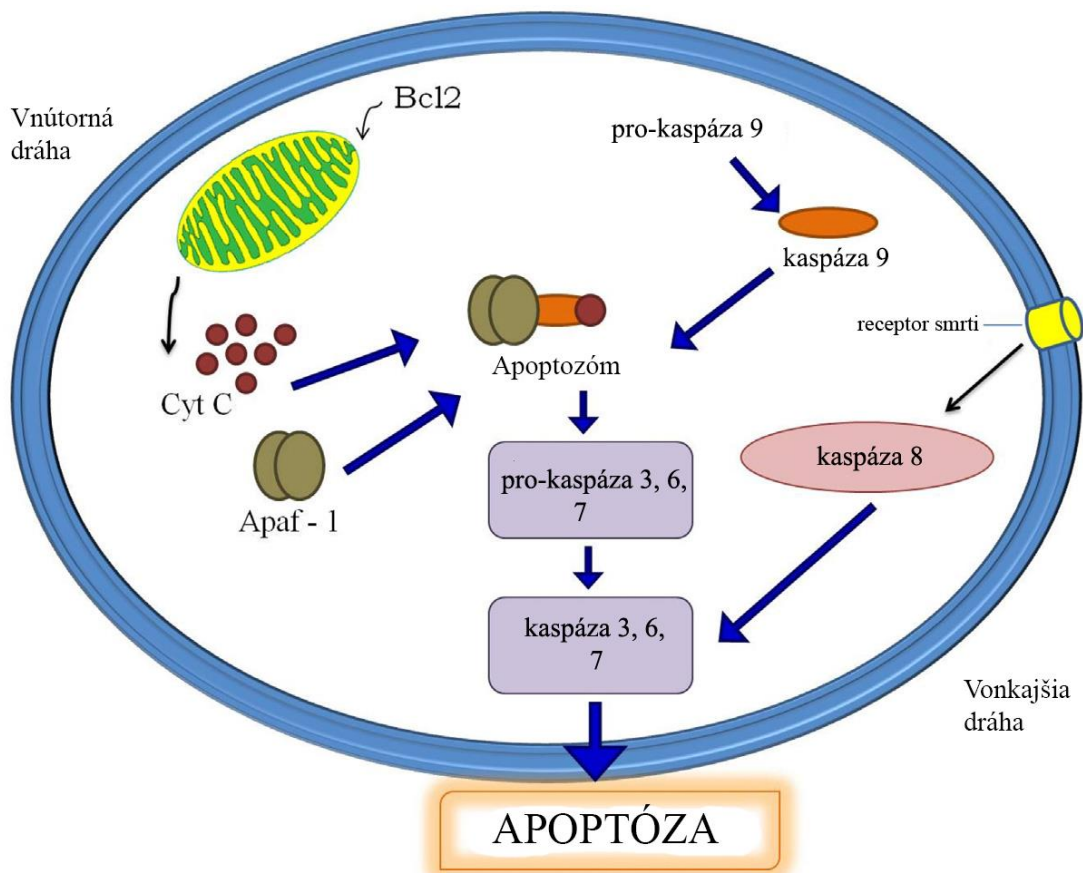
Na rozdiel od nekrózy, apoptóza je najčastejším typom RCD. Existuje apoptóza spustená vnútornou alebo vonkajšou cestou. Apoptóza vnútornou cestou je spustená množstvom zmien v prostredí ako nedostatok rastového faktoru, poškodením DNA, stresom endoplazmatického retikula, nadmerným vystavením reaktívnym formám kyslíka (ROS; z angl. reactive oxygen species) a mnoho ďalších. Apoptické bunky si zachovávajú integritu plazmatickej membrány a do určitého stupňa aj svoju metabolickú aktivitu až do zakončenia procesu. Na spustenie apoptózy vnútornou cestou je vyžadovaný nevratný krok permeabilizácie vonkajšej mitochondriálnej membrány regulovaný Bcl-2 skupinou proteínov. Medzi pro-apoptické proteíny spadajúce do tejto skupiny patrí aj BAX a BAK, ktoré vytvárajú póry na vonkajšej mitochondriálnej membráne a permeabilizujú ju.

Na rozdiel od BAX a BAK, samotný Bcl-2 pôsobí anti-apopticky a „upcháva“ póry vytvorené pomocou BAX a BAK. Bcl-2 navyše inhibuje aktivitu týchto proteínov naviazaním sa na ne v blízkosti vonkajšej mitochondriálnej membrány (Llambi *et al.*, 2011; Czabotar *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Galluzi *et al.*, 2018). Permeabilizácia vonkajšej mitochondriálnej membrány spôsobuje vypustenie apoptogénnych faktorov, ktoré sú za normálnych okolností uložené v mitochondriálnom medzimembránovom priestore ako napríklad cytochróm c (Tait a Green, 2010; Tait a Green, 2013). Vypustený cytochróm c sa viaže s apoptickým peptidázovým aktivačným faktorom 1 (Apaf1) a pro-kaspázou 9 za vzniku komplexu známeho ako apoptozóm zodpovedného za aktiváciu kaspázy 9. Tá následne katalyzuje aktiváciu kaspáz 3 a 7, ktoré sú považované za enzýmy zodpovedné za zničenie bunky v prípade apoptózy v bunkách cicavcov (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) (Shalini *et al.*, 2015; Julien a Wells, 2017). Katalytická aktivita týchto kaspáz zahŕňa fragmentáciu DNA (Nagata, 2005), vystavenie fosfatidylserínu (Naito *et al.*, 1997) a v konečnom dôsledku vytvorenie apoptických teliesok a zániknutie bunky (Coleman *et al.*, 2001; Sebbagh *et al.*, 2001).

Apoptóza spustená vonkajšou cestou je typ RCD, ktorý nastáva ako dôsledok zmien v mimobunkovom priestore. Existujú dva hlavné typy membránových receptorov

reagujúcich na vonkajšie stimuly: a) receptory smrti, ktorých aktivácia závisí na naviazaní sa príslušných ligandov a b) receptory závislosti, ktorých aktivácia nastáva pri poklese hladiny ich špecifických ligandov pod istú hranicu (Gibert a Mehlen, 2015; Galluzi *et al.*, 2018). Medzi receptory smrti patrí FAS, TNFR1, DR4 a DR5. Naviazanie špecifických ligandov umožňuje tvorbu multiproteínového komplexu na konci receptoru v bunke, nazývaného DISC, ktorý slúži ako základ pre aktiváciu a reguláciu kaspázy 8. Aktivácia kaspázy 8 prebieha naviazaním jej neaktívnej formy na FADD (FAS associated via death domain) v prítomnosti DISC komplexu. Táto interakcia spôsobí samoštiepenie kaspázy 8 za jej konverzie na aktívnu formu (Dickens *et al.*, 2012; Kominami *et al.*, 2012).

Aktivovaná kaspáza 8 ďalej postupuje cez dve dráhy. Prvá súvisí s transportom do cytoplazmy a spustením efektorových kaspáz 3 a 7, čo vyústí do rýchlej smrti bunky. Táto dráha sa nedá ďalej spomaliť alebo zastaviť ani pomocou anti-apoptického proteínu Bcl-2. Druhá dráha zahŕňa aktiváciu kaspázy 9, ktorá je súčasťou vnútornej dráhy. Toto má za následok spustenie kaspázy 3 a kaskádu vnútornej dráhy apoptózy (Kruidering a Evan, 2000).



Obr. 4 Znáznorenie mechanizmu vnútornej a vonkajšej dráhy apoptózy (prevzaté a upravené od Patel *et al.*, 2010)

Receptory závislosti sa skladajú zo skupiny asi 20 členov (Goldschneider a Mehlen, 2010; Mehlen a Tauszig-Delamasure, 2014). Tieto receptory podporujú bunkové prežitie a proliferáciu v prípade, že ich príslušné ligandy sú prítomné v dostatočných hladinách. Naopak, ak prítomnosť ligandu klesne pod špecifickú hranicu, receptory aktivujú signálne kaskády kaspáz vedúce k bunkovej smrti (Mehlen a Tauszig-Delamasure, 2014; Galluzi *et al.*, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

V tejto práci bola použitá nádorová línia kolorektálneho karcinómu HCT116WT .

Suché šafranové piestiky boli poskytnuté prof. Hassan Ashktorabom z Howard University vo Washingtone.

3.1.2 Chemikálie a súpravy

30% Akrylamid/Bis Solution 29:1 (161-0156; BIO-RAD)

4% Formaldehyd (HT501128-4L; Sigma Aldrich)

Azid sodný (71289; Sigma Aldrich)

Bromfenolová modrá (114391; Sigma Aldrich)

DAPI (D9542-10MG; Sigma Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan draselný (30016-APO; lach:ner)

Dimetylsulfoxid (A3672,0250; AppliChem)

DL-Ditiotreitol (D0632-25G; Sigma Aldrich)

Dodecylsírán sodný (71729-500G; Sigma Aldrich)

Fetálne hovädzie sérum (10270-106; Gibco®; Thermo Fisher Scientific)

Glycerín bezvodý (14550-11000; Penta)

Glycín (G8898-1KG; Sigma Aldrich)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (12340-31000; Penta)

Chlorid draselný (30076-APO-G0500-1; lach:ner)

Chlorid sodný (31434-5KG-R; Sigma Aldrich)

Isopropylalkohol (17500-20005; Penta)

Kyselina octová (19990-11000; Penta)

L-Glutamín (G7513-100ML; Sigma Aldrich)

McCoy's 5A médium (M8403-500ML; Sigma Aldrich)

N,N,N',N'-Tetrametyletyléndiamín; TEMED (T9281-25ML, Sigma Aldrich)

Nitrocelulózoová membrána 0,45 µm (1620115; BIO-RAD)

Penicilín-Streptomycín (P4333-100ML; Sigma Aldrich)

Peroxodisírán amónny (215589-100G; Sigma Aldrich)

Ponceau S (P3504-10G; Sigma Aldrich)

Precision Plus Protein™ Standard Dual Color (161-0374; BIO-RAD)

Tab. 1 Zoznam použitých protilátok

Protilátka	Pôvod	Riedenie	Výrobca	Katalógové č.
Alexa Fluor 488, anti mouse IgG	koza	1:500	Invitrogen	a11001
Alexa Fluor 568, anti rabbit IgG	koza	1:500	Invitrogen	a11036
53BP1	králik	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc22760
Atm	králik	1:250	Cell Signaling Technology	2873s
Atr	koza	1:250	Santa Cruz Biotechnology	sc1887
BRCA1	myš	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc6954
cyklín A	králik	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc751
GAPDH	myš	1:1000	GeneTex	gtx78213
Chk1	myš	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc8408
Chk2	králik	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc9064
p21	králik	1:1000	Cell Signaling Technology	2947s
p53	myš	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc126
PARP1	králik	1:500	Cell Signaling Technology	9542s
p-Atm (ser1981)	králik	1:250	Cell Signaling Technology	5883s
p-Atr (ser428)	králik	1:250	Cell Signaling Technology	2853s
p-Chk1 (ser345)	králik	1:250	Cell Signaling Technology	2348s
p-Chk2 (thr68)	králik	1:250	Cell Signaling Technology	2197s
p-p53 (ser15)	králik	1:250	Cell Signaling Technology	9284s
RAD51	králik	1:500	Abcam	ab63801
γH2AX (IF)	myš	1:500	EMD Millipore	05-636
γH2AX (WB)	králik	1:1000	Cell Signaling Technology	9718s
Peroxidase linked anti goat IgG	somár	1:2000	Abcam	ab6885
Peroxidase linked anti mouse IgG	ovca	1:1000	GE Healthcare	na931v
Peroxidase linked anti rabbit IgG	somár	1:1000	GE Healthcare	na934v

Propidium jodid (81845-25MG; Sigma Aldrich)
Protilátky, vid'. Tab. 1
ReBlot Plus Mild Solution 10x (2502; EMD Millipore)
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095; Thermo Fisher Scientific)
SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (34580; Thermo Fisher Scientific)
Sušené mlieko odtučnené (Laktino)
Tris (37180.04; SERVA)
TritonX 100 (3051.2; ROTH)
Trypsin TrypLE Express (+) Phenol Red (12605-028; Thermo Fisher Scientific)
Tween 20/Polysorbate 20 (9005-64-5; MP Biomedicals)
VECTASHIELD® Mounting Medium (H-1000, Vector Laboratories)

3.1.3 Roztoky

0,1% Ponceau S v 5% kyseline octovej
0,1% Tween20 v 1x PBS
0,5% TritonX v 1x PBS
1% propidium jodid vo vode
10% peroxodisíran amónny vo vode
10% dodecylsírán sodný vo vode
10x PBS ($1,37 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, $27 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 , $18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, H_2O)
10x TBS (pH 7,6; $1,37 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, H_2O)
10x Tris-Glycin Transfer pufr ($192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycín, $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, H_2O , 10 % metanol)
10x Tris-Glycin-SDS Running pufr ($192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycín, $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, 0,1 % SDS, H_2O)
2% roztok DAPI vo vode
4x LSB vzorkovací pufr ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH = 6,8; 10 % glycerol; 2 % SDS, 0,01 % Bromphenol blue, $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT, H_2O)
5% sušené mlieko v TBS
Blokovací roztok pre Cytospin (5% FBS, 0,1% NaN_3 v 1x PBS)

Blokovací roztok pre WB (5% sušené mlieko, 0,01% Tween20 v 1x TBS)

Reblotovací roztok (10% ReBlot v H₂O)

3.1.4 Prístroje

Automatické pipety (Eppendorf Research plus; Discovery Comfort)

Automatický pipetor (TPP Turbo Fix Pipette-Aid; Techno Plastic Products)

Biologický iradiátor (RS225; Xstrahl LTD)

Centrifúga (Scanspeed 1236R; LaboGene)

Cytocentrifúga (Cytotek™ Cytocentrifuge; Sakura)

Elektrobloter (OWL HEP-1; Thermo Fisher Scientific)

Elektroforetická aparátúra (Mini-PROTEAN® Tetra Cell; Biorad)

Fluorescenčný mikroskop (IX81, Cell^R /Scan^R system; Olympus)

Inkubátor (HERAcell 150i CO₂ Incubator; Trigon-Plus®)

Laminárny box (HERAsafe KS; Trigon-Plus®)

Mikrocentrifúga (Smart 15 Micro Centrifuge; Hanilbiomed Co., Ltd.)

Mikroskop (Primo Vert; Zeiss)

Minicentrifúga (MyFuge™ Mini; Benchmark)

Mraznička (Innova® U725; Eppendorf)

Orbitálna trepačka (PSU-10i Orbital Shaker; Grant-bio)

Počítacia buniek (Vi-Cell XR; Beckman Coulter®)

Prietokový cytometer (FACSVerse™ Flow cytometer; BD Biosciences)

Termotrepačka (Thermo-Shaker TS-100C; BioSan)

Vodný kúpeľ (WNB 45; Memmert)

Vortex (Vortex Genius 3; IKA)

Zdroj (EV202 Electrophoresis power supply; Consort)

Zobrazovacie zariadenie (ChemiDoc™ XRS+ System; BioRad)

3.1.5 Software

BD FACSuite™ (verzia 1.0; BD Biosciences)

Scan^R Analysis (verzia 2.4.0.11; Olympus)

Scan^R Aquisition (verzia 2.4.0.13; Olympus)

ImageLab (verzia 6.0.1; BioRad)

STATISTICA (verzia 13.1; StatSoft)

3.2 Metódy

3.2.1 Kultivácia bunkovej línie

Nádorová línia, kolorektálny karcinóm HCT116WT, bola pestovaná v McCoy médiu obohatenom o 10% FBS, 2mM glutamín a 1% zmes antibiotík streptomycín a penicilín pri štandardnom nastavení inkubátoru 5% CO₂, teplota 37 °C.

Pri dosiahnutí zhruba 80% konfluencie bunkovej línie bolo línia pasážovaná pomocou trypsinizácie. Po odsatí starého živného média boli bunky premyté sterilným roztokom PBS. Po odstránení PBS boli bunky trypsinizované prídavkom trypsínu v objeme 2 ml na kultivačnú nádobu (75cm³). Po 3 min inkubácie v inkubátore bol trypsin neutralizovaný prídavkom 8 ml média. Zmes bola jemne prepipetovaná a spasážovaná na 50 % a to tak, že 5 ml suspenzie bolo odpipetovaných do 15ml skúmavky a následne odstránené do odpadu. K zvyšným 5 ml suspenzie buniek v kultivačnej fľaške bolo doplnené nové živné médium a fľaška bola vrátená späť do inkubátoru.

3.2.2 Rozmrazovanie/zamrazovanie bunkovej línie

Kryoskúmavky s bunkovou kultúrou boli uchovávané v tekutom dusíku. V prípade potreby bol obsah kryoskúmavky rozmrazený. Bunky v kryoskúmavke boli jemne prenesené do 15ml centrifugačnej skúmavky s 10 ml živného média a jemne prepipetované. Po centrifugácii pri 200 G pri laboratórnej teplote po dobu 10 min nasledovalo odstránenie supernatantu, resuspendovanie bunkového peletu v médiu a prenesenie do príslušnej kultivačnej nádoby s médiom.

Pre zachovanie dostatočného množstva materiálu na experimenty bolo nutné bunky v zamraziť. Po trypsinizácii a centrifugácii buniek pri 200 G a laboratórnej teplote po dobu 10 min bola bunková suspenzia resuspendovaná v roztoku pre zamrazovanie (90 % FBS, 10 % DMSO). Označené kryoskúmavky s bunkovou kultúrou boli uložené do mrazničky na -80 °C a nasledujúci deň prenesené do tekutého dusíku.

3.2.3 Príprava vodného extraktu šafranu

Do 1,5ml skúmavky bolo navážených 20 mg suchého šafranu. Následne bol pridaný 1 ml sterilnej destilovanej vody. Extrakcia šafranu prebiehala na trepačke pri 1400 RPM, 25 °C po dobu 24 h.

Následne bol 1 ml extraktu šafranu nariadený na požadovanú koncentráciu 2 mg·ml⁻¹ a to prídavkom 9 ml živného média. Takto pripravený extrakt bol prefiltrovaný

cez 0,22 μ m filter a ihneď použitý k ošetrovaniu nádorovej línie HCT116 WT. Rovnakým spôsobom bolo pripravené aj kontrolné médium, k 9 ml živného média bol pridaný 1 ml destilovanej vody.

3.2.4 Detekcia cytotoxického efektu šafranu pomocou prietokovej cytometrie a farbenia propidium jodidom

Nádorová línia HCT116 WT bola vysadená na 20mm Petriho misku v počte 4 x 10⁵ buniek na 1 misku 24 h pred ošetrovaním extraktom šafranu. Po 24 h inkubácií s extraktom šafranu (2 mg·ml⁻¹) nasledovalo ožiarenie buniek röntgenovým žiarením s intenzitou 2 Gy. Takto ožiarené bunky boli prenesené naspäť do inkubátoru. Po 72 h bolo najprv odpipetované živné médium obsahujúce mŕtve bunky a potom nasledovala trypsinizácia buniek. Živé bunky boli zmiešané v 15ml skúmavke s pôvodným médiom a mŕtvymi bunkami a nasledovalo stanovenie ich počtu a životaschopnosti pomocou prístroja na počítanie buniek Vi-Cell Counter.

Nasledovalo odstredenie buniek na centrifúge pri 200 G a 4 °C po dobu 5 min a premytie 3 ml PBS a znovu odstredenie na centrifúge pri 200 G a 4 °C po dobu 5 min. Premyté bunky boli resuspendované v 200 μ l PBS a zafixované. Na zafixovanie buniek bol použitý 1 ml 96% etanolu s teplotou -20 °C pridávaný po kvapkách za mierneho točenia na vortexe. Vzorky určené na fixáciu boli neustále udržiavané na ľade. Po fixácii boli vzorky uchovávané v mrazničke a pripravené k farbeniu propidium jodidom (PI), prípadne ihneď farbené.

K zafixovaným vzorkám boli pridané 3 ml PBS s 0,2% FBS a vzorky boli ponechané na ľade 10 min. Nasledovalo odstredenie na centrifúge pri 200 G a 4 °C po dobu 5 min. Supernatant bol odstránený a usadenina rozpustená v 50 μ l PBS s 0,2 mg·ml⁻¹ RNAzou A. Vzorky boli inkubované 30 min pri laboratórnej teplote a následne boli inkubované s 200 μ l PI roztoku. Po 15 min inkubácie na ľade a bez prístupu svetla boli vzorky prepipetované do 1,5ml skúmaviek a podrobené analýze prietokovým cytometrom.

3.2.5 Elektroforetická separácia proteínov v polyakrylamidovom géle za prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Vzorky pripravené lýzou buniek priamo do vzorkovacieho pufru boli separované pomocou SDS-PAGE. Pre separáciu bol pripravený gél zložený zo 4% zaostrovacieho a 12% deliaceho, ich zloženie uvedené v tab. 2.

Ako prvý bol zhotovený deliaci gél, ktorého roztok bol napipetovaný medzi elektroforetická sklá a ponechaný voľnej polymerizácií po dobu 30 min pri laboratórnej teplote. Ako opatrenie na zaistenie rovného povrchu bol ešte navyše pridaný malý objem izopropanolu, ktorý bol neskôr odstránený filtračným papierom. Potom nasledovalo zhotovenie zaostrovacieho gélu, ktorý bol rovnakým spôsobom nanosený na deliacu časť. Do zaostrovacieho gélu bol ešte pred polymerizáciou vložený hrebienok slúžiaci k tvorbe jamiek. Zhotovený gél bol umiestnený do elektroforetickej vane a po odstránení hrebienku boli do jamiek nanášané vzorky určené k separácií.

Ako štandard molekulovej hmotnosti (250 – 10 kDa) bol použitý Precision Plus ProteinTM (BioRad) napipetovaný do bočnej jamky. Elektroforetická separácia prebiehala v Tris-Glycín-SDS pufru a laboratórnej teploty. Počas procesu separácie proteínov v zaostrovacom géle bol nastavený konštantný prúd 20 mA. Následná separácia vzoriek v deliacom géle prebiehala za konštantného prúdu 40 mA. Akonáhle štandard dosiahol koniec deliaceho gélu bola elektroforetická separácia ukončená.

Tab. 2 Zloženie 12% deliaceho a 4% zaostrovacieho gélu

Chemikálie (ml)	12% deliaci gél	4% zaostrovací gél
Destilovaná H ₂ O	2,5	1,35
30% Akrylamid	3,0	0,335
1,5 mol·l ⁻¹ Tris, pH= 8,8	1,9	-
0,5 mol·l ⁻¹ Tris, pH= 6,8	-	0,25
10% SDS	0,075	0,02
10% APS	0,075	0,02
TEMED	0,003	0,002

3.2.6 Western blot a imunologická detekcia proteínov

Po separácii vzoriek pomocou SDS-PAGE bol gél opatrne vybraný z elektroforetických skiel a horná, zaostrovacia, časť odstránená. Do semi-dry blot prístroju bol navrstvený 3x filtrovací papier zvlhčený v transferovom pufre a predom zvlhčená nitrocelulózoová membrána. Na membránu bol umiestnený gél so separovanými proteínmi a nasledovali ďalšie 3 vrstvy zvlhčeného filtrovacieho papiera.

Proces prenosu proteínov na membránu prebiehal na prístroji semi-dry blot za konštantného prúdu 150 mA na jeden gél po dobu 90 min. Po skončení procesu blotovania bola nitrocelulózoová membrána prenesená do farbiaceho roztoku Ponceau. Po 5 min farbenia bola membrána prepláchnutá destilovanou vodou za účelom odstránenia prebytočného farbiaceho roztoku.

Usušená membrána bola narezaná na jednotlivé časti podľa molekulovej hmotnosti sledovaných proteínov. Farbiaci roztok Ponceau bol odstránený premytím v roztoku TBS s 0,1% Tweenom20. Narezaná membrána bola inkubovaná v blokovacom roztoku (5% roztok sušeného mlieka v TBS s 0,1% Tweenom20) po dobu 60 min pri laboratórnej teplote za účelom zablokovania prípadných nešpecifických väzieb. Nasledovalo premytie membrány roztokom TBS s 0,1% Tweenom20 3x po dobu 10 min.

Proteíny boli detegované pomocou primárnych protilátok nariadených podľa potreby v blokovacom roztoku. Po nanesení protilátok boli membrány inkubované cez noc pri teplote 4 °C. Po prebehnutých inkubáciách boli membrány premyté 3x v roztoku TBS s 0,1% Tweenom20 po dobu 10 min, čím došlo k odstráneniu nenaviazaných protilátok. Nasledovala detekcia proteínov pomocou sekundárnej protilátky značenej chrenovou peroxidázou, nariadenou v blokovacom roztoku. Inkubácia prebiehala 60 min pri laboratórnej teplote. Po inkubáciách boli membrány opätovne prepláchnuté 3x v roztoku TBS s 0,1% Tweenom20 po dobu 10 min. Vizuálna detekcia proteínov bola vykonaná pridaním vyvolávacieho roztoku SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate a SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate v pomere 3:1. Signál bol zachytený použitím zobrazovacieho zariadenia ChemiDoc™ XRS+ System a analyzovaný programom ImageLab.

V prípade detekcie fosforylovaných foriem proteínu bola detekovaná najprv fosforylovaná forma. Pre detekciu celkového proteínu bola membrána premytá v roztoku TBS s 0,1% Tweenom20 po dobu 5 min a reblotovaná pomocou reblotačného roztoku po dobu 30 min. Po prepláchnutí membrány v destilovanej vode 3x po dobu 5

min bola vykonaná detekcia celkového proteínu a to vyššie uvedeným postupom. Zoznam použitých primárnych a sekundárnych protilátok, vrátane ich riedenia je uvedený v tab.1

3.2.7 Cytospin a imunofluorescenčná analýza ukazovateľov DNA poškodenia pomocou mikroskopie

Kolorektálny karcinóm HCT116WT bol vysadený na 20mm Petriho misky v počte 5×10^5 buniek/miska 24 h pred ošetrením roztokom šafranu. Po 24 h inkubácií s extraktom šafranu ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) nasledovalo ožiarenie buniek röntgenovým žiarením s intenzitou 2 Gy. Takto ožiarené bunky boli prenesené naspäť do inkubátoru. Po uplynutí 30 min boli ožiarené bunky dané na ľad za účelom spomalenia a zastavenia procesov prebiehajúcich v bunkách a nasledovalo ich pozbieranie pomocou trypsinizácie. Pomocou prístroja na počítanie buniek Vi-Cell Counter bol stanovený ich počet a životaschopnosť.

Bunky boli odstredené na centrifúge pri 200 G a 4°C po dobu 5 min, supernatant bol odstránený a bunky boli zafixované v $600 \mu\text{l}$ 4% formaldehydu. Fixácia prebiehala 15 min pri laboratórnej teplote. Po uplynutí fixačnej doby boli bunky odstredené na centrifúge pri 200 G a laboratórnej teplote po dobu 5 min. Po odstránení formaldehydu bola bunková usadenina resuspendovaná v adekvátnom množstve 1x PBS s 0,1% azidom sodným na dosiahnutie koncentrácie 15×10^4 buniek na $200 \mu\text{l}$ 1x PBS s 0,1% azidom sodným.

Nasledovalo „nastrelenie“ buniek na mikroskopické sklíčka využitím prístroja Cytospin v objeme $200 \mu\text{l}$ na 1 sklíčko. Nastavenie prístroja bolo rýchlosť 5 po dobu 2 min. V prípade, že sa s bunkami ihneď nepokračovalo v analýze ukazovateľov poškodenia DNA, boli sklíčka udržiavané v 1x PBS s 0,1% azidom sodným pri teplote 4°C .

Nasledovala inkubácia sklíčok s 1x PBS s 0,5% detergentom TritonX-100 pri laboratórnej teplote po dobu 15 min. Zvyšky detergentu boli odstránené pridaním 1x PBS a premývaním na orbitálnej trepačke pri 90 RPM, laboratórnej teplote po dobu 3 min. Tento proces sa opakoval 3x. Po premytí bol k sklíčkam pridaný roztok 1x PBS s 0,1% detergentom Tween20, ktorý bol po uplynutí 5 min odstránený a nahradený blokovacím roztokom (1x PBS + 5% FBS + 0,1% azid sodný. Inkubácia s blokovacím roztokom prebiehala pri laboratórnej teplote počas 60 min. Zvyšok blokovacieho roztoku zo sklíčok bol vymytý prepláchnutím 1x PBS a následne 1x PBS s 0,1% Tween20 na orbitálnej trepačke pri laboratórnej teplote po dobu 3 min.

Imunologická detekcia prebiehala pridaním primárnych protilátok nariedených podľa potreby v blokovačom roztoku. Sklíčka boli po nanosení protilátok inkubované cez noc pri teplote 4 °C. Po prebehnutých inkubáciách boli nenaviazané primárne protilátky odstránené premytím v roztoku 1x PBS s 0,1% Tween20 pri laboratórnej teplote po dobu 10 min a 1x PBS za rovnakých podmienok. Nasledovalo pridanie roztoku 1x PBS s 0,1% Tween20 pri laboratórnej teplote po dobu 5 min. Detekcia proteínov prebiehala po odstránení predchádzajúceho roztoku a pridaním sekundárnej protilátky konjugovanej s farbivom Alexa Fluor, nariedenej v blokovačom roztoku podľa potreby. Inkubácia prebiehala za tmy pri laboratórnej teplote po dobu 60 min. Po inkubáciách boli sklíčka opäť premyté 1x PBS po dobu 10 min a destilovanou vodou tiež po dobu 10 min. Na zafarbenie jadier sa použilo farbenie pomocou roztoku interkalačného farbiva DAPI v destilovanej vode po dobu 5 min. Sklíčka po odstránení roztoku DAPI boli ponechané voľne uschnúť a do stredu sklíčka boli pridané 4 µl montovacieho média Vectashield. Nakoniec boli sklíčka napevno prekryté krycím sklíčkom a po okrajoch zalepené lakom na nechty.

Na vytvorenie snímok na analýzu ukazovateľov poškodenia DNA bol použitý fluorescenčný mikroskop s programom Scan^R Aquisition. Programom bolo vyfotené zvolené množstvo pozícií využitím troch farebných kanálov podľa použitých fluorescenčných farbív. Pri vlnovej dĺžke 470 nm bolo fotené DAPI emitujúce modré svetlo, vlnová dĺžka 525 nm bola zvolená pre farbivo Alexa Fluor 488 a červený kanál snímajúci vlnovú dĺžku 603 nm bol použitý pre farbivo Alexa Fluor 568. Následne boli vyfotené snímky analyzované programom Scan^R Analysis a výsledky spracované v programe STATISTICA. Zoznam použitých primárnych a sekundárnych protilátok vrátane ich riedenia je uvedený v tab. 1.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Štúdium cytotoxického vplyvu šafranu na nádorovú líniu HCT116 WT

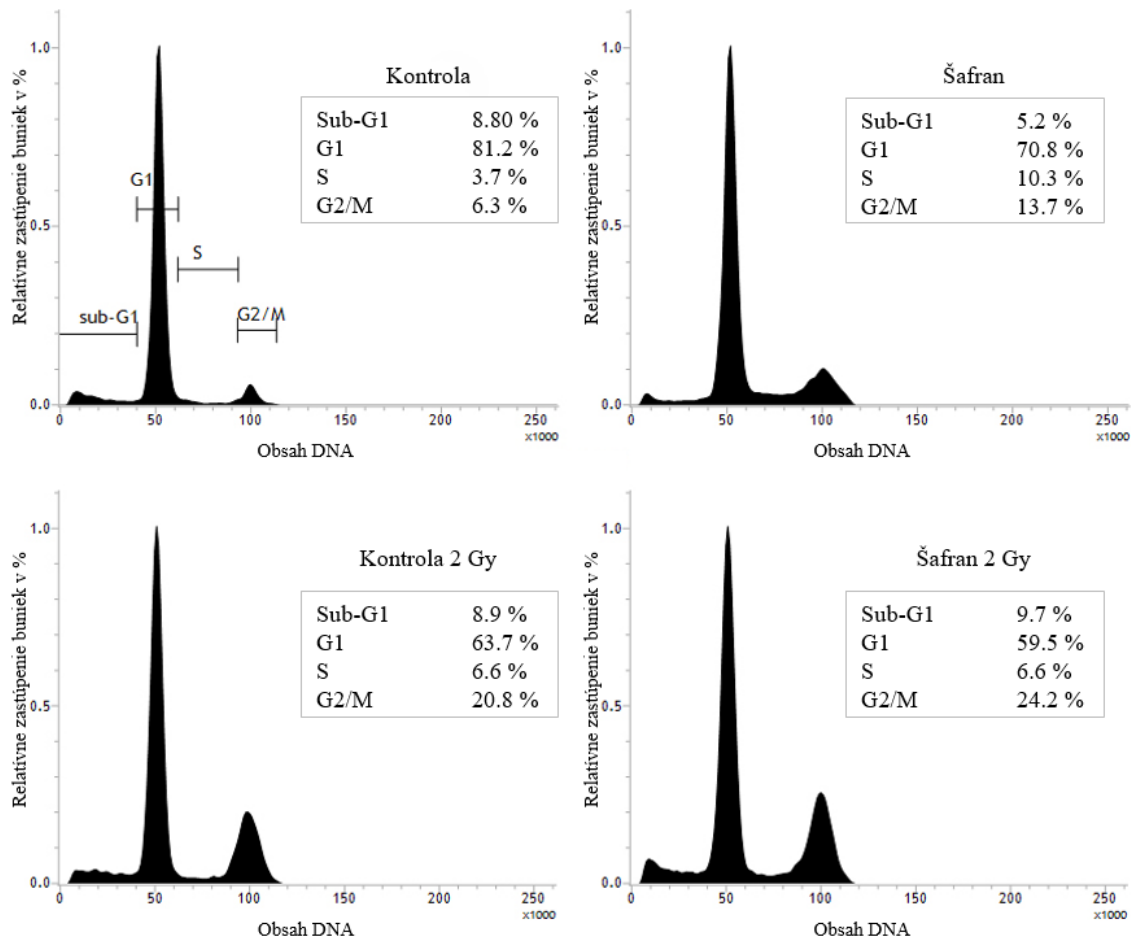
V prvej časti experimentálnej práce sme sa zamerali na štúdium vplyvu extraktu šafranu na životaschopnosť nádorovej línie HCT116 WT bez a spolu s pôsobením IR. Celkový extrakt šafranu s koncentráciou $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol pripravený podľa odporúčania prof. Ashktoraba a podrobný postup extrakcie šafranu je popísaný v kapitole 3.2.3.

Pomocou prietokovej cytometrie sme sledovali bunkový cyklus a to hlavne tzv. sub-G1 populáciu, ktorá predstavuje poškodené bunky s fragmentovanou DNA (Tavakkol-Afshari *et al.*, 2008; Bakshi *et al.*, 2010).

Analýzou bunkového cyklu buniek ošetrovaných extraktom šafranu sme žiadny signifikantný nárast sub-G1 populácie oproti kontrolným vzorkám nepozorovali a to aj v prípade, keď bolo použité ošetrovanie extraktom šafranu v kombinácii s IR. Je možné pozorovať mierne predĺženie S fázy a zvýšenie G2/M fázy bunkového cyklu pri bunkách ošetrovaných šafranom v porovnaní s kontrolou. Kombinácia extraktu šafranu s IR nevykazuje zvýšenie citlivosti buniek k ožiareniu (Obr. 5).

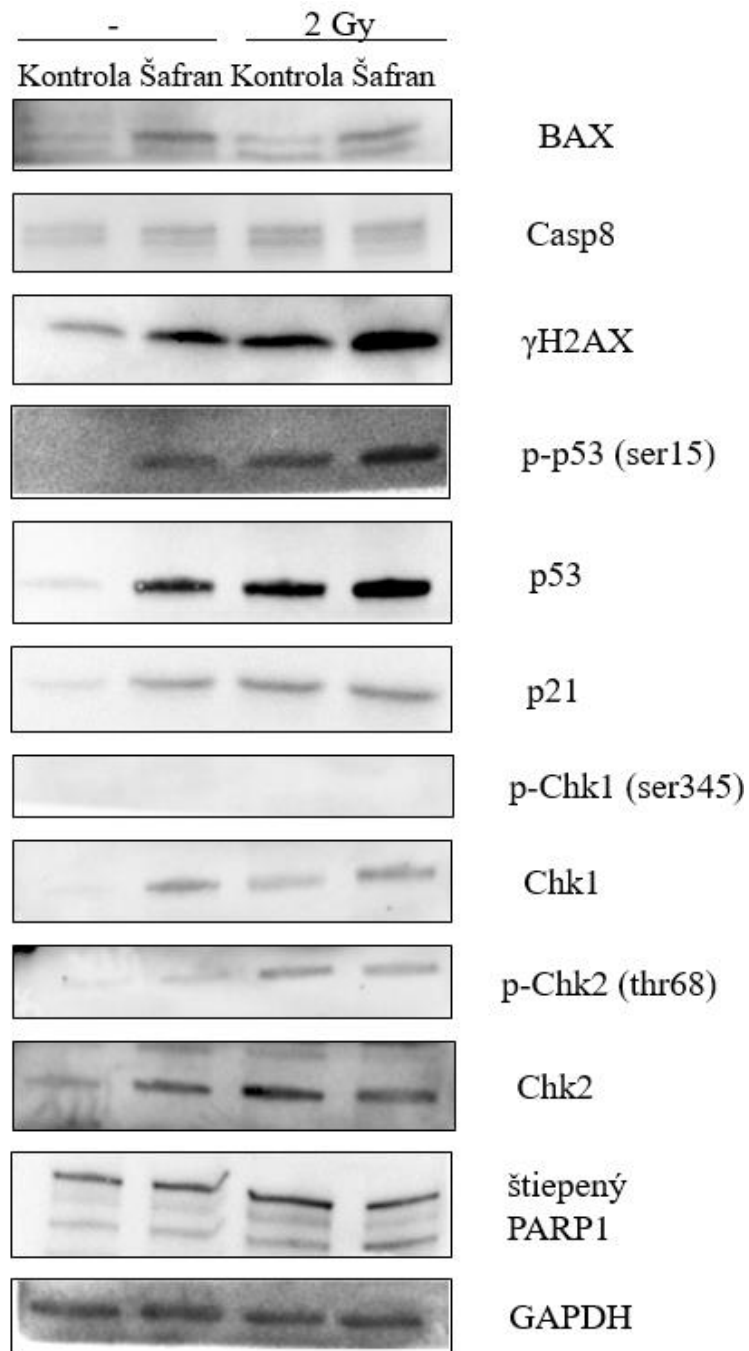
Rovnaké vzorky ako boli použité na analýzu bunkového cyklu pomocou prietokového cytometru sme spracovali aj na semi-kvantitatívnu detekciu proteínov pomocou metódy Western blot. Zamerali sme sa hlavne na detekciu proteínov bunkovej smrti a zároveň proteínov kontrolných bodov bunkového cyklu ako Chk1, Chk2, p21 či p53, keďže po analýze bunkového cyklu sme pozorovali mierny nárast G2/M fázy a predĺženie S fázy (Obr. 6).

Výsledky poukazujú na mierne zvýšenie pro-apoptických proteínov BAX, kaspázy 8, p53 a zvýšenie proteínu γH2AX v bunkách ošetrovaných extraktom šafranu oproti kontrolným bunkám. Toto zvýšenie by mohlo poukazovať na čiastočné zníženie životaschopnosti línie HCT116 WT po ošetrovaní šafranom a zvýšená hladina proteínu p21 a fosforylácia Chk2 taktiež na aktiváciu kontrolného bodu G2/M, čo by podporovalo dáta získané prietokovou cytometriou.



Obr. 5 Analýza bunkového cyklu HCT116 WT línie pomocou prietokového cytometra a farbenia PI. Bunky boli ošetrované extraktom šafranu ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 24 h) a následne ožiarené 2 Gy. Zbieranie buniek prebiehalo 72 h po ožiarení.

Kombinácia IR a ošetrovanie vodným extraktom šafranu vykazuje zvýšenú hladinu γH2AX proteínu a fosforyláciu p53 proteínu so zníženou aktiváciou Chk2, čo poukazuje na možné zvýšenie poškodenia v bunkách ošetrovaných extraktom šafranu oproti kontrolným vzorkám. Detekcia fosforylácie p53 proteínu taktiež poukazuje na zvýšenú aktiváciu, avšak nie sme si istí funkčnosťou použitej protilátky. Celková hladina proteínu p53 bola detegovaná po reblote membrány s detegovaným p-p53 (ser15). Vzhľad a umiestnenie pruhov znázorňujúcich hladinu detegovaného celkového proteínu p53 je však identický. Fosforylovanú formu by sme taktiež očakávali vyššie umiestnenú, keďže fosforylácia mierne zvyšuje molekulovú hmotnosť proteínu.



Obr. 6 Western blot analýza pro-apoptických proteínov a proteínov bunkovej odpovedi na poškodenie DNA

Náš predpoklad zníženej životaschopnosti HCT116 WT línie po ošetrení extraktom šafranu a mierny príspevok IR taktiež podporujú hodnoty získané pomocou prístroja Vi-Cell. Tento prístroj slúži k stanoveniu množstva buniek v suspenzii a ich životaschopnosti (Tab. 4). Dáta z prístroja Vi-Cell nevykazujú signifikantné rozdiely medzi životaschopnosťou buniek ošetrených šafranom a kontrolnými bunkami avšak poukazujú na trend zhoršenej životaschopnosti a zníženej proliferácie v bunkách ošetrených šafranom.

Tab. 2 Zhodnotenie životaschopnosti a počtu buniek nádorovej línie HCT116 WT po ošetrení extraktom šafranu ($2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 24 h) a 72 h inkubácií po ožiarení 2 Gy. Experiment bol vykonaný v triplikáte, vybrané sú reprezentatívne údaje jedného z experimentov.

HCT116 WT	Životaschopnosť	Počet buniek/ml
Kontrola	97,2 %	$6,9 \times 10^5$
Ošetrené šafranom	94,6 %	$3,7 \times 10^5$
Kontrola 2 Gy	95,5 %	$3,8 \times 10^5$
Ošetrené šafranom 2Gy	89,5 %	$2,4 \times 10^5$

Na základe dát získaných z prietokového cytometru a Western blotu môžeme vylúčiť významný cytotoxický vplyv extraktu šafranu ($2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) na nádorovú líniu HCT116 WT. Použitá koncentrácia nemá taký efekt, ktorý by spôsobil značné poškodenie bunky vedúce k bunkovej smrti alebo aspoň okamžitej aktivácie apoptózy. Dochádza však k aktivácii kontrolných bodov p53 a p21. Aktiváciou Chk2 proteínu zároveň dochádza k spomaleniu bunkového cyklu a teda vytvorenie priestoru na aktiváciu proteínov zodpovedných za opravu poškodenej DNA.

Naopak, v bunkách po ošetrení extraktom šafranu a použití IR dochádza k poškodeniu DNA, ktoré je detegované zvýšením hladiny γH2AX proteínu. Prípadná fosforylácia p53 proteínu spolu so zníženou aktiváciou Chk2 môže taktiež poukazovať na zvýšenú citlivosť buniek k IR, pokles aktivácie kontrolných bodov bunkového cyklu a spúšťanie dráh bunkovej smrti.

Výsledky naznačujúce trend zhoršenej životaschopnosti v bunkách ošetrených extraktom šafranu sa zhodujú s výsledkami publikácie Tavakkol-Afshari *et al.* (2008). My sme však používali kolorektálny karcinóm a navyše sme do štúdie zapojili aj IR. Krocín, jeden z karotenoidov obsiahnutých v šafrane, použitý v publikácii Vazifedan *et al.* (2017) trend zhoršenej životaschopnosti a zníženej proliferácie v kombinácii s IR zvýrazňuje, rovnako ako v našej štúdií. Naše výsledky sa však rozchádzajú pri pozorovaní apoptózy. My nepozorujeme signifikantnú tvorbu sub-G1 populácie ako Tavakkol-Afshari *et al.*, (2008) alebo Vazifedan *et al.* (2017). Pravdepodobným dôvodom rozdielného výsledku môže byť odlišné biologické pozadie jednotlivých bunkových línií, iný spôsob extrakcie šafranu, odlišná koncentrácia použitého šafranového extraktu alebo aplikácia len jednej zložky nachádzajúcej sa v šafrane.

Jeden z proteínov, ktorý prispieva k zastaveniu bunkového cyklu v G2/M fáze je Chk2. My môžeme pozorovať jeho zvýšenú hladinu v bunkách ošetrených extraktom

šafранu, čo sa zhoduje s výsledkami publikácie Dhar *et al.* (2009), ktorí pozorovali zastavenie bunkového cyklu v G2/M. Tvrdenie, že extrakt šafранu inhibuje postup bunky v bunkovom cykle a aktivuje G2/M kontrolný bod je podporený aj článkom Sawant *et al.* (2019) a Bajbouj *et al.* (2012). V našej práci sme navyše overili efekt spolupôsobenia extraktu šafранu a IR. Pokles hladiny p-Chk2 (thr68) odkazuje na zníženú aktiváciu kontrolného bodu a hromadiace sa DNA poškodenie, na čo odkazuje zvýšená hladina γ H2AX, p53 a prípadne jeho fosforylovanej formy.

4.2 Štúdium vplyvu extraktu šafранu na schopnosť odpovedi línie HCT116 WT na poškodenie DNA

Po analýze predchádzajúcich dát sme dospeli k záveru, že ošetrovanie nádorovej línie HCT116 WT extraktom šafранu vykazuje aktiváciu kontrolného bodu bunkového cyklu G2/M a predĺženie S fázy a taktiež zvýšenie ukazovateľa DNA poškodenia γ H2AX bez signifikantného zvýšenia bunkovej smrti.

Zamerali sme sa teda na časovo závislú detekciu proteínov, ktoré sú aktivované pri poškodení DNA. Zvolili sme časové úseky 0, 1, 3, 6, 12 a 24 h po ožiarení pretože niektoré proteíny sú aktivované hneď a niektoré neskôr. Pre vzorky bez ožiarenia sme zvolili časové úseky 0, 12 a 24 h z dôvodu neprítomnosti IR a teda absencie ihneď pozorovateľných zmien.

Semi-kvantitatívna analýza vzoriek bez ožiarenia pomocou techniky Western blot poukazuje na signifikantnú zmenu v hladine fosforylovaného proteínu Chk2 po 24 h, čo by odpovedalo aktivácii G2/M kontrolného bodu (Obr.7, A). Zvýšenie hladiny p-Chk2 (thr68) súhlasí s predchádzajúcimi výsledkami v našej štúdií týkajúcich sa časového úseku 72 h.

Zvýšená hladina Chk1 proteínu, ktorá postupne klesá by mohla poukazovať na počiatočné replikačné problémy a teda predĺženie S fázy bunkového cyklu v bunkách ošetrovaných extraktom šafранu. Celková hladina proteínu Chk1 kolíše taktiež v kontrolných vzorkách, jedná sa zrejme o špecifickosť tejto nádorovej línie.

Zvýšená fosforylácia Chk2 proteínu so zníženou aktiváciou Chk1 by mohla poukazovať na prechod buniek z S fázy do G2 a následnou aktiváciou G2/M kontrolného bodu. Tieto výsledky sa zhodujú s výskumom publikovaným v článku Bajbouj *et al.*, (2012).

Fosforylované proteíny ATM/ATR sa nám nepodarilo detegovať. Pravdepodobným dôvodom je ich vysoká molekulová hmotnosť a teda náročný prenos proteínu na membránu. Nevylučujeme však aj prípadnú neúčinnosť primárnych protilátok.

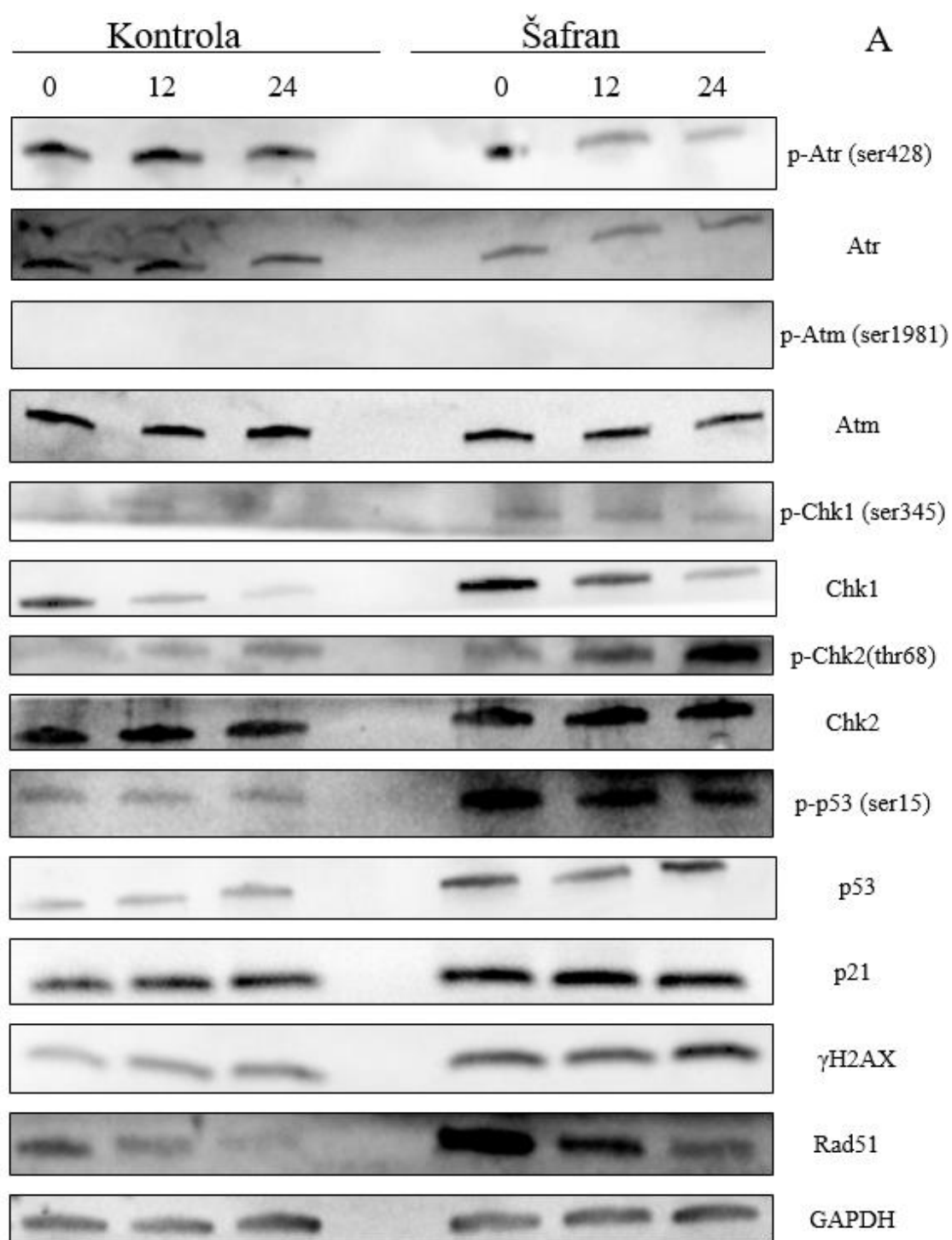
Pozorovaním fosforylácie proteínu p53 oproti kontrolnej vzorke môžeme usúdiť, že extrakt šafranu spôsobuje poškodenie DNA v nádorovej línii HCT116 WT. Toto tvrdenie je podporené aj postupným zvyšovaním γ H2AX proteínu.

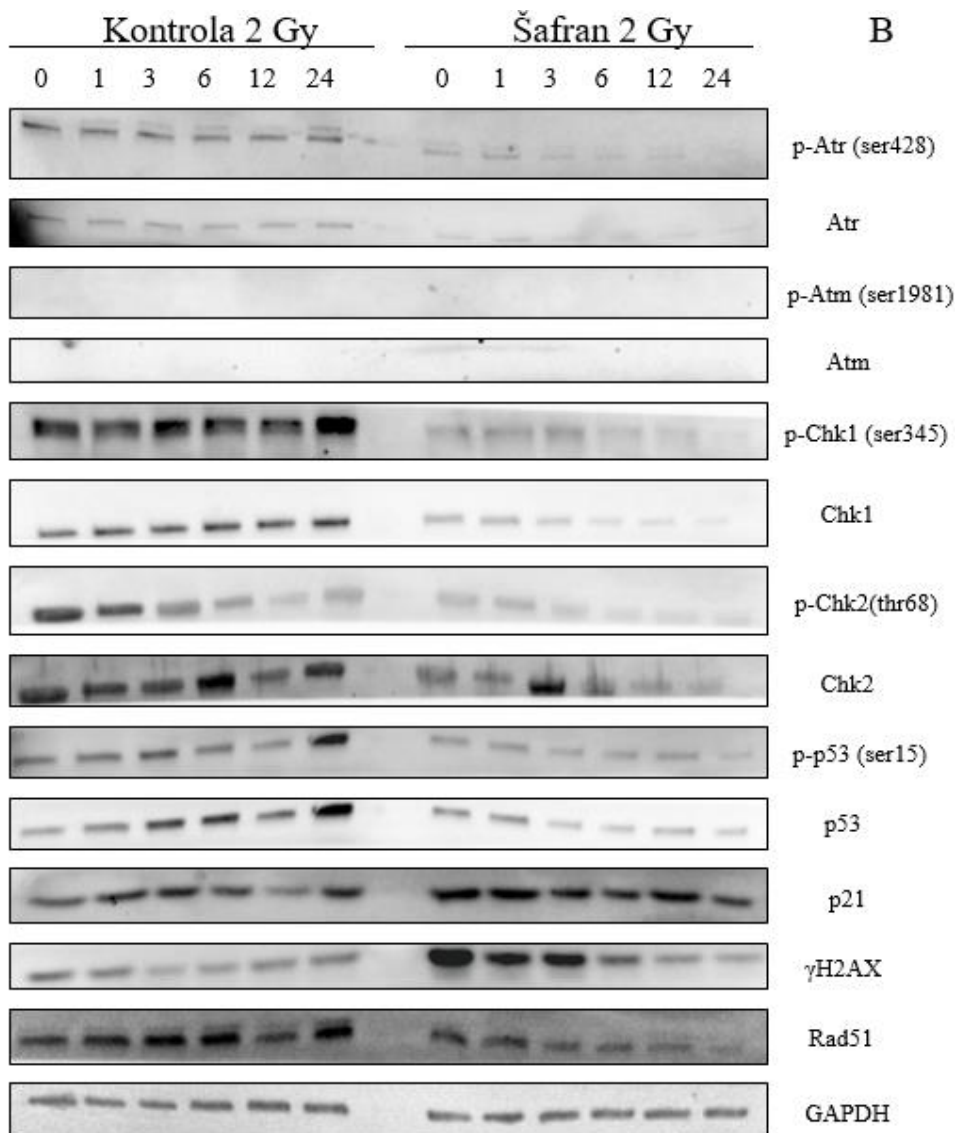
Zaujímavou je aj hladina opravného proteínu Rad51. V nádorových líniiach je nadmerná expresia proteínu Rad51 bežná a detekciu Rad51 je možné využiť ako ukazovateľ negatívnej prognózy pri pacientoch s kolorektálnym nádorom (Tennstedt *et al.*, 2013). V našej štúdii môžeme pozorovať trend zvýšenej hladiny Rad51, ktorá s postupom času klesá a to aj v kontrolných vzorkách, avšak bunky po ošetrovaní extraktom šafranu vykazujú väčšiu hladinu Rad51 oproti kontrolnej vzorke. Zvýšená hladina by vypovedala o možnej prítomnosti poškodenia DNA, ktoré je opravované pomocou HR.

Naopak vo vzorkách vystavených IR spolu v kombinácii s extraktom môžeme pozorovať zníženú fosforyláciu proteínu Chk1 a Chk2 spolu so zníženou hladinou proteínu p53 a Rad 51 (Obr. 7, B). Zníženie hladiny týchto proteínov vypovedá o zníženej aktivácii kontrolných bodov bunkového cyklu a zároveň nedostatočnej aktivácii opravných dráh bunky odpovedajúcej na poškodenie DNA, ktoré je značné vo vzorkách ošetrovaných extraktom šafranu.

Proteín Atm a jeho fosforylovanú formu sa nám nepodarilo detegovať z podobných dôvodov ako v predchádzajúcom prípade.

Porovnaním výsledkov vo vzorkách ošetrovaných extraktom šafranu bez a spolu s pôsobením IR môžeme uvažovať o hypotéze, že extrakt šafranu robí nádorovú líniiu HCT116 WT senzitivnu voči IR. Samotné ošetrovanie buniek nádorovej líniiu HCT116 WT šafranom spôsobuje poškodenie DNA, ale mierne zvyšuje aktiváciu proteínov kontrolných bodov bunkového cyklu a zvýšenie opravného proteínu Rad51 oproti kontrolným vzorkám. Ošetrovanie extraktom šafranu v kombinácii s IR robí bunkovú líniiu senzitivnu voči IR, tým že znemožňuje dostatočnú aktiváciu opravných proteínov a proteínov zodpovedných za aktiváciu kontrolných bodov bunkového cyklu.





Obr. 7 Detekcia proteínov bunkovej odpovedi na poškodenie DNA v HCT116 WT bunkovej línii ošetrenej extraktom šafranu ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 24 h) využitím metódy Western blot. Vybrané časové úseky pre A) neožiarené bunky sú 0, 12, 24 h; B) ožiarené intenzitou 2 Gy sú 0, 1, 3, 6, 12, 24 h

4.3 Imunofluorescenčná analýza ukazovateľov poškodenia DNA po ošetroení buniek extraktom šafranu a IR pomocou mikroskopie

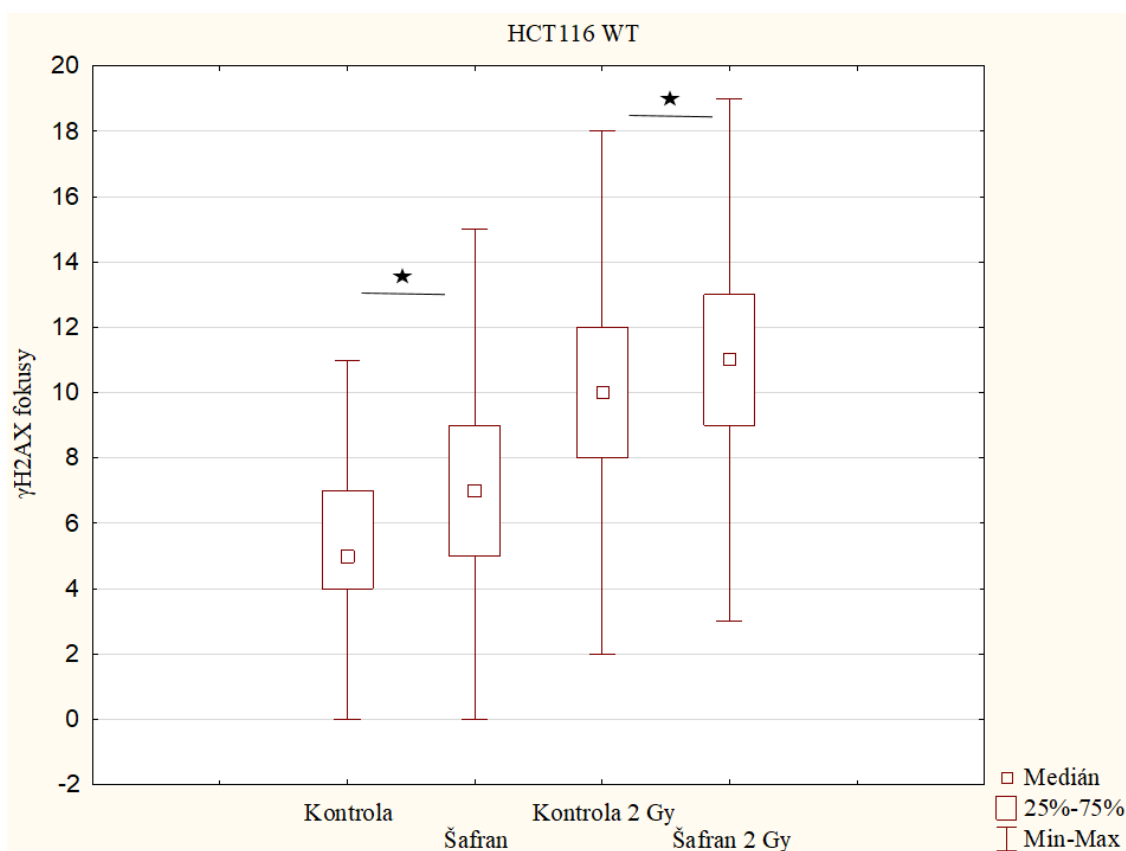
Na rozdiel od predchádzajúcich výsledkov, ktoré sme získali semi-kvantitatívnou analýzou metódou Western blot z lyzátu celých buniek, priama mikroskopia umožňuje podrobnejšie štúdium ukazovateľov poškodenia DNA, prípadne proteínov opravných dráh a to ich detekciou priamo v jadre.

Vzhľadom k tomu, že nádorová línia HCT116 WT má špecifický charakter rastu a v doštičkách určených na imunofluorescenčnú mikroskopiu neproliferuje ideálne,

a teda neumožňuje rozpoznanie jednotlivých bunkových jadier počas analýzy snímok, bolo nutné pristúpiť k odlišnej príprave vzoriek. Po zozbieraní buniek po experimente sme postupovali pomocou metódy cytospin, počas ktorej sú bunky pomocou cytocentrifúgy tzv. nastrelené na mikroskopické sklíčka a až potom inkubované so špecifickými protilátkami.

Existuje viacero ukazovateľov poškodenia DNA. My sme sa zamerali na detekciu proteínov γ H2AX, 53BP1 a BRCA1, teda tých, ktoré sú aktivované vo veľmi krátkom čase od vzniku poškodenia DNA.

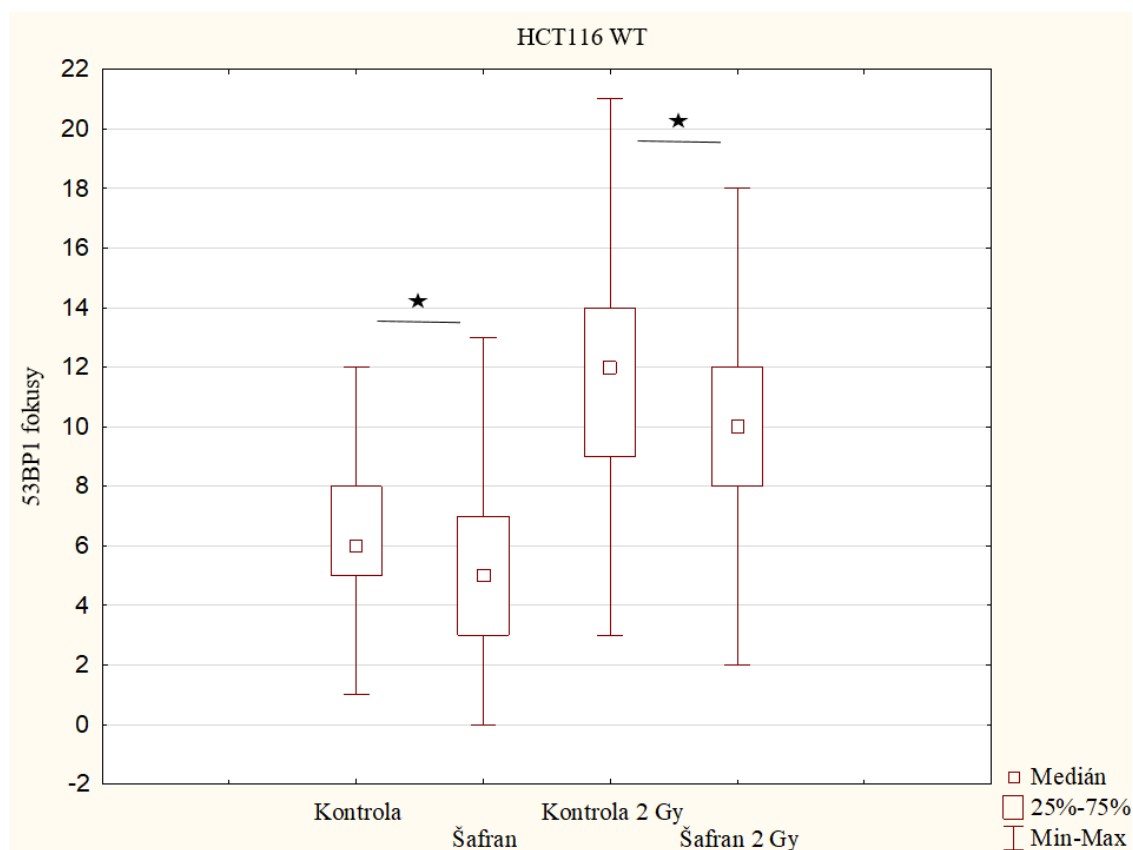
Tvorba DSB je vždy spojená s fosforyláciou histónu H2AX za vzniku γ H2AX (Kuo a Xang, 2008) a preto ho môžeme považovať za spoľahlivý ukazovateľ poškodenia DNA. Z výsledkov vyplýva, že dochádza k zvýšeniu γ H2AX fokusov v bunkách ošetrovaných extraktom šafranu v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Môžeme teda potvrdiť, že ošetrovanie extraktom šafranu zvyšuje poškodenie DNA (Obr. 8). Nepozorujeme však významný rozdiel v ošetrovaní extraktom šafranu a jeho spolupôsobenia s IR.



Obr. 8 Detekcia γ H2AX fokusov v HCT116 WT línii po ošetrovaní extraktom šafranu a ožiarení röntgenovým žiarením v intenzite 2 Gy.

Ďalej sme sa zamerali na detekciu proteínu 53BP1. Je jedným z proteínov, ktoré ihneď odpovedajú na poškodenie DNA, viaže sa na poškodený chromátin a zároveň nepriamo závisí na fosforylácii H2AX (Panier a Boulton, 2013). Vo vzorkách ošetrovaných extraktom šafranu môžeme pozorovať znížený počet 53BP1 fokusov značiacich jeho znížené množstvo v bunkovom jadre (Obr. 9). Nepozorujeme signifikantný rozdiel medzi bunkami ošetrovanými extraktom šafranu bez a v kombinácii s IR. Menšie množstvo 53BP1 v porovnaní s kontrolnou vzorkou môže ukazovať na zníženú schopnosť bunky odpovedať na poškodenie DNA a teda nedostatočnú aktiváciu HR.

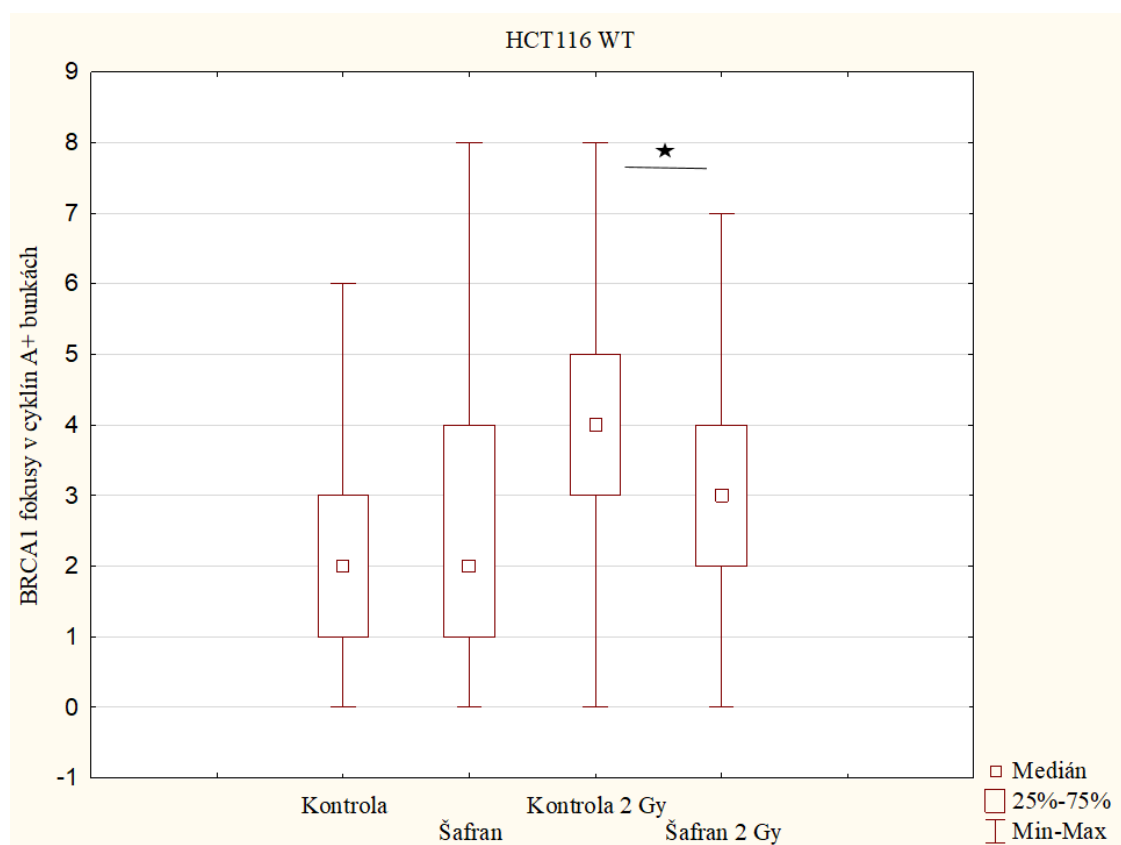
Skúmali sme aj proteín BRCA1 v cyklín A pozitívnych bunkách. BRCA1 proteín je prítomný v bunkách, ktoré prechádzajú S a G2 fázou bunkového cyklu a práve tam je aktívna opravná dráha HR. BRCA1 aktivuje štiepenie poškodených koncov DNA defosforyláciou a uvoľnením 53BP1, ktorý je naviazaný na poškodenom chromátine (Isono *et al.*, 2017). V kombinácii s detekciou 53BP1 ide o efektívny spôsob dokázať zmeny v schopnosti bunky odpovedať na poškodenie DNA.



Obr. 9 Detekcia 53BP1 fokusov v nádorovej línii HCT116 WT po ošetrení extraktom šafranu a ožiarení röntgenovým žiarením v intenzite 2 Gy.

Je možné pozorovať znížené množstvo BRCA1 v bunkách ošetrovaných extraktom šafranu spolu s kombináciou IR (Obr. 10), ale významný vplyv extraktu šafranu v bunkách bez ožiarenia chýba. Zníženie množstva signálov BRCA1 v cyklín A pozitívnych bunkách po ošetrovaní extraktom šafranu a zároveň zníženie množstva 53BP1 fokusov v bunkách ošetrovaných extraktom šafranu môže implikovať nedostatočnú aktiváciu opravnej dráhy HR. V bunkách ošetrovaných šafranom je zároveň zvýšené množstvo γ H2AX čo znamená, že pribúda poškodenie DNA.

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme podporiť našu hypotézu, že extrakt šafranu vplyva na schopnosť odpovedi nádorovej línie HCT116 WT na poškodenie DNA. Nepozorujeme však významný rozdiel spolu s použitím IR okrem proteínu BRCA1. Možným dôvodom by mohla byť nízka odporúčaná a používaná koncentrácia extraktu šafranu.



Obr. 10 Detekcia BRCA1 fokusov v cyklín A+ bunkách línie HCT116 WT po ošetrovaní extraktom šafranu a ožiarení röntgenovým žiarením v intenzite 2 Gy.

5 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo otestovať prípadný cytotoxický vplyv extraktu šafranu v koncentracii $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ na nádorovú líniu kolorektálneho karcinómu HCT116 WT a sledovať schopnosť odpovedi tejto línie na poškodenie DNA vyvolaného pomocou IR.

Analýzou bunkového cyklu pomocou prietokovej cytometrie a farbenia PI bolo zistené, že extrakt šafranu má mierny vplyv na životaschopnosť nádorovej línie HCT116 WT a spôsobuje hlavne predĺženie S fázy bunkového cyklu a aktiváciu kontrolného bodu G2/M. Spolupôsobenie šafranu a IR nebolo dokázané.

Pomocou metódy Western blot boli detegované proteíny kontrolných bodov bunkového cyklu a ukazovateľov poškodenia DNA. Skúmaná bola hlavne časovo závislá odpoveď buniek ošetrovaných extraktom šafranu ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) na poškodenie DNA bez a spolu s pôsobením IR. Z výsledkov sme vyvodili hypotézu, že extrakt šafranu robí nádorovú líniu HCT116 WT senzitivnu voči pôsobeniu IR a spôsobuje poškodenie DNA. Bunky sú po ošetrovaní extraktom šafranu a ožiarení röntgenovým žiarením neschopné dostatočne aktivovať proteíny kontrolných bodov bunkového cyklu a opravných dráh DNA.

Podrobnejšia analýza ukazovateľov poškodenia DNA γH2AX , 53BP1 a BRCA1 poukázala na možné zvýšenie poškodení v bunkách ošetrovaných extraktom šafranu a zároveň zníženú aktiváciu proteínov opravnej dráhy HR.

Okrem zníženej hladiny BRCA1 nie je poznať signifikantný rozdiel medzi vzorkami ošetrovanými extraktom šafranu a šafranu v kombinácii s IR. Dôvodom môže byť nízka doporučená koncentrácia použitého roztoku šafranu.

V tejto bakalárskej práci bol preukázaný len mierny vplyv extraktu šafranu na životaschopnosť buniek nádorovej línie HCT116 WT a ich schopnosť odpovedi na poškodenie DNA vyvolané pomocou IR. Predpokladáme, že zvýšením koncentrácie šafranu vo vodnom extrakte by bolo možné doceliť signifikantnejšieho efektu pôsobenia a taktiež zvýšenie senzitivity buniek k IR, čo je predmetom ďalšieho štúdia. Pre ďalšie štúdium bude vhodné do experimentu zahrnúť aj primárne línie, čím bude overená špecifickosť účinku len na nádorové línie.

6 LITERATÚRA

- Abdullaev F.I., Espinosa-Aguirre J.J. (2004): Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemopreventive trials. *Cancer Detection and Prevention* **28**, 426-432.
- Aits S., Jäättelä M. (2013): Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science* **126**, 1905-1912.
- Ameer K., Shahbaz H.M., Kwon J.-H. (2017): Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **16**, 295-315.
- Amin A., Bajbouj K., Koch A., Gandesiri M., Schneider-Stock R. (2015): Defective Autophagosome Formation in p53-Null Colorectal Cancer Reinforces Crocin-Induced Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 1544-1561.
- Angiolillo L., Del Nobile M.A., Conte A. (2015): The extraction of bioactive compounds from food residues using microwaves. *Current Opinion in Food Science* **5**, 93-98.
- Ashrafi M., Bathaie S.Z., Abroun S., Azizian M. (2015): Effect of Crocin on Cell Cycle Regulators in *N*-Nitroso-*N*-Methylurea-Induced Breast Cancer in Rats. *DNA and Cell Biology* **34**, 684-691.
- Aung H.H., Wang C.Z., Ni M., Fishbein A., Mehendale S.R., Xie J.T., Shoyama A.Y., Yuan C.S. (2007): Crocin from *Crocus Sativus* Possesses Significant Anti- Proliferation Effects on Human Colorectal Cancer Cells. *Experimental Oncology* **29**, 175-180.
- Badiyan S.N., Maoltoris J.K., Chuong M.D., Regine W.F., Kaiser A. (2017): The Role of Radiation Therapy for Pancreatic Cancer in the Adjuvant and Neoadjuvant Settings. *Surgical Oncology Clinics of North America* **26**, 431-453.
- Bajbouj K., Schulze-Luehrmann J., Diermeier S., Amin A., Schneider-Stock R. (2012): The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic colorectal cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12**:69. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/69>.
- Bakshi H., Sam S., Rozati R., Sultan P., Islam T., Rathore B., Lone Z., Sharma M., Tripathi J., Saxena R.Ch. (2010): DNA Fragmentation and Cell Cycle Arrest: A Hallmark of Apoptosis Induced by Crocin from Kashmiri Saffron in a Human Pancreatic Cancer Cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **11**, 675-679.
- Barnum K.J., O'Connell M.J. (2014): Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods in Molecular Biology* **1170**, 29-40.
- Bartek J., Lukas J. (2007): DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 238-245.
- Bathaie S.Z., Bolhasani A., Hoshyar R., Ranjbar B., Sabouni F., Moosavi-Movahedi A.-A. (2007): Interaction of Saffron Carotenoids as Anticancer Compounds with ctDNA, Oligo (dG.dC)₁₅, and Oligo (dA.dT)₁₅. *DNA and Cell Biology* **26**, 533-540.
- Berghe T.V., Linkermann A., Jouan-Lanhouet S., Walczak H., Vandenabeele P. (2014): Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 135-147.
- Bergsbaken T., Fink S.L., Cookson B.T. (2009): Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 99-109.
- Bhandari P.R. (2015): *Crocus sativus* L. (saffron) for cancer chemoprevention: A mini review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **5**, 81-87.
- Boddy M.N., Gaillard P.-H.L., McDonald W.H., Shanahan P., Yates 3rd J.R., Rusell P. (2001): Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase. *Cell* **107**, 537-548.
- Bolhasani A., Khavari A., Bathaie S.Z. (2014): Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer* **1845**, 20-30.
- Brinkmann V., Zychlinsky A. (2012): Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?. *The Journal of Cell Biology* **198**, 773-783.

- Bukhari S.I., Manzoor M., Dhar M.K. (2018): A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **98**, 733-745.
- Bunting S.F., Callén E., Wong N., Chen H.-T., Polato F., Gunn A., Bothmer A., Feldhahn N., Fernandez-Capetillo O., Cao L., Xu X., Deng Ch.-X., Finkel T., Nussenzweig M., Stark J.M., Nussenzweig A. (2010): 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* **141**, 243-254.
- Caballero-Ortega H., Pereda-Miranda R., Abdullaev F.I. (2007): HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chemistry* **100**, 1126-1131.
- Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.-P., Ravanat J.-L., Sauvaigo S. (1999): Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research* **424**, 9-21.
- Caldecott K.W. (2008): Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics* **9**, 619-631.
- Campisi J., di Fagagna F.d'A. (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 729-740.
- Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A.D. (2016): Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology* **26**, 52-64.
- Chaires J.B. (1998): Drug-DNA interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 314-320.
- Chang H.H.Y., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. (2017): Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 495-506.
- Chapman J.R., Taylor M.R.G., Boulton S.J. (2012): Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* **47**, 497-510.
- Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.-S., Abert-Vian M. (2017): Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* **34**, 540-560.
- Chen H., Lisby M., Symington L.S. (2013): RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Molecular Cell* **50**, 589-600.
- Chen H.C., Kanai M., Inoue-Yamauchi A., Tu H.C., Ren D., Kim H., Takeda S., Reyna D.E., Chan P.M., Ganesan Y.T., Liao C.P., Gavathiotis E., Hsieh J.J., Cheng E.H. (2015): An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nature Cell Biology* **17**, 1270-1281.
- Christodoulou E., Kadoglou N.P., Kostomitsopoulos N., Valsami G. (2015): Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **67**, 1634-1649.
- Chryssanthi D.G., Lamari F.N., Iatrou G., Pylara A., Karamanos N.K., Cordopatis P. (2007): Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation by Style Constituents of Different *Crocus* Species. *Anticancer Research* **27**, 357-362.
- Cimprich K.A., Cortez D. (2008): ATR: An Essential Regulator of Genome Integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 616-627.
- Coleman M.L., Sahai E.A., Yeo M., Bosch M., Dewar A., Olson M.F. (2001): Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology* **3**, 339-345.
- Cusano E., Consonni R., Petrakis E.A., Astraka K., Cagliani L.R., Polissiou M.G. (2018): Integrated analytical methodology to investigate bioactive compounds in *Crocus sativus* L. flowers. *Phytochemical Analysis* **29**, 476-486.
- Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M. (2014): Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 49-63.
- D'Alessandro A.M., Mancini A., Lizzi A.R., De Simone A., Marroccella C.E., Gravina G.L., Tatone C., Festuccia C. (2013): *Crocus Sativus* Stigma Extract and Its Major Constituent Crocin Possess Significant Antiproliferative Properties Against Human Prostate Cancer. *Nutrition and Cancer* **65**, 930-942.

- Da Porto C., Natolino A. (2018): Extraction kinetic modelling of total polyphenols and total anthocyanins from saffron floral bio-residues: Comparison of extraction methods. *Food Chemistry* **258**, 137-143.
- Daley J.M., Sung P. (2014): 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Molecular and Cell Biology* **34**, 1380-1388.
- Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. (1997): Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27**, 1-20.
- De Bont R., van Larebeke N. (2004): Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **19**, 169-185.
- Delaney G., Jacob S., Featherstone C., Barton M. (2005): The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* **104**, 1129-1137.
- Dhar A., Mehta S., Dhar G., Dhar K., Banerjee S., Van Veldhuizen P., Campbell D.R., Banerjee S.K. (2009): Crocetin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression in xenograft mouse model. *Molecular Cancer Therapeutics* **8**, 315-323.
- Diehl J.A. (2002): Cyclin to Cancer with Cyclin D1. *Cancer Biology and Therapy* **1**, 226-231.
- Doll R., Peto R. (1981): The Quantitative of Cancer Causes of Cancer: Estimates of Avoidable risks in the United States Today. *Journal of the National Cancer Institute* **66**, 1191-1308.
- Elbendary A.A., Cirisano F.D., Evans Jr. A.C., Davis P.L., Dirk Iglehart A., Marks J.R., Berchuck A. (1996): Relationship between p21 Expression and Mutant of the *p53* Tumor Suppressor Gene in Normal and Malignant Ovarian Epithelial Cells. *Clinical Cancer Research* **2**, 1571-1575.
- Escribano J., Alonso G.-L., Coca-Prados M., Fernández J.A. (1996): Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters* **100**, 23-30.
- Fatokun A.A., Dawson V.L., Dawson T.M. (2014): Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology* **171**, 2000-2016.
- Feizzadeh B., Afshari J.T., Rakhshandeh H., Rahimi A., Brook A., Doosti H. (2008): Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. *Urology Journal* **5**, 161-167.
- Festuccia C., Colapietro A., Mancini A., D'Alessandro A. (2019): Crocetin and Crocin from Saffron in Cancer Chemotherapy and Chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **19**:1. <http://www.eurekaselect.com/168646/article>.
- Festuccia C., Mancini A., Gravina G.L., Scarsella L., Llorens S., Alonso G.L., Tatone C., Di Cesare E., Jannini E.A., Lenzi A., D'Alessandro A.M., Carmona M. (2014): Antitumor Effects of Saffron-Derived Carotenoids in Prostate Cancer Cell Models. *BioMed Research International* **2014**:135048. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/135048/>.
- Frankenberg-Schwager M. (1990): Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation and Environmental Biophysics* **29**, 273-292.
- Galluzi L., Pietrocola F., Levine B., Kroemer G. (2014): Metabolic Control of Autophagy. *Cell* **159**, 1263-1276.
- Galluzi L., Pietrocola F., Pedro J.M.B.-S., Amaravadi R.K., Baehrecke E.H., Cecconi F., Codogno P., Debnath J., Gewirtz D.A., Karantza V., Kimmelman A., Kumar S., Levine B., Maiuri M.Ch., Martin S.J., Penninger J., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Simon H.-U., Simonsen A., Thorburn A.M., Velasco G., Ryan K.M., Kroemer G. (2015): Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal* **34**, 856-880.
- Galluzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner Ch., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K.-M., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin

- K.-M., DeBerardinis R.J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., García-Sáez A.J., Garg A.D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gootlieb E., Green D.R., Greene L.A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Harris I.S., Hengartner M.O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P.J., Juin P.P., Kaiser W.J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R.N., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lee S.W., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lowe S.W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J.-Ch., Martin S.J., Martinou J.-Ch., Medema J.P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E.A., Molkentin J.D., Moll U.M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J.M., Pereira D.M., Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H.M., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R., Rodriguez C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T., Ryan K.M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H.-U., Sistigu A., Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander M.G., Vander Heiden M.G., Villunger A., Virgin H.W., Vousden K.H., Vucic D., Wagner E.F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J.A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. (2018): Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* **25**, 486-541.
- García-Olmo D.C., Riese H.H., Escribano J., Ontan J., Fernandez A.J., Atiénzar M., García-Olmo D. (1999): Effects of Long-Term Treatment of Colon Adenocarcinoma with Crocin, a Carotenoid From Saffron (*Crocus sativus* L.): An Experimental Study in the Rat. *Nutrition and Cancer* **35**, 120-126.
- Geierstanger B.H., Wemmer D.E. (1995): Complexes of the minor groove of DNA. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **24**, 463-493.
- Gibert B., Mehlen P. (2015): Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Research* **75**, 5171-5175.
- Godin S.K., Sullivan M.R., Bernstein K.A. (2016): Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination and DNA replication. *Biochemistry and Cell Biology* **94**, 407-418.
- Gravel S., Chapman J.R., Magill Ch., Jackson S.P. (2008): DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes and Development* **22**, 2767-2772.
- Grawunder U., Wilm M., Wu X., Kulesza P., Wilson T.E., Mann M., Lieber M.R. (1997): Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**, 492-495.
- Greenblatt M.S., Bannett W.P., Hollstein M., Harris C.C. (1994): Mutations in the *p53* Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research* **54**, 4855-4878.
- Gu J., Lu H., Tippin B., Shimazaki N., Goodman M.F., Lieber M.R. (2007a): XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *The EMBO Journal* **26**, 1010-1023.
- Gu J., Lu H., Tsai A.G., Schwarz K., Lieber M.R. (2007b): Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Research* **35**, 5755-5762.
- Gutheil W.G., Reed G., Ray A., Anant S., Dhar A. (2012): Crocetin: An Agent Derived from Saffron for Prevention and Therapy for Cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **13**, 173-179.
- Hakem R. (2008): DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO Journal* **27**, 589-605.
- Haque W., Butler E.B., Teh B.S. (2017): Stereotactic body radiation therapy for a prostate cancer-a review. *Chinese Clinical Oncology* **6**:S10. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.05>.

- Harbour J.W., Luo R.X., Dei Santi A., Postigo A.A., Dean D.C. (1999): Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular Interactions that Progressively Block Rb Functions as Cells Move through G1. *Cell* **98**, 859–869.
- He G., Siddik Z.H., Huang Z., Wang R., Koomen J., Kobayashi R., Khokhar A.R., Kuang J. (2005): Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* **24**, 2929-2943.
- He K., Si P., Wang H., Tahir U., Chen K., Xiao J., Duan X., Huang R., Xiang G. (2013): Crocetin induces apoptosis of BGC-823 human gastric cancer cells. *Molecular Medicine Reports* **9**, 521-526.
- Heyer W.-D. (2004): Recombination: Holliday Junction Resolution and Crossover Formation. *Current Biology* **14**, 56-58.
- Heyer W.-D., Ehmsen K.T., Liu J. (2010): Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *The Annual Review of Genetics* **44**, 113-139.
- Heyer W.-D., Li X., Rolfmeier M., Zhang X.-P. (2006): Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination?. *Nucleic Acids Research* **34**, 4115-4125.
- Hoshyar R., Bathaie S.Z., Kyani A., Mousavi M.F. (2012): Is There Any Interaction Between Telomeric DNA Structures, G-Quadruplex and I-Motif, with Saffron Active Metabolites?. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **31**, 801-812.
- Hosseinzadeh H., Noraei N.B. (2009): Anxiolytic and Hypnotic Effect of *Crocus sativus* Aqueous Extract and its Constituents, Crocin and Safranal, in Mice. *Phytotherapy Research* **23**, 768-774.
- Huen M. S.Y., Chen J. (2008): The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Research* **18**, 8-16.
- Ip S.C.Y., Rass U., Blanco M.G., Flynn H.R., Skehel J.M., West S.C. (2008): Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* **456**, 357-362.
- Isono M., Niimi A., Ouke T., Hagiwara Y., Sato H., Sekine R., Yoshida Y., Isobe S.Y., Obuse C., Nishi R., Petricci E., Nakada S., Nakano T., Shibata A. (2017): BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation *Cell reports* **18**, 520-532.
- Jackson S.P., Bartek J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078.
- Jafarisani M., Bathaie S.Z., Mousavi M.F. (2018): Saffron carotenoids (crocin and crocetin) binding to human serum albumin as investigated by different spectroscopic methods and molecular docking. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **36**, 1681-1690.
- Jagadeeswaran R., Thirunavukkarasu C., Gunasekaran P., Ramamurty N., Sakthisekaran D. (2000): In vitro studies on the selective cytotoxic effect of crocetin and quercetin. *Fitoterapia* **71**, 395-399.
- Julien O. Wells J.A. (2017): Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation* **24**, 1380–1389.
- Kakaroukas A., Jeggo P.A. (2014): DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *The British Journal of Radiology* **87**:1035. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130685>.
- Kalalinia F., Ghasim H., Farzad S.A., Pishavar E., Ramezani M., Hashemi M. (2018): Comparison of the effect of crocin and crocetin, two major compounds extracted from saffron, on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Life Sciences* **208**, 262-267.
- Karimi E., Oskoueian E., Hendra R., Jaafar H.Z.E. (2010): Evaluation of *Crocus sativus* L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. *Molecules* **15**, 6244-6256.
- Kastan M.B., Bartek J. (2004): Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-323.
- Kaufmann B., Christen P. (2002): Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis* **13**, 105-113.
- Kee Y., D'Andrea A.D. (2010): Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes and Development* **24**, 1680-1694.
- Khorasanchi Z., Shafiee M., Kermanshahi F., Khazaei M., Ryzhikov M., Parizadeh M.R., Kermanshahi B., Ferns G.A., Avan A., Hassanian S.M. (2018): *Crocus sativus* a natural food coloring and flavoring has potent anti-tumor properties. *Phytomedicine* **43**, 21-27.

- Kianbakht S., Mozaffari K. (2009): Effects of Saffron and its Active Constituents, Crocin and Safranal, on Prevention of Indomethacin Induced Gastric Ulcers in Diabetic and Nondiabetic Rats. *Journal of Medicinal Plants* **8**, 30-38.
- Kominami K., Nakabayashi J., Nagai T., Tsujimora Y., Chiba K., Kimura H., Miyawaki A., Sawasaki T., Yokota H., Manabe N., Sakamaki K. (2012): The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: Quantitative experimental validation of a mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta* **1823**, 1825-1840.
- Krishna S., Overholtzer M. (2016): Mechanisms and Consequences of Entosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 2379-2386.
- Kruidering M., Evan G.I. (2000): Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End"? *Life* **50**, 85-90.
- Kumagai A., Dunphy W.G. (2003): Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1. *Nature Cell Biology* **5**, 161-165.
- Kuo L.J., Yang L.-X. (2008): γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In vivo* **22**, 305-310.
- Kuzminov A. (2001): Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 8241-8246.
- Kyriakoudi A., Chrysanthou A., Mantzouridou F., Tsimidou M.Z. (2012): Revisiting extraction of bioactive apocarotenoids from *Crocus sativus* L. dry stigmas (saffron). *Analytica Chimica Acta* **755**, 77-85.
- Kyriakoudi A., Tsimidou M.Z. (2018): Latest advances in the extraction and determination of saffron apocarotenoids. *Electrophoresis* **39**, 1846-1859.
- Lage M., Cantrell Ch.L. (2009): Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Scientia Horticulturae* **121**, 366-373.
- Lavin M.F. (2008): Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signaling and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 759-769.
- Li Z., Pearlman A.H., Hsieh P. (2016): DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA repair* **38**, 94-101.
- Lieber M.R. (2008): The Mechanism of Human Nonhomologous DNA End Joining. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1-5.
- Lieber M.R. (2010): The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annual review of biochemistry* **79**, 181-211.
- Lindahl T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Linkermann A., Green D.R. (2014): Necroptosis. *The New England Journal of Medicine* **370**, 455-465.
- Liu D.-D., Ye Y.-L., Zhang J., Xu J.-N., Qian X.-D., Zhang Q. (2014): Distinct Pro-Apoptotic Properties of Zhejiang Saffron against Human Lung Cancer Via a Caspase-8-9-3 Cascade. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **15**, 6075-6080.
- Llambi F., Moldoveanu T., Tait S.W., Bouchier-Hayes L., Temirov J., McCormick L.L., Dillon C.P., Green D.R. (2011): A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular Cell* **44**, 517-531.
- Ludlow J.W., Shon J., Pipas J.M., Livingston D.M., DeCaprio J.A. (1990): The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* **60**, 387-396.
- Lundberg A.S., Weinberg R.A. (1998): Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-cdk Complexes. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 753-761.
- Ma Y., Pannicke U., Schwarz K., Lieber M.R. (2002): Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell* **108**, 781-794.
- Ma Y., Schwarz K., Lieber M.R. (2005): The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair* **4**, 845-851.

- Magesh V., DurgaBhavani K., Senthilnathan P., Rajendran P., Sakthisekaran D. (2009): *In vivo* protective effect of crocetin on benzo(a)pyrene-induced lung cancer in Swiss albino mice. *Phytotherapy Research* **23**, 533-539.
- Malumbres M., Barbacid M. (2005): Mammalian cyclindependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 630–641.
- Mehlen P., Tauszig-Delamasure S. (2014): Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut* **63**, 1821-1829.
- Melnyk J.P., Wang S., Marcone M.F. (2010): Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International* **43**, 1981-1989.
- Mimitou E.P., Symington L.S. (2008): Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770-774.
- Mimitou E.P., Symington L.S. (2009): Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences* **34**, 264-272.
- Mimitou E.P., Symington L.S. (2011): DNA end resection - unraveling the tail. *DNA Repair* **10**, 344-348.
- Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G. (2013): DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Frontiers in oncology* **3**:113, <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00113>.
- Moon A.F., Garcia-Diaz M., Batra V.K., Beard W.A., Bebenek K., Kunkel T.A., Wilson S.H., Pedersen L.C. (2007): The X Family Portrait: Structural Insights into Biological Functions of X Family Polymerases. *DNA Repair* **6**, 1709-1725.
- Morrill S.W. (2015): DNA-Pairing and Annealing Processes in Homologous Recombination and Homology-Directed Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**(2):a016444. <https://cshperspectives.cshlp.org/content/7/2/a016444.long>.
- Nagata S. (2005): DNA degradation in development and programmed cell death. *Annual Review of Immunology* **23**, 853–875.
- Naghshineh A., Dadras A., Ghalandaari B., Riazi G.H., Modaresi S.M.S., Afrasiabi A., Aslani M.K. (2015): Safranal as a novel anti-tubulin binding agent with potential use in cancer therapy: An in vitro study. *Chemico-Biological Interactions* **238**, 151-160.
- Nair S.C., Kurumboor S.K., Hasegawa J.H. (1995): Saffron Chemoprevention in Biology and Medicine: A review. *Cancer Biotherapy* **10**, 257-264.
- Nair S.C., Pannikar B., Pannikar K.R. (1991a): Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Letters* **57**, 109-114.
- Nair S.C., Salomi M.J., Panikkae B., Panikkar K.R. (1991b): Modulatory effects of *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **31**, 75-83.
- Naito M., Nagashima K., Mashima T., Tsuru T. (1997): Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis. *Blood* **89**, 2060–2066.
- Nimonkar A.V., Ozsoy A.Z., Genschel J., Modrich P., Kowalczykowski S.C. (2008): Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16906-16911.
- Niu H., Raynard S., Sung P. (2009): Multiplicity of DNA end resection machineries in chromosome break repair. *Genes and Development* **23**, 1481-1486.
- Noureini S.K., Wink M. (2012): Antiproliferative Effect of Crocin in HepG2 Cells by Telomerase Inhibition and hTERT Down-Regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **13**, 2305-2309.
- Ochiai T., Shimeno H., Mishima K.-i., Iwasaki K., Fujiwara M., Tanaka H., Shoyama Y., Toda A., Eyabagi R., Soeda S. (2007): Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1770**, 578-584.
- Panier S., Boulton S.J. (2013): Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 7-18.
- Paques F., Haber J.E. (1999): Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 349-404.

- Park M.S., Koff A. (2001): Overview of the Cell Cycle. *Current Protocols in Cell Biology* **00**: 8.1.1-8.1.9. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0801s00>.
- Perry J.A., Kornbluth S. (2007): Cdc25 and Wee1: analogous opposites?. *Cell Division* **2**:12. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-12>.
- Pitts T.M., Davis S.L., Eckhardt S.G., Bradshaw-Pierce E.L. (2014): Targeting nuclear kinases in cancer: Development of cell cycle kinase inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics* **142**, 258-269.
- Povirk L.F. (2012): Processing of Damaged DNA Ends for Double-Strand Break Repair in Mammalian Cells. *ISRN Molecular Biology* **2012**:345805, <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/345805/cta/>.
- Ramadan K., Shevelev I.V., Maga G., Hubscher U. (2004): *De Novo* DNA Synthesis by Human DNA Polymerase λ , DNA Polymerase μ and Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase. *Journal of Molecular Biology* **339**, 395-404.
- Raynard S., Niu H., Sung P. (2008): DNA double-strand break processing: the beginning of the end. *Genes and Development* **22**, 2903-2907.
- Rejhová A., Opattová A., Čumová A., Slíva D., Vodička P. (2018): Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry* **144**, 582-594.
- Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A. (2008): Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 402-412.
- Ríos J.L., Recio M.C., Giner R.M., Máñez S. (1996): An Update Review of Saffron and its Active Constituents. *Phytotherapy Research* **10**, 189-193.
- Salomi M.J., Nair S.C., Panikkar K.R. (1991): Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutrition and Cancer* **16**, 67-72.
- Samarghandian S., Afshari J.T., Davoodi S. (2011): Suppression of Pulmonary Tumor Promotion and Induction of Apoptosis by *Crocus sativus* L. Extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**, 238-247.
- Samarghandian S., Borji A., Farahmand S.K., Afshari R., Davoodi S. (2013): *Crocus sativus* L. (Saffron) Stigma Aqueous Extract Induces Apoptosis in Alveolar Human Lung Cancer Cells through Caspase-Dependent Pathways Activation. *BioMed Research International* **2013**, 12. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/417928>.
- Sartori A.A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S.P. (2007): Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509-514.
- Sawant A.V., Srivastava S., Prassanawar S.S., Bhattacharyya B., Panda D. (2019): Crocin, a carotenoid, suppresses spindle microtubule dynamics and activates the mitotic checkpoint by binding to tubulin. *Biochemical Pharmacology* **163**, 32-45.
- Schafer K.A. (1998): The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology* **35**, 461-478.
- Schmidt M., Betti G., Hensel A. (2007): Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **157**, 315-319.
- Schwartz E.K., Heyer W.-D. (2011): Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* **120**, 109-127.
- Sebbagh M., Renvoizé C., Hamelin J., Riché N., Bertoglio J., Bréard J. (2001): Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology* **3**, 346-352.
- Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S. (2015): Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation* **22**, 526-539.
- Shiloh Y. (2003): ATM and Related Protein Kinases: Safeguarding Genome Integrity. *Nature Reviews Cancer* **3**, 155-168.
- Sirbu B.M., Cortez D. (2013): DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2013**(5):a012724, <https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/8/a012724.full>.
- Smith J., Tho L.M., Xu N., Gillespie D.A. (2010): The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. *Advances in Cancer Research* **108**, 73-112.

- Sudprasert W., Navasumrit P., Ruchirawat M. (2006): Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **209**, 503-511.
- Sujata V., Ravishankar G.A., Venkataraman L.V. (1992): Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin, crocetins, picrocrocin and safranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Chromatography* **624**, 497-502.
- Sun Y., Xu H.-J., Zhao Y.-X., Wang L.-Z., Sun L.-R., Wang Z., Sun X.-F. (2013): Crocin Exhibits Antitumor Effects on Human Leukemia HL-60 Cells In Vitro and In Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**:690164. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/690164/>.
- Symington L.S., Gautier J. (2011): Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. *The Annual Review of Genetics* **45**, 247-271.
- Syntichaki P., Tavernarakis N. (2002): Death by necrosis Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?. *EMBO reports* **3**, 604-609.
- Tait S.W., Green D.R. (2010): Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 621-632.
- Tait S.W., Green D.R. (2013): Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**(9): a008706. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008706>
- Tarantilis P.A., Polissiou M., Manfait M. (1994): Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A* **664**, 55-61.
- Tavakkol-Afshari J., Brook A., Mousavi S.H. (2008): Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 3443-3447.
- Tsai Ch.J., Kim S.A., Chu G. (2007): Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7821-7856.
- Tennstedt P., Fresow R., Simon R., Marx A., Terracciano L., Petersen C., Sauter G., Dikomey E., Borgmann K. (2013): RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* **133**, 2118-2126.
- Valiron O., Caudron N., Job D. (2001): Microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 2069-2084.
- Vazifedan V., Mousavi S.H., Sargolzaei J., Soleymanifard S., Pakdel A.F. (2017): Study of Crocin & Radiotherapy-induced Cytotoxicity and Apoptosis in the Head and Neck Cancer (HN-5) Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **16**, 230-237.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. (2003): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* **36**, 131-149.
- Wenzel E.S., Singh A.T.K. (2018): Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo* **32**, 1-5.
- Wittmann T., Hyman A., Desai A. (2001): The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature Cell Biology* **3**, 28-34.
- Yaneva M., Kowalewski T., Lieber M.R. (1997): Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *The EMBO Journal* **16**, 5098-5112.
- Yang W.S., Stockwell B.R. (2016): Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends in Cell Biology* **26**, 165-176.
- Yannone S.M., Khan I.S., Zhou R.-Z., Zhou T., Valerie K., Povirk L.F. (2008): Coordinate 5' and 3' endonucleolytic trimming of terminally blocked blunt DNA double-strand break ends by Artemis nuclease and DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Research* **36**, 3354-3365.
- Zheng J., Zhou Y., Li Y., Xu D.-P., Li S., Li H.-B. (2016): Spices for Prevention and Treatment of Cancers. *Nutrients* **8**, 495. <http://dx.doi.org/10.3390/nu8080495>.
- Zhu Z., Chung W.-H., Shim E.Y., Lee S.E., Ira G. (2008): Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double strand break ends. *Cell* **134**, 981-994.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

53BP1	p53-binding protein
Apaf1	apoptotic protease activating factor 1
APC/C	anaphase-promoting complex
APS	ammonium persulfate
ATM	ataxia telangiectasia mutated kinase
ATP	adenosine triphosphate
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2 associated X
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BRCA1	breast cancer susceptibility gene 1
Cdc	cell division control protein
CDK	cyclin-dependent kinase
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
CtIP	CtBP-interacting protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	DNA damage response
DISC	death-inducing signaling complex
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene
DNA	deoxyribonucleic acid
Dna2	DNA replication helicase/nuclease 2
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinases
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
DR	death receptor
DSB	double strand break
DTT	dithiothreitol
E2F	DNA-binding transcription factor
E3	ubiquitin ligase
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FADD	FAS-associated protein with death domain

FAS	tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
FBS	fetal bovine serum
FICT	fluorescein isothiocyanate
HJ	Holiday junction
HR	homologous recombination
IR	ionizing radiation
LSB	Laemmli sample buffer
MMP	mitochondrial membrane potential
MRE11	meiotic recombination 11 homologue
NHEJ	non-homologous end-joining
PARP1	Poly(ADP-ribose)polymerase 1
PBS	phosphate-buffered saline
PI	propidium iodide
Rad51	DNA repair protein
RB	retinoblastoma protein
RBL1/2	retinoblastoma like protein 1, 2
RCD	regulated cell death
RNA	ribonucleic acid
rNTP	ribonucleotide triphosphate
ROS	reactive oxygen species
RPA	replication protein A
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDSA	synthesis-dependent strand annealing
SSB	single strand break
ssDNA	single stranded DNA
TBS	tris-buffered saline
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TEMED	tetramethylethylenediamine
TNFR	tumor necrosis family receptor
TopBP1	topoisomerase II β -Binding protein 1
UV	ultraviolet
XLF	XRCC4-like factor
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
γ H2AX	phosphorylated H2A histone family member X