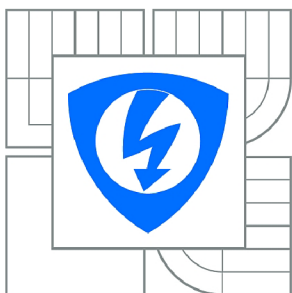




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

PŘÍRODNÍ LÁTKY V LÉČBĚ RAKOVINY A JEJICH CYTOTOXICITA

NATURAL DRUGS IN CANCER TREATMENT AND THEIR CYTOTOXICITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

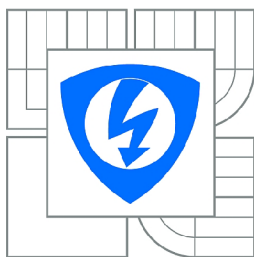
Bc. TEREZA HÁJKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Studentka: Bc. Tereza Hájková

ID: 119703

Ročník: 2

Akademický rok: 2012/2013

NÁZEV TÉMATU:

Přírodní látky v léčbě rakoviny a jejich cytotoxicita

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostudujte problematiku využití přírodních látek v nádorové léčbě s ohledem na cytotoxicitu a další vlivy těchto látek na živé organismy (biologická aktivita - antimikrobiální, antifungální, antivirální, antiparazitární a další). 2) Navrhněte metodu stanovení cytotoxicity vybraných látek v aplikaci na nádorové buněčné linie. 3) Navrhněte experimentální protokol a vyberte parametry, které budou měřeny či sledovány, zejména buněčné a jaderné změny. 4) Provedte experimenty založené na konfokální fluorescenční mikroskopii. 5) Vyhodnoťte výsledky ve formě uceleného souboru informací o cytotoxicitě zvolených látek a o možném mechanismu jejich cytotoxicity. 6) Výsledky diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] BABULA, P., ADAM, V., HAVEL, L., KIZEK, R. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones - their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2009, roč. 5, č. 1, s. 47-68.

[2] CIMINO, S., SORTINO, G., FAVILLA, V., CASTELLI, T., MADONIA, M., SANSALONE, S., RUSSO, G. I., MORGIA, G. Polyphenols: Key Issues Involved in Chemoprevention of Prostate Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012, roč. 2012, doi:10.1155/2012/632959.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 24.5.2013

Vedoucí práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Práce se zabývá problematikou přírodních látek v souvislosti s nádorovým onemocněním. Přírodní látky mají pozitivní vliv na lidský organismus a jsou schopné ovlivňovat životaschopnost a růst nádorových buněk. Hlavním mechanismem je ovlivnění mechanismů vedoucích k zahájení apoptózy nádorových buněk a zabránění další proliferace. V práci je dále rozebrána problematika využití nádorových buněčných linií ve výzkumu nádorového onemocnění. Dále jsou v práci uvedeny běžně dostupné metody pro stanovení cytotoxicity přírodních látek, přičemž pro experimentální část je vybrána metoda MTT test a systém xCELLigence pro monitorování v reálném čase. V experimentální části bude sledován mechanismus působení testované látky kapsaicin v aplikaci na prostatické buněčné linie, nádorovou PC3 a nenádorovou PNT1A.

Klíčová slova

Rakovina, léčba rakoviny, nádorové buněčné linie, přírodní látky, polyfenoly, alkaloidy, kapsaicin, cytotoxicita, MTT test, xCELLigence, fluorescenční mikroskopie, emise záření.

Abstract

The thesis deals with the natural substances in context with the cancer disease. The natural substances have a positive effect on the human organism and they are able to influence the viability and the growth of the cancer cells. The main mechanical device is to influence the mechanisms needed to start the apoptosis of the cancer cells and stopping further proliferation. The cancer cell lines utilization in the cancer disease is discussed in the thesis too. The thesis states common methods of determining the natural substances cytotoxicity. For the experimental part of the thesis it was chosen the MTT test method and the xCELLigence system for monitoring in real time. The mechanical device of the tested substance capsaicin in application on the prostate cell lines, tumorous PC3 and nontumorous PNT1A influence will be observed within the experimental part of the thesis.

Keywords

Cancer, cancer treatment, cancer cell lines, natural products, polyphenols, alkaloids, capsaicin, cytotoxicity, MTT test, xCELLigence, fluorescence microscopy, light emission.

Bibliografická citace

HÁJKOVÁ, T. *Přírodní látky v léčbě rakoviny a jejich cytotoxicita*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 82 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D..

Dedikace

Experimentální část této diplomové práce byla podpořena v rámci projektu Evropského fondu pro regionální rozvoj FNUSA-ICRC CZ.1.05/1.1.00/02.0123.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Přírodní látky v léčbě rakoviny a jejich cytotoxicita jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujícího autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne

.....
podpis autorky

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Ivo Provazníkovi, Ph.D. a RNDr. Michalu Masaříkovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne

.....
podpis autorky

Obsah

1 Úvod	11
2 Teoretická část	12
2.1 Nádorové onemocnění	12
2.1.1 Rizikové faktory pro vznik nádorového onemocnění	12
2.1.2 Podstata kancerogeneze	13
2.1.3 Obecné postupy v léčbě rakoviny	15
2.2 Nádorové buněčné linie	17
2.2.1 Využití ve výzkumu nádorového onemocnění	17
2.3 Přírodní látky	20
2.3.1 Přírodní látky a kancerogeneze	20
2.3.2 Mechanismus působení přírodních látek	20
2.4 Polyfenoly a jejich charakteristika	21
2.4.1 Biologická aktivita polyfenolů	23
2.4.2 Mutagenita polyfenolů	25
2.5 Alkaloidy	26
2.5.1 Kapsaicinoidy a kapsaicin	27
2.5.2 Protinádorové a chemopreventivní účinky	28
2.6 Metody stanovení cytotoxicity	30
2.6.1 MTT test	30
2.6.2 XTT test	31
2.6.3 ³ H-thymidin inkorporace	31
2.6.4 BrdU Elisa	31
2.7 Navrhovaná metoda pro experimentální část	31
2.7.1 Systém xCELLigence RTCA (<i>Real-Time Cell Analyzer</i>)	32
2.8 Fluorescenční mikroskopie	35
2.8.1 Fluorescenční barviva	36
2.8.2 Barviva použitá v praktické části práce	37
3 Cíle práce	39
4 Experimentální protokol	40

4.1	Materiál	40
4.2	Kultivace buněk.....	40
4.3	Metody.....	41
4.3.1	MTT test.....	41
4.3.2	xCELLigence.....	41
4.3.3	Fluorescenční mikroskopie	42
4.4	Sledované parametry	42
5	Výsledky a diskuze.....	43
5.1	MTT test.....	43
5.2	xCELLigence	45
5.3	Fluorescenční mikroskopie	47
5.3.1	Buněčná linie PNT1A.....	47
5.3.2	Buněčná linie PC-3	48
5.4	Analýza obrazu v MATLABu.....	50
5.4.1	Grafické rozhraní GUI	52
5.5	Vyhodnocení emise záření	55
5.5.1	Lipidová peroxidace (PNT1A).....	56
5.5.2	Produkce thiolů (PNT1A).....	59
5.5.3	Reaktivní formy kyslíku (PNT1A).....	61
5.5.4	Lipidová peroxidace (PC-3).....	63
5.5.5	Produkce thiolů (PC-3).....	65
5.5.6	Reaktivní formy kyslíku (PC-3).....	67
5.6	Porovnání obou linií (PNT1A x PC-3)	68
5.6.1	Lipidová peroxidace	69
5.6.2	Produkce thiolů.....	69
5.6.3	Reaktivní formy kyslíku.....	70
6	Závěr.....	71
	Seznam literatury	73
	Seznam zkratk.....	81

Seznam obrázků

Obrázek 1: Vícestupňový proces kancerogeneze. [6].....	13
Obrázek 2: Změny podílející se na vytvoření maligního fenotypu. [4].....	14
Obrázek 3: Komplexita nádorových buněk. [4]	14
Obrázek 4: Metastatická kaskáda. [8].....	15
Obrázek 5: Přehled léčebných metod v onkologii. [10].....	16
Obrázek 6: a) Flavon, b) kyselina gallová. [44]	22
Obrázek 7: Kapsaicinoidy. R – postranní řetězec. [62]	28
Obrázek 8: Kapsaicin. [63].....	28
Obrázek 9: Redukce MTT na formazan. [70]	30
Obrázek 10: Systém xCELLigence. [75]	32
Obrázek 11: 96 - jamková E-destička pro monitoring v reálném čase. [76].....	33
Obrázek 12: Schéma změny impedance v závislosti na interakci buněk s elektrodami. [75]	34
Obrázek 13: Fluorescence, excitační a emisní spektrum. [78].....	35
Obrázek 14: Schéma snímání u epifluorescenčního mikroskopu. [79]	36
Obrázek 15: Snímky z fázového kontrastu při různých koncentracích kapsaicinu	47
Obrázek 16: Lipidová peroxidace.	47
Obrázek 17: Produkce thiolů.	48
Obrázek 18: Produkce reaktivních forem kyslíku.	48
Obrázek 19: Snímky z fázového kontrastu při různých koncentracích kapsaicinu	49
Obrázek 20: Lipidová peroxidace.	49
Obrázek 21: Produkce thiolů.	49
Obrázek 22: Produkce reaktivních forem kyslíku.	50
Obrázek 23: Blokové schéma algoritmu pro analýzu snímků.	50
Obrázek 24: Grafické rozhraní pro analýzu snímků.	52
Obrázek 25: Ukázka nastavení parametrů segmentace.	53
Obrázek 26: Fúze mapy a analyzovaného snímku.....	54
Obrázek 27: Označení buněk pro vyhodnocení intenzity záření.	55
Obrázek 28: Výstupem algoritmu jsou vypočtené hodnoty emise záření.	55
Obrázek 29: Lipidová peroxidace.	57
Obrázek 30: Produkce thiolů.	59
Obrázek 31: Reaktivní formy kyslíku.	61
Obrázek 32: Lipidová peroxidace.	63
Obrázek 33: Produkce thiolů.	65
Obrázek 34: Reaktivní formy kyslíku.	67

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled využití nádorových buněčných linií u nejčastějších typů nádorů v České republice.	18
Tabulka 2: Přehled využití nádorových buněčných linií u dalších typů nádorů.	19
Tabulka 3: Klasifikace ne-flavonoidů. [42–44].....	22
Tabulka 4: Klasifikace flavonoidů. [42–44].....	22
Tabulka 5: Biologická aktivita polyfenolů. [44, 46, 47].....	23
Tabulka 6: Souhrn cytotoxického působení některých polyfenolů.	24
Tabulka 7: Přehled alkaloidů vyskytujících se v potravinách. [62].....	27
Tabulka 8: Protinádorové účinky kapsaicinu.	29
Tabulka 9: Nastavení dílčích parametrů pro vytvoření mapy u buněčné linie PNT1A.	56
Tabulka 10: Nastavení dílčích parametrů pro vytvoření mapy u buněčné linie PC-3.	56

Seznam grafů

Graf 1: Vliv detergentu (EtOH) na viabilitu buněk. Buněčná linie PC-3.	43
Graf 2: Vliv kapsaicinu na buněčnou linii PNT1A.....	44
Graf 3: Vliv kapsaicinu na buněčnou linii PC-3.....	44
Graf 4: Kapsaicin (PNT1A).....	45
Graf 5: Kapsaicin (PC-3).....	46
Graf 6: Průměrná emise záření buněk při různé koncentraci kapsaicinu.	57
Graf 7: Průměrný medián maximálních intenzit.	58
Graf 8: Průměrná emise záření buněk.	59
Graf 9: Průměrný medián maximálních intenzit.	60
Graf 10: Průměrná emise záření buněk.	61
Graf 11: Průměrný medián maximálních intenzit.	62
Graf 12: Průměrná emise záření buněk.	63
Graf 13: Průměrný medián maximálních intenzit.	64
Graf 14: Průměrná emise záření buněk.	65
Graf 15: Průměrný medián maximálních intenzit.	66
Graf 16: Průměrná emise záření buněk.	67
Graf 17: Průměrný medián maximálních intenzit.	68
Graf 18: Porovnání lipidové peroxidace u obou linií (PNT1A x PC-3).	69
Graf 19: Porovnání produkce thiolů u obou linií (PNT1A x PC-3).	69
Graf 20: Porovnání produkce reaktivních forem kyslíku u obou linií (PNT1A x PC-3).....	70

1 Úvod

Rakovina může postihnout každého, mladé či starší lidi, bohaté, chudé, muže, ženy a děti. Rakovina představuje obrovskou zátěž pro pacienty a jejich rodiny. Je jednou z hlavních příčin úmrtí na světě.

Podle světové zdravotnické organizace (WHO – *World Health Organization*) je největší úmrtnost na rakovinu přisuzována rozvojovým zemím. [1] Podle statistických údajů je rakovina spíše problém zemí rozvinutých a z celosvětového hlediska se jedná o civilizační chorobu. V roce 2008 tvořilo úmrtí na rakovinu přibližně 13 % z celkového počtu úmrtí, to je odhadováno na 7,6 milionů úmrtí. Předpokládá se stále zvyšující počet úmrtí. Asi 30 % úmrtí lze zabránit správnou životosprávou, jako je omezení kouření, pohyb, zdravý jídelníček a redukce hmotnosti.

Znalosti příčin rakoviny, její prevenci a znalosti mechanismů vzniku onemocnění jsou stále limitované. Incidence nádorových onemocnění, případně další prognóza může být účinně kontrolována pomocí základních strategií prevence, včasné diagnostiky a zahájení léčby. Léčba zahrnuje pečlivý výběr jedné či více intervencí, jako je chirurgické odstranění nádoru, radioterapie a chemoterapie. Cílem je kompletně vyléčit onemocnění nebo alespoň prodloužit život a zlepšit jeho kvalitu. [2]

V diplomové práci bude krátce rozebrána problematika nádorového onemocnění, faktory ovlivňující vznik, princip kancerogeneze a obecné postupy v léčbě. Dále se bude práce zabývat přírodními látkami, konkrétněji problematikou využití přírodních látek v nádorové léčbě. Bude uvedena charakteristika jednotlivých látek, zejména cytotoxicita a další vlivy těchto látek na živý organismus. Bude navržena nejvhodnější metoda pro stanovení cytotoxicity vybraných látek v aplikaci na nádorové buněčné linie, jejichž použití ve výzkumu je dnes už rutinní. Dále budou vybrány parametry, které budou během studie sledovány, především budou zkoumány buněčné a jaderné změny.

Na základě těchto poznatků budou provedeny experimenty založené na fluorescenční mikroskopii. Získané poznatky budou vyhodnoceny a bude diskutována cytotoxicita a její mechanismus působení na vybrané nádorové buněčné linie.

2 Teoretická část

2.1 Nádorové onemocnění

Název nemoci je odvozen z řečtiny a latiny (*karkinos* = rak, *onkos* = krab a *cancer* = rak). Termín rakovina je však laický a užívá se nesprávně pro označení všech zhoubných nádorů, přičemž označuje skupinu nádorů povrchového a žláзовého epitelu (karcinomy).

Zhoubné nádorové onemocnění je chorobný stav, který je možné charakterizovat nekoordinovaným růstem nádorových buněk. Tyto buňky mají schopnost postupně se šířit do okolních tkání, pronikají do mizního a krevního systému a postihují vzdálené orgány (metastazování). [3]

2.1.1 Rizikové faktory pro vznik nádorového onemocnění

Každé nádorové onemocnění je způsobeno genetickými změnami na buněčné úrovni. Tyto genetické změny jsou podmíněny různými vlivy. Rizikové faktory pro vznik nádorů dělíme na faktory zevní a vnitřní. [4]

Nejvýznamnější skupinou faktorů ovlivňujících vznik nádorových onemocnění jsou zevní vlivy. Mezi ně zařazujeme hlavně vliv tabáku, zejména ve formě kouření cigaret. Užívání tabáku celkově přispívá 30 % k úmrtnosti na nádorová onemocnění. Dalšími vlivy jsou výživové faktory. S tím souvisí pojmy jako energetická bilance, obezita, fyzická aktivita a konzumace alkoholu. Obezita je považována za vysoce významný rizikový faktor, alkoholické nápoje jsou obecně považovány za karcinogeny. [5]

Druhou skupinou jsou faktory vnitřní, genetické. Tuto skupinu tvoří vrozené mutace, které jsou přítomny ve všech buňkách organismu a vytvářejí vysokou predispozici pro vznik určitého nádoru nebo více typů nádorů. Asi 5 až 10 % diagnostikovaných nádorů bývá dědičného charakteru. [4]

Nádory jsou chápány především jako onemocnění genomu, protože dochází ke genetickým a epigenetickým změnám, o kterých není dostatek informací. K přeměně normální buňky v buňku plně maligní však nestačí jediná mutace. Proces onkogenní transformace je vícestupňový, často je v buňce spuštěn zcela náhodně v důsledku stárnutí organismu a nedostatečnosti reparace spontánně vzniklých chyb DNA. Podle experimentálních dat se dříve usuzovalo, že k rozvoji nádorového onemocnění stačí pouze jediný nežádoucí zásah. Postupem času se zjistilo, že pro transformaci lidské buňky je nezbytných několik nezávislých zásahů. Dnes se odhaduje, že k rozvoji plně maligního fenotypu je nezbytná kumulace 4 až 8 různých genetických nebo epigenetických změn v buňce. Nádor vzniká a vyvíjí se procesem, který se nazývá kancerogeneze. Samotná podstata kancerogeneze bude rozebrána v následující kapitole. [4, 5]

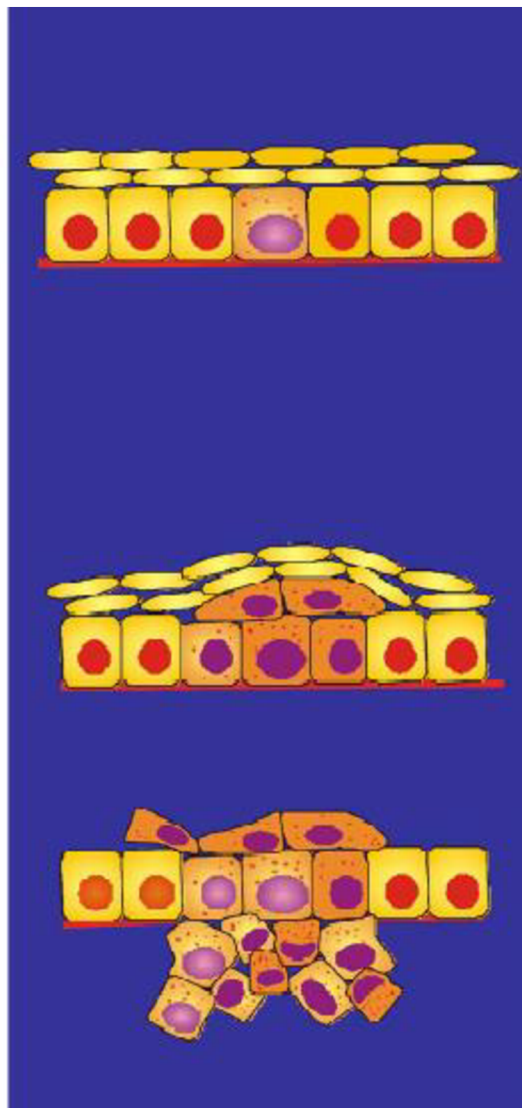
2.1.2 Podstata kancerogeneze

Jak již bylo řečeno, kancerogeneze je vícestupňový proces. Kancerogeneze zahrnuje tři základní fáze: iniciace, promoce a progrese, během nichž se odehrávají určité děje charakteristické pro vývoj nádorového onemocnění (Obrázek 1). [6]

- INICIACE**
- poškození DNA
 - mutace v cílových genech
 - aktivace protoonkogenů
 - inaktivace supresorových genů
 - buněčná replikace a fixace mutací

- PROMOCE**
- klonální expanze iniciovaných kmenových buněk
 - zahájení vývoje benigního nádoru

- PROGRESE**
- změny v expresi enzymů
 - proteolýza
 - narušení adheze
 - invaze
 - migrace
 - metastázy

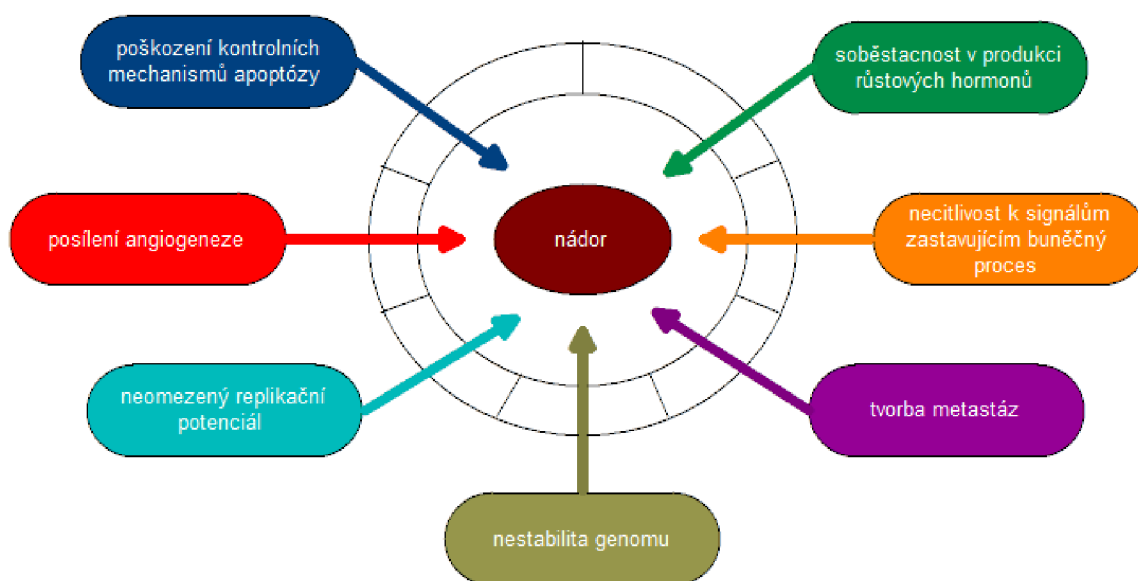


Obrázek 1: Vícestupňový proces kancerogeneze. [6]

Obecně je přijímána představa, že v buňce musí proběhnout asi šest základních změn, které se podílejí na vytvoření maligního fenotypu (Obrázek 2).

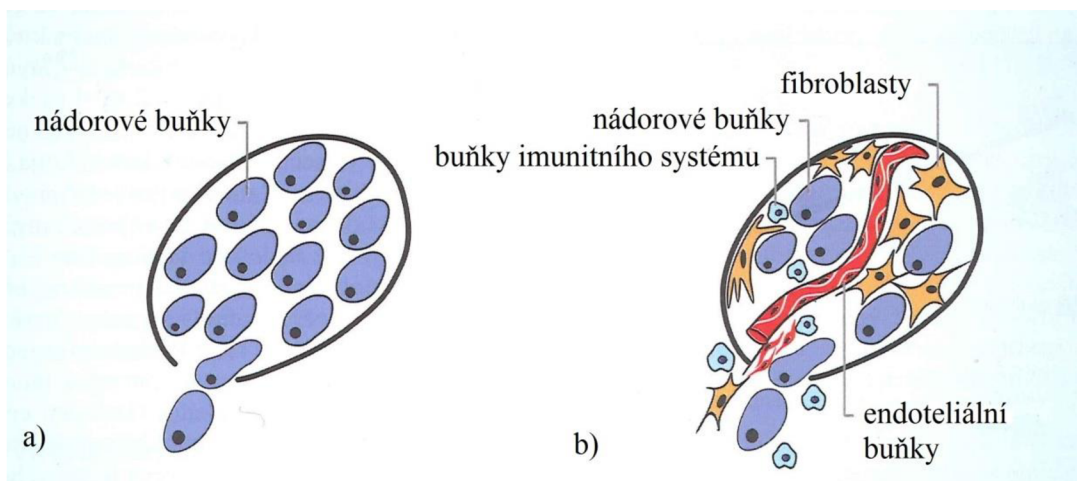
Buňka musí získat soběstačnost v produkci růstových signálů. Také musí být oslabena její citlivost k působení antiproliferačních signálů. Dále je výrazně oslabena schopnost buňky odpovídat na adekvátní signály spuštěním apoptózy a naopak je výrazně posílen její replikační potenciál. V nádorové tkáni je indukován proces angiogeneze a je posílena schopnost nádoru kolonizovat další tkáň a tvořit metastázy. Za sedmý typický znak nádorových buněk je možné považovat zvýšení genetické nestability. Díky tomuto se

zvyšuje pravděpodobnost, že budou skutečně pozměněny všechny naznačené funkce v nádorové buňce. [4]



Obrázek 2: Změny podílející se na vytvoření maligního fenotypu. [4]

Podstatné změny se týkají i vlastností a chování nádorových buněk jako takových. Snaha pochopit kancerogenezi ve vztahu k angiogenezi a vývoji metastáz vedla k faktu, že nádor je nutné brát jako komplexní tkáň (Obrázek 3). Tato tkáň je vedle nádorových buněk tvořena buňkami podpůrnými, endoteliálními, buňkami imunitního systému a řadou dalších. Nenádorové buňky a další komponenty přítomné v nádoru mají funkční význam pro vývoj a vlastnosti nádoru. [4]

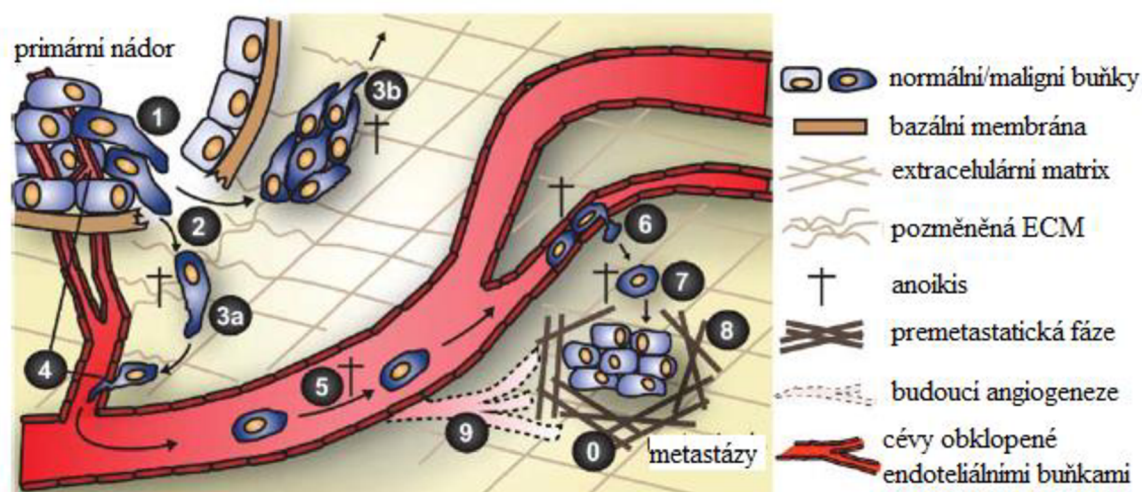


Obrázek 3: Komplexita nádorových buněk. a) zjednodušená představa, kdy byl nádor chápán jako soubor nádorových buněk, b) dnešní pojetí nádoru jakožto komplexní tkáň. [4]

Schopnost nádorů růst a vyvíjet se závisí na schopnosti získat si přístup ke krevnímu řečišti, ze kterého získávají nádorové buňky základní živiny a kyslík, a prostřednictvím kterého se zbavují odpadních produktů buněčného metabolismu. Proliferující premaligní léze jsou na začátku neangiogenní, což limituje jejich expanzi.

Angiogenní charakter získávají až během dalšího vývoje, typicky v raných až středních fázích kancerogeneze. Tento přechod se však neděje postupně ale „skokem“ („*angiogenic switch*“). [7]

Invazivní charakter umožňuje nádorovým buňkám uvolnit se z primárního nádoru a kolonizovat nové části těla, kde alespoň na začátku není dostatek živin a místa. Úspěšná invaze je závislá na výše zmíněných vlastnostech, které nádorové buňky získávají během kancerogeneze. Metastatická kaskáda zahrnuje několik kroků. Nádorová buňka se nejdříve uvolní z primárního nádoru, prostoupí přes extracelulární matrix a bazální membránu do krevního řečiště, jímž se šíří a následně zakládá nové ohnisko sekundárního nádoru. Přesný způsob metastatické kaskády ovšem není zcela objasněn, princip metastazování je naznačen níže (Obrázek 4). [8]



Obrázek 4: Metastatická kaskáda. 0) zahájení nemetastatické fáze vzdáleného nádoru, 1) buňky primárního nádoru získají invazivní charakter, 2) degradace bazální membrány a extracelulární matrix (ECM) pro usnadnění invaze, 3) šíření nádorových buněk buď samostatně (3a) nebo kolektivně (3b), 4) invaze nádorových buněk do nově vzniklých cév v blízkosti nádoru, 5) transport nádorových buněk cévami do kapilárního řečiště, kde jsou zadrženy (6), 7) vyvázané nádorové buňky mohou být po mnoho let nečinné, 8) nakonec některé buňky zahájí růst sekundárního nádoru, remodelaci ECM a angiogenezi (9), anoikis – vzdáleně indukovaná apoptóza, která může být zahájena v několika krocích kaskády. [8]

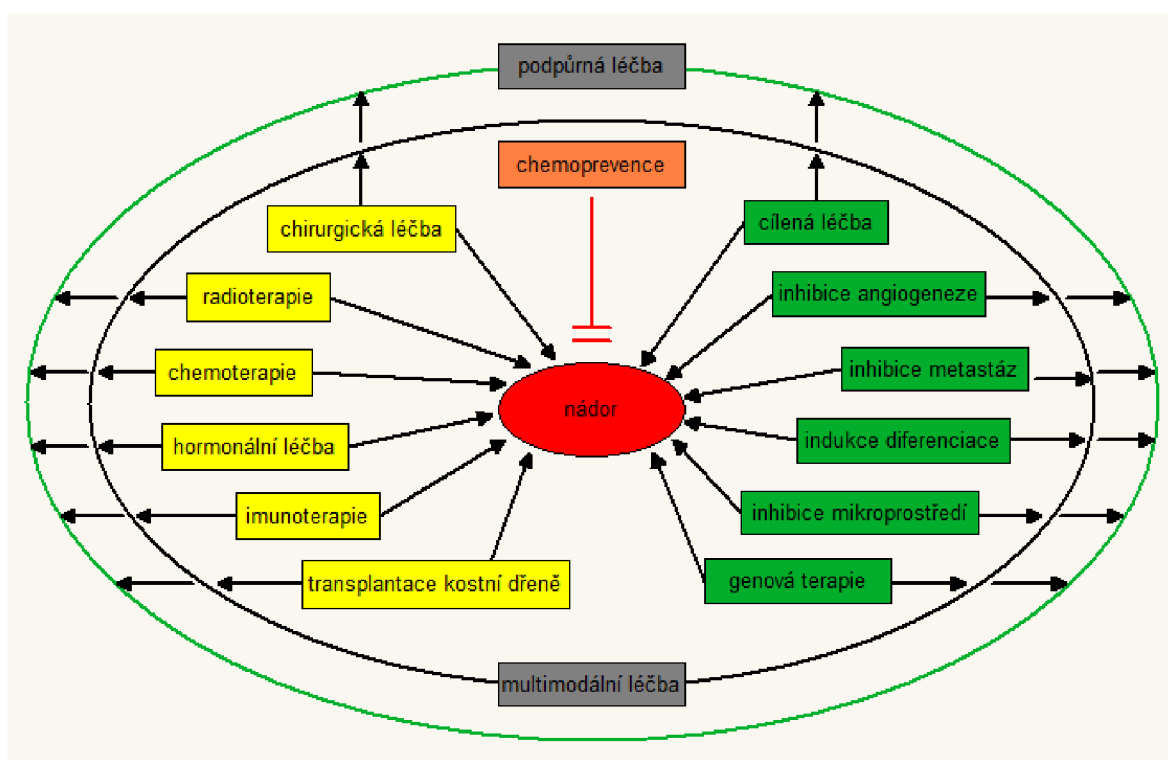
Dalším faktem ovlivňujícím proces kancerogeneze je, že nádorové buňky jsou často geneticky nestabilní a jejich mutační rychlost je významně zvýšena. Ta potom zvyšuje pravděpodobnost akumulace všech mutací souvisejících s kancerogenezí. Genetická nestabilita nádorů má významné důsledky. Je příčinou obrovské heterogenity nádorů a tím se velmi komplikuje jejich léčba. V léčbě je nutné ke každému typu nádorového onemocnění přistupovat individuálně. [9]

2.1.3 Obecné postupy v léčbě rakoviny

Léčba maligních chorob se podstatně liší od léčby jiných onemocnění. Onkologická léčba je zaměřena proti lidským buňkám, které se transformovaly na nádorové. Při ničení

těchto nádorových buněk velmi často dochází k ničení či poškození zdravých buněk a tkání. Léčba má tedy závažné nežádoucí účinky a zhoršuje se kvalita života pacienta.

Onkologickou léčbu je možné obecně rozdělit na léčbu protinádorovou a podpůrnou. Protinádorová léčba si klade za cíl maximální redukci popřípadě odstranění všech nádorových buněk. K tomu využívá jednotlivých léčebných postupů (chirurgie, radioterapie a medikamentózní léčba). Onkologická léčba je interdisciplinární, u většiny nádorů jsou postupně použity všechny dostupné léčebné možnosti. Na obrázku 5 je uveden přehled současných protinádorových léčebných přístupů. Podpůrná léčba usiluje o co nejlepší kvalitu života pacientů. Častěji je používán termín paliativní léčba, jedná se o komplexní podpůrnou léčbu poskytovanou pacientům s pokročilým nevléčitelným onemocněním. [4, 10]



Obrázek 5: Přehled léčebných metod v onkologii. [10]

Typy protinádorové léčby je možné dále rozdělit z hlediska cíle na kurativní a nekurativní léčbu. Kurativní léčba se snaží o kompletní odstranění nádorového ložiska, nejčastěji se jedná o operativní zákrok, případně je možné léčbu doplnit dalšími postupy. Chemoterapii či radioterapii lze samostatně s kurativním účinkem použít jen u některých typů nádorů. Nekurativní léčba si také klade za cíl ničení nádorových buněk, není ovšem možné nádor kompletně zahubit. Nekurativní protinádorová léčba je využita v případě, kdy dostupnými prostředky nelze pacienta vyléčit, nejčastěji je využívána chemoterapie. Nekurativní léčba je prováděna buď s cílem výrazného prodloužení života, nebo naopak s cílem zmírnit projevy onemocnění, jako je například bolest. Toto rozhodnutí je závislé na celkovém stavu pacienta a závažnosti onemocnění. [4, 10]

Léčba nádorového onemocnění je radikální a zatěžující pro pacienta i jeho rodinu. Z těchto důvodů se stále více výzkumných týmů zabývá problematikou včasné detekce nádorového onemocnění a nalezení šetrnějších léčebných postupů.

2.2 Nádorové buněčné linie

Biologie nádorů může být studována na vzorcích odebraných při chirurgickém zákroku. Takto získané vzorky představují skutečný stav nádoru *in vivo* a mohou být použity pro stanovení patologie, genové exprese a metabolismu. Nicméně tyto vzorky nejsou vhodné k experimentování, které vyžaduje použití různých modelů. [11] Jako modely pro výzkumné experimenty jsou používány buněčné kultury, které rozdělujeme na primární, sekundární a buněčné linie.

Buněčné linie představují kulturu buněk, které jsou charakteristické neomezenou životností a schopností neomezeného buněčného dělení. Buněčné linie lze získat z primárních buněčných kmenů procesem transformace nebo mohou být izolovány z živé tkáně. Právě izolace z živé tkáně se týká nádorových buněk, tímto procesem je možné získat a kultivovat nádorové buněčné linie, které jsou čisté, snadno se dělí a jsou dobře geneticky manipulovatelné. Nádorové buněčné linie mají zachovány charakteristické vlastnosti nádorových buněk a poskytují reprodukovatelné výsledky po mnoho cyklů pasážování. [11, 12]

2.2.1 Využití ve výzkumu nádorového onemocnění

Z důvodu výše zmíněných vlastností jsou nádorové buněčné linie běžně používány jako experimentální modely pro studium lidských nádorových onemocnění. Experimenty na modelech jsou nezbytné z následujících důvodů:

- Určení patofyziologie nádoru neboli získání dynamického pohledu na nádor od jeho vzniku až do posledních stádií, které jsou pozorované u pacientů.
- Testování hypotéz o vzniku, patogenezí a patofyziologii nádoru.
- Podrobné prozkoumání patofyziologických drah.
- Sledování a testování různých látek jako potenciální léčiva.
- Objevení nových diagnostických postupů. [11]

Tabulka 1 uvádí příklady využití nádorových buněčných linií při studiu nejčastějších nádorových onemocnění u českých mužů a žen. Pořadí nejvýznamnějších nádorů vychází z analýz epidemiologie zhoubných nádorů v České republice v období od roku 1977 – 2007. Tyto diagnózy dominují rovněž hodnotám mortality obou pohlaví. [13, 14] Tabulka 2 uvádí příklady dalších nádorových buněčných linií u ostatních typů nádorových onemocnění.

Tabulka 1: Přehled využití nádorových buněčných linií u nejčastějších typů nádorů v České republice.

Původ buněčných linií	Příklad experimentu	Typ nádorové linie	Zdroje
Plíce	Vliv protinádorových léčiv na růst nádoru	SBC-3	[15]
	SCLC ¹ Exprese transkripčního thyroideálního faktoru 1 (TTF-1)	16 různých linií	[16]
	NSCLC ² Vliv inhibitoru Bcl-2 v programové buněčné smrti Vlastnosti buněk před a po chemoterapii	NCI-H226, NCI-H358, NCI-H596 EBC-2/R	[17] [18]
Tlusté střevo a konečník	Antiproliferativní účinky COX-2 inhibitorů (nimesulide, NS-398)	HT-29, SW-1116	[19]
	Interakce léku oxaliplatin s inhibitory MS275 a SBHA	SW48, HT-29, Colo-205	[20]
Prostata	Cytotoxicita a indukce apoptózy pomocí α -konjugátu ²¹³ Bi-Herceptin	LNCaP-LN3, DU-145, PC-3	[21]
	Regulace receptorů pro růstové faktory u prostatických buněčných linií	LNCaP-FGC, PC-3, DU-145	[22]
Prso	p-53 dependentní represe kinázy FAK/PTK2 v závislosti na estradiolu	8 různých linií	[23]
	Metabolismus resveratrolu, vliv exprese sulfotransferázy 1A1 na inhibici buněčného růstu	ZR-75-1, MB-MDA-231	[24]
Děložní hrdlo	Vliv proteinu PIWIL4 na růst buňky a proliferaci pomocí inhibice apoptózy	HeLa, C ₃₃ A	[25]
	Případná ochranná role aktivátoru MAML v progresi nádoru pomocí regulace signálních drah	HeLa, SiHa, CaSki	[26]

¹ human small cell lung cancers, ² human non-small cell lung cancers

Tabulka 2: Přehled využití nádorových buněčných linií u dalších typů nádorů.

Původ buněčných linií	Příklad experimentu	Typ nádorové linie	Zdroje
Jícen	Vliv žlučových kyselin na proliferaci spinocelulárního karcinomu jícnu	TE2R, TE3, TE13, TE15	[27]
Žaludek	Snížení produkce oxidu dusnatého pomocí 5-Fluorouracil během aktivace I κ B kinázy	NCI-N87	[28]
Játra	Zahájení apoptózy pomocí kyseliny oleanolické a urosolické	HepG2, Hep3B, Huh7, HA22T	[29]
Žlučník a žlučové cesty	Vliv emodinu na citlivost nádorových buněk vůči platinovým lékům	SGC996	[30]
Slinivka břišní	Synergické antiproliferativní a antiangiogenní účinky EGFR ¹ a mTor inhibitorů	MiaPaCa-2, Panc-1, Capan-1, AsPC-1	[31]
Hrtan	Charakteristika rezistence nádorových linií vůči karboplatině	CBP-3, CBP-6, CBP-7	[32]
Melanom kůže	Studium účinků zprostředkovaných deriváty kumarinu na buněčný cyklus	SK-MEL-31	[33]
Ledvina	Studium vztahu mezi expresí genu <i>c-myc</i> a metabolismem fosfatidylinositolu (PI)	YCR-1, RC-YAMATO, KN-41, 5873T, C-6-3, ACHN, CAKI-2	[34]
Močový měchýř	Vztah mezi expresí metastatického supresorového genu <i>KAI1</i> a MMP-2 a MMP-9	BL-28/0, BL-13/0, BL-17/0/X1, B10, D2	[35]
Mozek	Efekt netermální plazmy (ionizovaný plyn) na růst nádorových buněk	T98G	[36]
Štítná žláza	Vliv inhibitoru PJ34 na proliferaci, expresi genu <i>NIS</i> a epigenetické markery	TPC1, BCPAP, FRO, WRO	[37]
Leukémie	Různá exprese genu <i>RFC1</i> v lidských leukemických nádorových liniích rezistentních vůči antifolátům	MOLT-3, K562	[38]

Vaječník	Buněčná exprese adherentních molekul v souvislosti s metastazováním nádoru vaječníku	OAW28,OAW41 M, OAW42,OAW59M, 0138D, 0180D, 0253D	[39]
----------	--	---	------

¹ epidermal growth factor receptor

2.3 Přírodní látky

Přírodní látky jsou produkty rostlinného nebo živočišného původu. Tyto produkty mohou vykazovat biologickou aktivitu a mít příznivý vliv na lidský organismus. Biologickou aktivitu látek zkoumá věda nazývaná farmakognosie. Předmětem studie jsou přírodní látky, které by mohly sloužit jako biogenní léčiva využívána přímo jako léčiva nebo nepřímo jako pomocné látky. Jedním z možných využití je hledání a výzkum nových biologických látek a materiálů. [40]

2.3.1 Přírodní látky a kancerogeneze

Mnoho přírodních produktů vykazuje chemopreventivní účinky proti běžně se vyskytujícím typům nádorů. Hlavní skupinu těchto produktů tvoří účinné antioxidanty a fenoly vyskytující se v přírodě, zbytek tvoří reaktivní produkty, které vykazují ochranné vlastnosti. Tyto přírodní produkty se běžně nacházejí v zelenině a ovoci, rostlinných extraktech a bylinách.

Mechanismus ochranného účinku není zcela jasný, ale skutečnost, že konzumace ovoce a zeleniny snižuje výskyt nádorových onemocnění je podporována epidemiologickými studiemi. Řada rostlinných složek by proto mohla být zodpovědná za ochranné účinky. Většina z nich slouží jako antioxidanty vyskytující se v potravinách a rostlinách, nejčastěji se jedná o fenolické nebo polyfenolické sloučeniny. Jako antikarcinogeny vyskytující se v potravinách rostlinného původu jsou taktéž považovány antioxidantní vitamíny C a E. Pro své ochranné účinky jsou zkoumány i další látky, například alkaloidy, terpeny či glykosidy. [41]

2.3.2 Mechanismus působení přírodních látek

Během studia kancerogeneze bylo zjištěno, že geny kontrolující apoptózu mají zásadní vliv na vývoj malignity, což může vést k iniciaci nádorového onemocnění, progresi a metastazování. Jedním z mechanismů potlačení nádorového onemocnění je schopnost přírodních látek zahájit apoptózu. Toto je základní podklad pro výzkum léčby nádorového onemocnění přírodními látkami.

Protein p53 kódovaný nádorovým supresorovým genem zprostředkovává zastavení růstu nebo zahájení apoptózy jako reakci organismu na vystavení se různým stresovým faktorům. P53 dependentní apoptóza se pak vyskytuje v několika senzitivních tkáních po

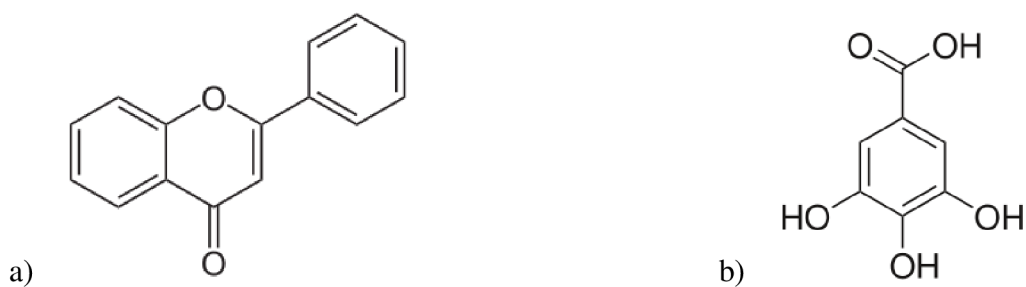
ozařování nebo chemoterapii jako vedlejší účinek léčby nádorového onemocnění, což z p53 činí potenciální cíl léčebné terapie. Hypoxický stres a poškození DNA zahajují hromadění proteinu p53 a p53 dependentní apoptózu v onkologicky transformovaných buňkách. Na rozdíl od poškození DNA, hypoxie neindukuje p53 dependentní zastavení buněčného cyklu, což naznačuje, že činnost proteinu p53 je různě ovlivňována těmito dvěma stresovými situacemi. Je možné, že inhibice obou typů interakcí může mít za následek sníženou aktivitu apoptických jevů.

Zda některé známé přírodní látky mají schopnost ovlivňovat expresi proteinu p53 vyžaduje experimentování. Současný výzkum vede k identifikaci přírodních látek jako nových preventivních látek v boji proti nádorovým onemocněním, založené na pochopení a vysvětlení jejich účinků v kancerogenezi. [41]

2.4 Polyfenoly a jejich charakteristika

Několik tisíc polyfenolových látek bylo objeveno ve vyšších rostlinách a několik stovek bylo nalezeno v potravinách rostlinného původu. [42] Rostlinné polyfenoly jsou aktivně vyvíjeny a prodávány jako doplňky stravy nebo bylinné přípravky. I přesto, že tyto sloučeniny nemají žádný zásadní význam ve výživě, mnohé z nich mají vlastnosti, které by mohly být prospěšné v prevenci nádorových onemocnění, a mohou chránit stabilitu genomu. Mezi tyto vlastnosti je možné zařadit účinky antioxidantní, antikarcinogenní a protizánětlivé. Ovšem ne všechny polyfenoly a jejich reakce jsou prospěšné. Některé z nich mohou mít mutagenní nebo prooxidační účinky, stejně tak mohou ovlivňovat základní biochemické procesy a biosyntézu, včetně činnosti topoizomerázy. Dále se také mohou navázat na signální molekuly a ovlivňovat proces kancerogeneze. [43]

Hlavní strukturální charakteristikou fenolických látek je jedna hydroxylová skupina navázaná na jednom nebo více aromatických kruzích. V případě, že je navázáno více hydroxylových skupin, jedná se o polyfenoly. [42] Rostlinné polyfenoly lze obecně rozdělit na dvě základní skupiny, flavonoidy a ne-flavonoidy. Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavonu, který je tvořen dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem (Obrázek 6a). Flavonoidy jsou největší a nejlépe prostudovanou skupinou polyfenolů a dále se dělí do několika skupin. Ne-flavonoidy obsahují aromatický kruh s jednou nebo více hydroxylovými skupinami, na obrázku 6b je příklad kyseliny gallové. Jednotlivé skupiny polyfenolů, příklady látek a jejich hlavní zdroje jsou uvedeny v tabulce 3 a 4. [42, 44]



Obrázek 6: a) Flavon, b) kyselina gallová. [44]

Tabulka 3: Klasifikace ne-flavonoidů. [42–44]

Skupina	Třída	Příklad	Hlavní zdroj
Ne-flavonoidy	Fenolové kyseliny a deriváty kys. skořicové	Kyselina gallová	Duběňky, ořechy
		Kyselina kávová	Kávová semena, ořechy
		Kyselina vanilinová	Plody vanilky
		Kyselina tříslová (tanin)	Káva, čaj, červené víno
	Chalkony	Phloridzin	Slupka jablek
	Stilbeny	Resveratrol	Hrozny, arašídny
	Fenolové alkoholy a lignany	Tyrosol Pinoresinol	Len (semena)

Tabulka 4: Klasifikace flavonoidů. [42–44]

Skupina	Třída	Příklad	Hlavní zdroj
Flavonoidy	Flavonoly	Kaempferol	Čaj, brokolice
		Quercetin	Červené víno, cibule, čaj
		Myricetin	Cibule, bobule, hrozny
	Flavony	Luteolin	Cibule, brokolice, celer
		Apigenin	
	Isoflavony	Genistein Daidzein	Sója
	Anthokyanidiny	Kyanidin	Hrozny, bobule, jablka
		Delphinidin	Hrozny, brusinky
	Flavanoly (flavan-3-oly)	Katechin	Kakao
		Epigatechin	Zelený čaj
EGCG ¹		Zelený čaj	
Flavanony	Naringenin	Pomeranč	
	Hesperidin	Grep	

¹ epigallocatechin gallate

2.4.1 Biologická aktivita polyfenolů

Rostlinné polyfenoly jsou díky svým prospěšným vlastnostem využívány v chemoprevenci. Chemoprevence je definována jako farmakologický přístup využívaný k potlačení nebo odvrácení vzniku nádorového onemocnění ještě před invazí a rozvojem metastáz. [44] Bylo zjištěno, že strava bohatá na polyfenoly je epidemiologicky spjata s nižším rizikem rozvoje nádorového onemocnění. [45] Chemopreventivní polyfenoly mohou blokovat nebo zvrátit premaligní fázi kancerogeneze a tím zastavit nebo alespoň zpomalit vývoj a progresi prekancerózních buněk v maligní. Proto jsou studovány možné účinky chemopreventivních polyfenolů v nádorovém vývoji. [44]

Biologická aktivita polyfenolů je shrnuta v tabulce 5, přičemž hlavním mechanismem je antioxidační aktivita a vyvázání volných radikálů. Reaktivní formy kyslíku, které generují nádorové buňky, se mohou navázat na signální molekuly a mohou mít za následek nefunkčnost buněčného růstu, diferenciaci a buněčné smrti. Tyto disfunkce mohou posléze vést k rozvoji zánětu nebo nádoru, proto je antioxidační aktivita považována za jeden z hlavních způsobů, jak zabránit či potlačit kancerogenezi. [44]

Tabulka 5: Biologická aktivita polyfenolů. [44, 46, 47]

Biologická aktivita	Mechanismus působení
Antioxidační aktivita	<ul style="list-style-type: none">- vyvázání volných radikálů (reaktivní formy kyslíku a dusíku, ROS a NOS)- chelace (schopnost navázat se na atomy kovů)- stabilizace bivalentních kationtů- regulace endogenních antioxidačních enzymů- regulace oxidačního stresu
Protizánětlivé účinky	<ul style="list-style-type: none">- protizánětlivé genové produkty mají zásadní vliv při rozhodování v procesech apoptózy, proliferace, angiogeneze, invaze a tvorbě metastáz- snížení exprese zánětlivých enzymů- potlačení tvorby oxidu dusnatého v buňkách
Antiproliferativní účinky	<ul style="list-style-type: none">- ovlivnění signálních drah buněčné proliferace- navázání na receptory růstových faktorů- inhibice aktivace transkripčního NF-κB faktoru a tím regulace exprese genů důležitých vývoj buněk
Antikarcinogenní účinky	<ul style="list-style-type: none">- ovlivnění molekulárních procesů ve všech třech stádiích kancerogeneze, iniciace, promoce a progresu- zvýšení exprese proapoptických složek v proliferujících buňkách

Tabulka 6 uvádí souhrn cytotoxického působení jednotlivých polyfenolů zkoumaných na různých buněčných liniích. Mnoho studií na různých buněčných liniích, zvířecích modelech a lidské epidemiologické studie ukázaly potenciální účinek polyfenolů jako antikarcinogenních látek. Polyfenoly mohou ovlivňovat molekulární procesy ve všech třech stádiích kancerogeneze, iniciace, promoce a progresu.

Tabulka 6: Souhrn cytotoxického působení některých polyfenolů.

Látka	Testovaná nádorová linie	Mechanismus cytotoxického působení	Zdroje
EGCG	LNCaP, PC-3	- Zahájení apoptózy (aktivace kaspázy 3 a 9 během programované smrti)	[48]
	YCU-H891, YCU-H861	- Zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 (↓ cyklin D1, ↑ p21, ↑ p27) - Zahájení apoptózy (↓ Bcl-2, ↓ Bcl-xL, ↑ Bax, aktivace kaspázy 9)	[49]
Kurkumin	DU145, LNCaP	- Inaktivace transkripčního faktoru NF-κB a zahájení apoptózy (↓ Bcl-2, ↓ Bcl-xL) - Aktivace prokaspázy 3 a 8	[50]
Resveratrol	LNCaP, DU-145, PC-3	- Inhibice vzniku volných radikálů (↓ NO, regulace produkce NOS) - Inhibice aktivity zánětlivých enzymů (↓ COX-1 a COX-2)	[51]
	HT-29	- Zahájení apoptózy (produkce ROS v mitochondriích během apoptózy) - Zastavení buněčné proliferace	[52]
Kvercetin	PC-3	- Potlačení invaze a metastazování (↓ exprese metaloproteináz MMP-2 a MMP-9)	[53]
	HK1, CNE2	- Zastavení buněčného cyklu ve fázích G2/M, G0/G1 a zahájení apoptózy (↑ Bad, aktivace kaspázy 3 a 7)	[54]

Genistein	LNCaP, PC-3	- Inhibice angiogeneze, regulace transkripčního a epidermálního růstového faktoru (\downarrow TGF- β , \downarrow EGF)	[55]
	MDA-MB-231	- Inhibice buněčného růstu a zahájení apoptózy, regulace signálních drah (\downarrow Akt, inaktivace NF- κ B)	[56]
Luteolin	HepG2	- Zahájení apoptózy, mitochondriální translokace Bax/Bak a aktivace terminální kinázy c-Jun NH2 (JNK)	[57]
Apigenin	MCF-7, MDA-MB-468	- Zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M (\downarrow cyklin B1, \downarrow kináza CDK1)	[58]

Nicméně je nutné podotknout, že některé studie neprokázaly pozitivní účinky polyfenolů v souvislosti s nádorovým onemocněním. [47] Chemopreventivní účinky polyfenolů jsou závislé na konkrétní sloučenině, její koncentraci, typu léčby a typu studovaných buněk. Z těchto důvodů musí být jednotlivé polyfenoly studovány samostatně tak, aby mohly být vyjasněny molekulární mechanismy, které by mohly u polyfenolů vykazovat antikarcinogenní účinky. [46]

2.4.2 Mutagenita polyfenolů

Je známo přibližně 8000 polyfenolů, jen okolo 200 jich bylo testováno na mutagení vlastnosti a většinou v jednoduchých bakteriálních testech. Většina testovaných polyfenolů se projevila jako slabé mutageny nebo nevykazovaly žádné mutagení vlastnosti, přičemž kvercetin byl nejsilnější mutagen. Je známo, že polyfenoly se mohou navázat na DNA a tato přímá interakce může být důležitým mechanismem bakteriální mutagenity. Například kyselina tříslová může způsobit degradaci DNA prostřednictvím vytváření reaktivních forem kyslíku jako volných hydroxylových radikálů. Katalýza nitrosylace, zahájení oxidačního stresu a inhibice enzymů topoizomeráz jsou možné funkce polyfenolů, které mohou vysvětlit mechanismy mutagenity. [43]

Dusitany a dusičnany přítomné ve stravě jsou prekurzory pro tvorbu N-nitroso sloučenin, které jsou pravděpodobnými lidskými karcinogeny. Tyto reakce probíhají v žaludku za nízkého pH. Některé polyfenolové sloučeniny jako jsou kaempferol, kvercetin, katechin a naringenin mají schopnost katalyzovat tyto reakce v podmínkách podobných těm, které jsou v lidském žaludku. [59]

Rostlinné polyfenoly jsou obecně považovány za antioxidanty, které mají schopnost vyvazovat volné radikály. Nicméně, některé rostlinné polyfenoly mohou během

těchto reakcí vytvářet sekundární reaktivní radikály, které mohou oxidovat jak proteiny, tak i lipidy. [60] Existují však i další mechanismy, kdy se polyfenoly mohou chovat jako oxidanty. Ohshima a kolektiv zjistili, že mnoho polyfenolů běžně působících jako antioxidanty mohou v přítomnosti oxidu dusnatého působit jako prooxidanty. Některé polyfenoly mohou rovněž působit prooxidačně ve vysokých koncentracích. [61]

Inhibice topoizomerázy I nebo II může vést k mutagenезi. Topoizomerázy jsou enzymy, které štěpí a znovu spojují vlákna DNA během procesů, jako jsou replikace, transkripce a reparace. Existuje mnoho sloučenin, které jsou nazývány „jedy“ topoizomeráz II a mohou zasahovat do zmíněných procesů. Tyto zásahy mohou způsobovat akumulaci zlomů a mutací v sekvenci DNA bez nutnosti přímé interakce se samotnou sekvencí DNA. Několik polyfenolů, včetně taninů, katechiny, flavony a isoflavony, jako například genistein bylo identifikováno jako „jedy“ topoizomerázy II. [43]

Je ovšem nutné podotknout, že prozatím nejsou k dispozici dostatečné informace o mechanismu působení polyfenolických látek na lidský organismus a nelze jednoznačně prokázat, že fungují pomocí výše zmíněných mechanismů a že mají dlouhodobé karcinogenní účinky. [43]

2.5 Alkaloidy

Alkaloidy jsou rozsáhlá skupina sekundárních metabolitů obsahující dusík v negativním oxidovaném stavu a jsou v omezené míře distribuovány živými organismy. Je známo přes 10 000 alkaloidů mnoha různých struktur a tvoří nejpočetnější skupinu přírodních produktů.

Vyskytují se přibližně v 15 – 20 % vaskulárních druhů rostlin, kde se mohou nacházet buď ve volném stavu, nebo jako N-oxidy a soli rostlinných kyselin. Jiné tvoří jejich estery nebo amidy. Některé rostlinné alkaloidy se vyskytují v kombinaci s cukry jako glykosidy. Zatímco většina alkaloidů byla izolována z rostlin (jejich listy, kůra, kořeny a semena), velký počet byl izolován rovněž z mechů, hub, některých bakterií a dokonce i živočišných zdrojů.

Alkaloidy jsou vysoce reaktivní látky s biologickou aktivitou v malých dávkách, a proto se předpokládá, že hrají roli v obraně rostlin před býložravci a patogeny. Mnoho alkaloidů vykazuje rovněž významné farmakologické aktivity, některé byly využívány jako léčiva, a některé z nich byly zneužívány jako nelegální drogy.

Alkaloidy jsou těžko odlišitelné od ostatních sloučenin obsahujících dusík. Dříve, když nebylo mnoho známo o biosyntéze alkaloidů, byly seskupeny podle rostlin a zvířat, ze kterých byly izolovány. Když bylo zjištěno více informací o určitém alkaloidu, bylo seskupení změněno tak, aby odráželo nové poznatky. Obvykle se vycházelo z biologicky významného aminu, který se účastnil procesu biosyntézy. Všeobecně je přijato třídění

podle jejich hlavní kruhové struktury obsahující dusík, i když struktura některých alkaloidů je složitější, a jejich hlavního prekurzoru biosyntézy. V zásadě jsou uznávány tři hlavní skupiny alkaloidů: pravé alkaloidy, pseudoalkaloidy a protoalkaloidy, jak ukazuje tabulka 7. [62]

Tabulka 7: Přehled alkaloidů vyskytujících se v potravinách. [62]

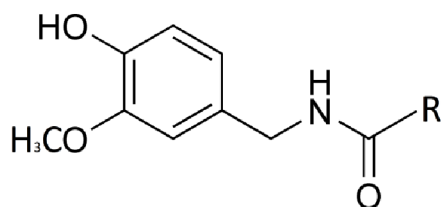
Struktura (základní skelet)	Prekurzor	Významná skupina	Příklad
Pravé alkaloidy			
Pyridin, Piperidin, Pyrrolidin	Arg, Lys, Orn, kys. nikotinová	Tabákové alkaloidy	Nikotin, Nornikotin, Anatabin, Anabasin
Pyrrrolizidin	Lys, Phe Arg, Ile, Leu, Orn, Val, Thr	Pepřové alkaloidy Alkaloidy rodu <i>Senecio</i>	Piperin Senecionin
Chinolizidin	Lys	Lupinové alkaloidy	Lupanin, Lupinin, Sparteín
Chinolin	Trp, kys. mevalonová	Alkaloidy rodu <i>Cinchona</i>	Chinin, Chinidin, Cinchonidin, Cinchonin
Protoalkaloidy			
Kapsaicinoidy (vanillylamidy)	Leu, Phe, Val, malonyl-CoA	Alkaloidy rodu <i>Capsicum</i> (paprika)	Kapsaicin, Nordihydrokapsaicin, Homodihydrokapsaicin
Pseudoalkaloidy			
Purin	Puriny	Alkaloidy v kávě, čaji a kakau	Kofein, Theobromin
Steroidní (terpenoidní) glykoalkaloidy	Kys. mevalonová	Glykoalkaloidy v bramborách a rajčatech	Solanin, Tomatin

2.5.1 Kapsaicinoidy a kapsaicin

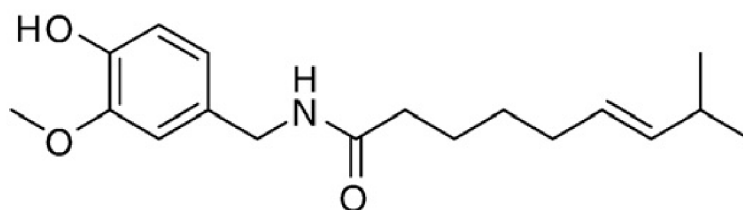
Kapsaicinoidy jsou odvozeny od rodu *Capsicum*, jež zahrnuje jak běžné papriky, tak středně velké chilli papričky (např. jalapeño) pocházející z odrůdy *C. annuum* a stejně tak malé chilli z odrůdy *C. frutescens* (např. tabasco).

Papriky jsou charakteristické svojí ostroostí, která je dána akumulací protoalkaloidu kapsaicin, od něhož je odvozen kolektivní název kapsaicinoidy. Kapsaicinoidy zahrnují skupinu 12 a více látek vznikajících kondenzací mastných kyselin a vanillylaminů.

Po strukturní stránce si jsou velmi podobné, liší se pouze délkou postranního uhlovodíkového řetězce a přítomností nebo nepřítomností jedné dvojné vazby v řetězci. Strukturální schéma kapsaicinoidů je naznačeno na obrázku 7, samotný kapsaicin je na obrázku 8, jehož molekulární vzorec je $C_{18}H_{27}NO_3$. [62, 63]



Obrázek 7: Kapsaicinoidy. R – postranní řetězec. [62]



Obrázek 8: Kapsaicin. [63]

Kapsaicinoidy mohou vyvíjet mnohonásobné farmakologické a fyziologické účinky, včetně účinků analgetických, protinádorových, protizánětlivých, antioxidačních a antiobezitních. Kapsaicinoidy proto mohou mít potenciální hodnotu při úlevě od bolesti, prevenci vzniku nádorových onemocnění a při hubnutí. Kromě toho mohou vykazovat pozitivní vliv na kardiovaskulární a gastrointestinální systém. [63]

Kapsaicin se běžně vyskytuje v paprikách v rozmezí 0,1 – 1 %. Kapsaicin vyvolává četné biologické aktivity, a proto je cílem rozsáhlého výzkumu již od jeho první identifikace roku 1919. Jedna z nejvíce uznávaných fyziologických vlastností kapsaicinu je jeho selektivní účinek na periferní části sensorické nervové soustavy, s čímž souvisí potenciální úloha při úlevě od bolesti. [64]

Vzhledem k časté konzumaci kapsaicinu jako potravinářské přísady a současnému terapeutickému použití, je důležité správné posouzení účinků na lidský organismus. Studium vlivu kapsaicinu bude předmětem praktické části této diplomové práce, zkoumány budou zejména jeho cytotoxické účinky jak na zdravé, tak na rakovinné buňky.

2.5.2 Protinádorové a chemopreventivní účinky

Protinádorové aktivity kapsaicinoidů, především kapsaicinu a dihydrokapsaicinu, jsou zkoumány již delší dobu. Kapsaicinoidy nevykazují protinádorové účinky pouze u experimentů *in vitro*, ale rovněž u *in vivo* studií. V buněčných kulturách byl kapsaicin schopen blokovat migraci nádorových buněk a zastavit růst nádorové léze. V klinických studiích bylo sledováno potlačení růstu leukemických buněk způsobené kapsaicinem.

Protinádorové a chemopreventivní účinky kapsaicinoidů úzce souvisí s jejich schopností zabránit migraci a množení buněk, ale rovněž jsou schopné indukovat buněčnou apoptózu. Jak již bylo zmíněno, buněčná proliferace hraje zásadní roli ve vícestupňovém procesu kancerogeneze a je rozhodujícím znakem pro prevenci vzniku nádorového onemocnění. Kapsaicin společně s dihydrokapsaicinem mají schopnost potlačit růst různých imortalizovaných a maligních buněčných linií. Hlavními mechanismy jsou zastavení buněčného cyklu, apoptóza, autofagie a nebo prostřednictvím inhibice buněčné metabolické aktivity. [63] Tabulka 8 uvádí některé studie zaměřené na protinádorové účinky kapsaicinu.

Tabulka 8: Protinádorové účinky kapsaicinu.

Testovaná buněčná linie	Mechanismus cytotoxického působení	Zdroje
Močový měchýř: T24	<ul style="list-style-type: none"> - Snížení viability nádorových buněk, postupně vedoucí k jejich usmrcení - Indukce produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) - Depolarizace mitochondriální membrány 	[65]
Dospělé leukemické T-buňky: HPB-ATL-T, HPB-CTL-I, HUT-102, HPB-ALL	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibice růstu ATL buněk, zastavení buněčného cyklu a zahájení apoptózy - Zahájení degradace Tax, ↑ Iκ-Bα, ↓ nukleárního faktoru NF-κB, ↓ Bcl-2 	[66]
Tlusté střevo a konečník: SW480, LoVo a HCT-116	<ul style="list-style-type: none"> - Zastavení proliferace buněk potlačením transkripční aktivity β-keninu - ↓ exprese β-keninu, ↓ transkripce genu (<i>CTNBI</i>), proteosomální degradace β-keninu, ↓ exprese TCF-4¹ a narušení interakce s β-keninem 	[67]
Prostata: PC-3, DU-145 a LNCaP	<ul style="list-style-type: none"> - Zahájení syntézy a sekrece cytokinu interleukinu (IL)-6 - Inhibice zvýšené sekrece IL-6 pomocí capsazepinu (antagonista přechodového receptoru TRPV-1) - Zahájení produkce tumor nekrotizujícího faktoru (TNF-α) 	[68]

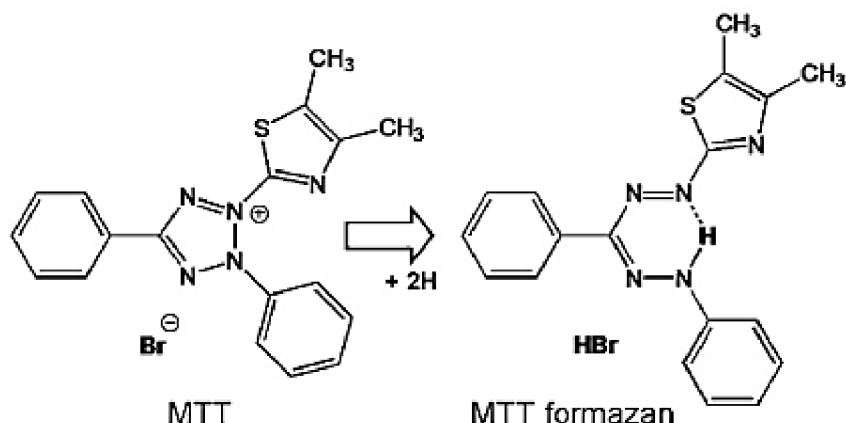
¹ T-cell factor

Existují dvě cesty indukce buněčné apoptózy kapsaicinem, a to přímá (nezávislá na receptorech) a nepřímá (závislá na receptorech). V přímé dráze indukuje apoptózu v interakci s kaspázami, zejména 1 a 3. V nepřímé dráze musí kapsaicin interagovat s přechodným receptorem TRPV-1, což vede ke zvýšení intracelulárního vápníku a důkazům o rané nebo pozdější apoptóze. Zajímavostí je, že kapsaicin selektivně inhibuje růst nebo indukuje apoptózu pouze u immortalizovaných a maligních buněčných linií, kdežto u zdravých buněčných linií ne. Nicméně mechanismus vysvětlující tento cytotoxický fenomén je stále nejasný. [63]

2.6 Metody stanovení cytotoxicity

2.6.1 MTT test

MTT test je kolorimetrický test založený na redukcí žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylní tetrazolium bromidu (MTT) na fialový formazan v krystalické podobě (Obrázek 9). Štěpení probíhá pomocí mitochondriálních enzymů na membráně metabolicky aktivních buněk. Metoda byla poprvé popsána Mossmanem, který ji použil pro detekci přežití a proliferace savčích buněk. [69]



Obrázek 9: Redukce MTT na formazan. [70]

Výsledkem testu je spektrofotometricky určené množství detergentem rozpuštěného formazanu. Tato hodnota je přímo úměrná počtu životaschopných buněk, přičemž čím tmavší barva, tím více buněk přežilo. Výhodou testu je značná přesnost a rychlost, čímž si tato metoda získala nezastupitelnou pozici v měření viability buněk.

MTT test je hlavně využíván v buněčné biologii pro kvantifikaci lymfokinů, následně pro buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu, buněčnou chemosenzitivitu, a testování protinádorových léčiv. Obecně je tato metoda používána pro studium růstu buněk a proliferace. [69]

2.6.2 XTT test

XTT test je modifikací původního MTT testu. Stevens a Olson v roce 1993 použili tetrazoliovou sůl XTT (hydrát benzensulfonové kyseliny) se záměrem metodu vylepšit.

Tetrazoliová složka XTT je redukována na oranžový formazan, který je ve vodě rozpustný. Množství formazanového barviva je možné tedy přímo spektrofotometricky stanovit a tím určit životaschopnost buněk. Výsledkem jsou obarvené živé buňky, mrtvé buňky nejsou schopny s XTT reagovat a zůstanou bezbarvé.

XTT test je stejně efektivní jako MTT test, ale jeho provedení je rychlejší a jednodušší. Ve srovnání s MTT je XTT méně cytotoxické vůči živým buňkám. Tato metoda je běžně používána pro stanovení buněčné viability v imunologii a nádorovém výzkumu. [71, 72]

2.6.3 ³H-thymidin inkorporace

³H-thymidin je radioaktivní izotop, který má schopnost inkorporovat se do nově vznikajících chromozomálních vláken DNA během buněčné diferenciace. Izotop se přidává k testovaným buňkám během kultivace a výsledkem měření je stupeň radioaktivity, který odpovídá rozsahu dělení buněk v závislosti na testované látce.

Metoda slouží k testování proliferace nádorových buněk a stupně syntézy DNA. Syntéza DNA je dodatečným parametrem pro určení míry buněčné proliferace. Mezi hlavní výhody oproti výše zmíněným metodám patří přímé měření proliferace nádorových buněk. [73]

2.6.4 BrdU Elisa

5-bromo-2-deoxy-uridin (BrdU) je běžně používaný marker pro stanovení proliferace buněk *in vitro* a *in vivo*. *In vivo* se používá ke stanovení buněčné proliferace v nově vznikajících orgánech a tkáních během buněčného dělení v S-fázi a během regenerační cytogeneze v dospělosti.

BrdU je inkorporován do DNA během buněčného dělení. Aby bylo možné sledovat buňky v průběhu buněčného dělení, je nutné je označit. Pro označení se používá protilátka proti BrdU, která je fluorescenčně značena. Protilátka se naváže na BrdU včleněné do DNA a umožní tak vizualizaci průběhu buněčného dělení a proliferaci nádorových buněk. [74]

2.7 Navrhovaná metoda pro experimentální část

V experimentální části budou využity dvě techniky pro stanovení cytotoxicity látek v aplikaci na buněčné linie. Jednou z metod je MTT test, jedná se o nejběžnější techniku end-point analýzy buněk. Problémem těchto analýz je, že jsou do značné míry limitované.

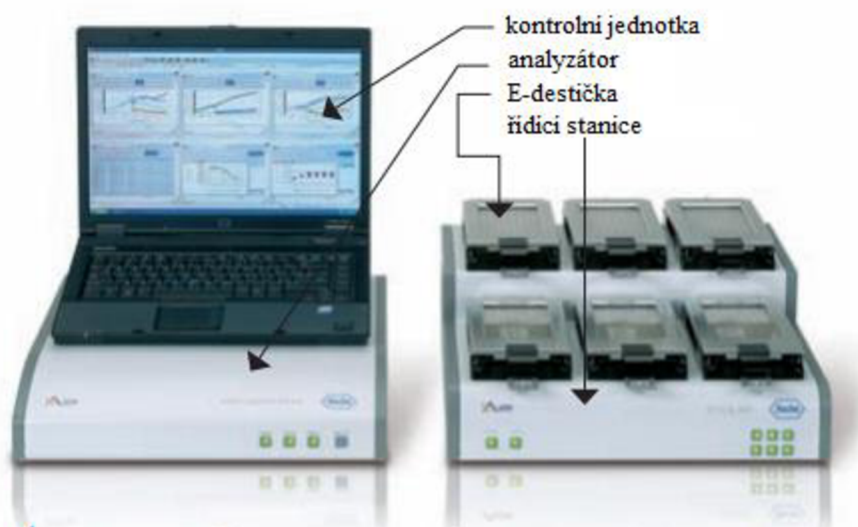
Nevýhodou MTT testu je nutnost značení, které může negativně ovlivňovat buňky. Detekční technikou tohoto testu je stanovení míry absorpance, která nemusí podávat dostatečně kvalitní výsledek. Buňky a sloučeniny mají sklon k interferenci, čímž může dojít ke značnému zkreslení výsledků. Dalším problémem je kontrola kvality, není možné sledovat a analyzovat mechanismus účinku testované látky.

Obrovským posunem ve výzkumu je systém xCELLigence, díky němuž je možné v reálném čase sledovat dynamiku procesů na buněčné úrovni jako je buněčná smrt, cytotoxicita, viabilita a proliferace v buněčné populaci. Tato technika bude druhou metodou využitou v experimentální části práce. [75]

2.7.1 Systém xCELLigence RTCA (*Real-Time Cell Analyzer*)

Systém xCELLigence monitoruje buněčné události v reálném čase bez nutnosti barevného značení, metoda je tedy zcela neinvazivní. Výsledkem je kvantitativní informace o biologickém stavu buněk, přičemž monitorování probíhá v podmínkách co nejvíce blízkým přirozenému prostředí buněk. Navíc je možné buněčné změny sledovat jak krátkodobě v rozsahu několika minut, tak dlouhodobě po několik dní. Velkou výhodou tohoto systému je, že analýzy jsou zcela automatizované a výsledky jsou přesné a spolehlivé.

Systém xCELLigence existuje ve třech různých módech, ale každé zařízení se skládá ze čtyř základních komponent: RTCA analyzátor, řídicí stanice, kontrolní jednotka a E-destička (Obrázek 10). Rozdíl v jednotlivých módech je v počtu destiček, které je možné paralelně analyzovat. Řídicí jednotka a destička jsou umístěny v běžném inkubátoru pro buněčnou kultivaci, ostatní komponenty jsou mimo něj, přičemž v inkubátoru je nutné během experimentu kontrolovat teplotu, vlhkost a množství CO₂. [75]



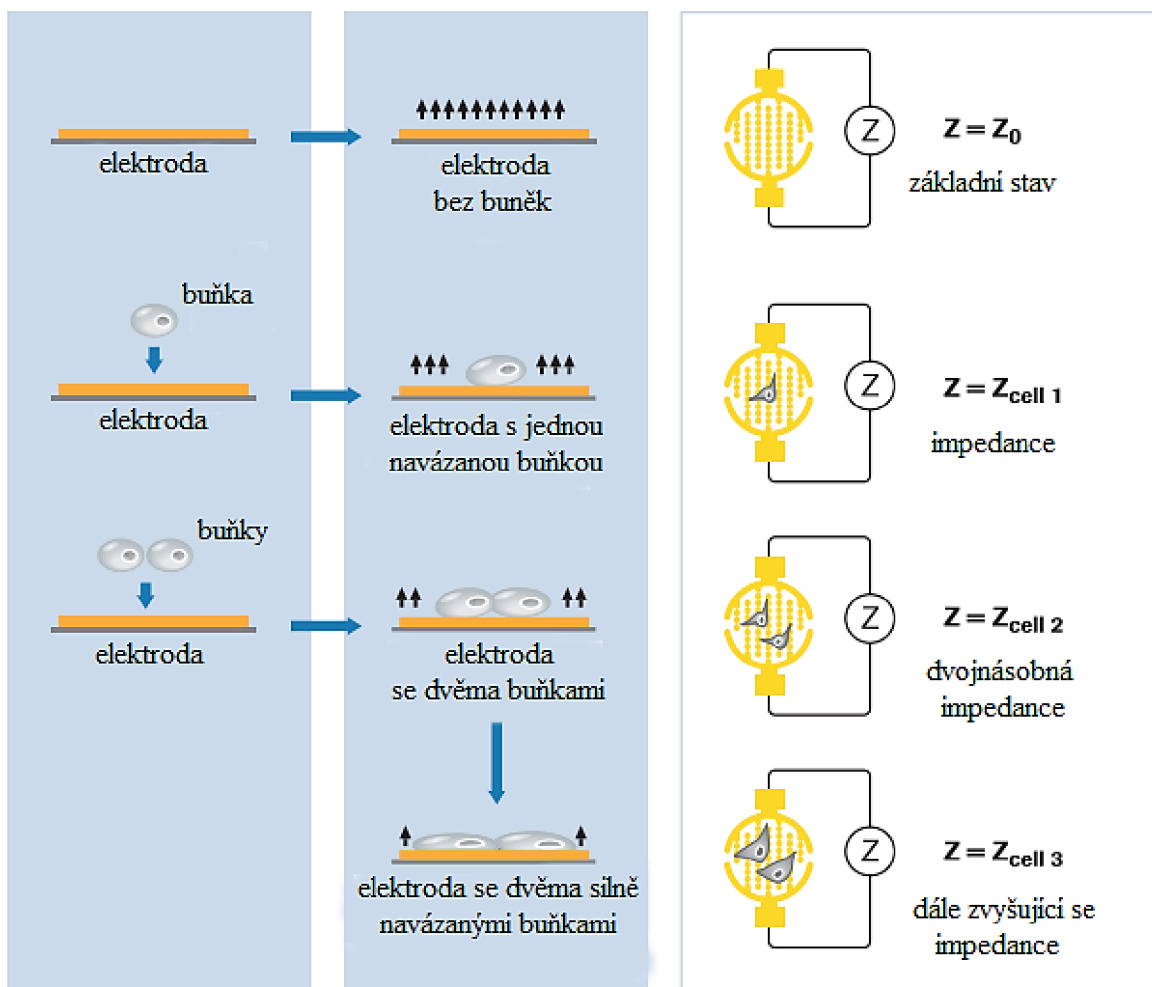
Obrázek 10: Systém xCELLigence. [75]

E-destička je podobná běžně používaným destičkám pro buněčné analýzy (například pro MTT test) a většinou obsahuje 96 jamek. E-destičky jsou výhradně na jedno použití. Rozdílem oproti klasickým destičkám je integrace zlatých elektrod na dno každé jamky, tím je zajištěno, že buňky uvnitř každé jamky mohou být jednotlivě sledovány a analyzovány. Elektrody jsou navrženy tak, aby pokrývaly přibližně 80 % plochy dna, a kryt destičky zajišťuje co nejmenší odpařování. E- destička je znázorněna na obrázku 11. [75]



Obrázek 11: 96 - jamková E-destička pro monitoring v reálném čase. [76]

Mikroelektrody jsou na dno jamek integrované z toho důvodu, aby bylo možné měřit impedanci, ta je chápána jako elektrický odpor pro střídavý proud. Přítomnost buněk v jamkách ovlivňuje iontové prostředí na rozhraní elektroda/roztok, což vede ke zvýšení impedance elektrody. Platí, že čím více buněk je na elektrodách navázáno, tím více se zvýší impedance. Navíc se impedance může měnit v závislosti na kvalitě interakce mezi buňkami a elektrodami. Například zvýšená adheze buněk a jejich šíření vede k větší změně impedance, schematicky znázorněno na obrázku 12. Impedance je pak vyhodnocena jako hodnota buněčného indexu (CI – *cell index*), která charakterizuje životaschopnost a počet buněk, morfologii a míru adheze. Buněčný index je bezrozměrný parametr, který je odvozen od relativní změny elektrické impedance v závislosti na stavu buněk. Pokud buňky nejsou přítomny nebo jsou špatně přichyceny na elektrody, je buněčný index nulový. [75]



Obrázek 12: Schéma změny impedance v závislosti na interakci buněk s elektrodami. [75]

System xCELLigence získal nezastupitelnou pozici v monitoringu buněčných procesů. Aplikace této metody zahrnuje především sledování buněčné viability a proliferace, apoptózy a buněčně zprostředkované cytotoxicity. Dále také sledování cytopatogenicity způsobené viry či bakteriemi a analýza funkčnosti buněčných receptorů. V průběhu experimentu je rovněž možné do jamek přidat různé látky a činidla a sledovat odezvu buněk v podobě buněčného indexu a tím stanovit míru cytotoxicity daných látek.

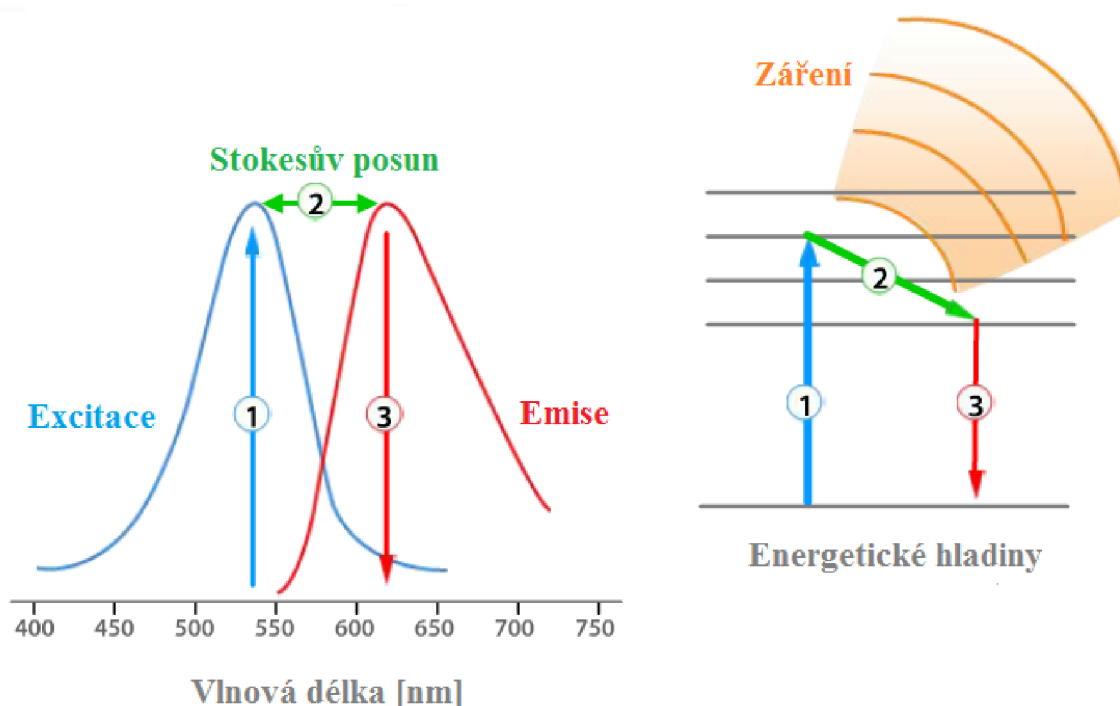
Monitoring buněčných procesů v reálném čase má mnoho výhod oproti klasickým end-point testům. Za prvé, analýzy jsou více fyziologicky relevantní, protože buňky není potřeba barevně značit, tím se zároveň šetří čas a práce. Za druhé, komplexní reprezentace celé analýzy umožňuje přesné načasování některých manipulací. Skutečná kinetická odezva buněk poskytuje důležité informace o stavu buněk před a po manipulaci a změně podmínek. [75]

Změny růstových křivek budou rovněž prakticky ověřeny pomocí fluorescenční mikroskopie, kdy budou především zkoumány změny tvaru buněk a intenzita záření. Získané informace budou shrnuty a vyhodnotí se cytotoxicita testované látky v aplikaci na buněčné linie.

2.8 Fluorescenční mikroskopie

Mikroskop lze definovat jako zařízení, díky němuž je možné pozorovat struktury pouhým okem nebo lupou nerozlišitelné. Tendence získávat stále kvalitnější výsledky vede k neustálému zdokonalování mikroskopických technik, proto jich je v dnešní době známo již několik, lišících se většinou typem použitého zdroje záření či způsobem pozorování daného objektu.

V současné moderní medicíně, vědě a výzkumu mají mikroskopické techniky nezastupitelnou pozici. Jednou z nich je i fluorescenční mikroskopie využívající principů fluorescence ke zviditelnění objektů a dějů běžně nepozorovatelných. Fluorescence je typ luminiscenčního záření organických látek, zřídka i anorganických. Každá látka je charakterizována dvěma typy spekter – excitačním a emisním. Excitační spektrum zachycuje účinnost záření, jež způsobí excitaci atomů a přechod do vyšší energetické hladiny. Jedná se o závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitujícího záření, jež je měřena při konstantní vlnové délce fluorescence. Emisní spektrum je pak závislostí intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitačního záření. V případě deexcitace má emitované záření větší vlnovou délku než excitační záření, toto se nazývá Stokesův posun. Tohoto jevu je využíváno ve fluorescenční mikroskopii a je zobrazen na obrázku 13. [77]

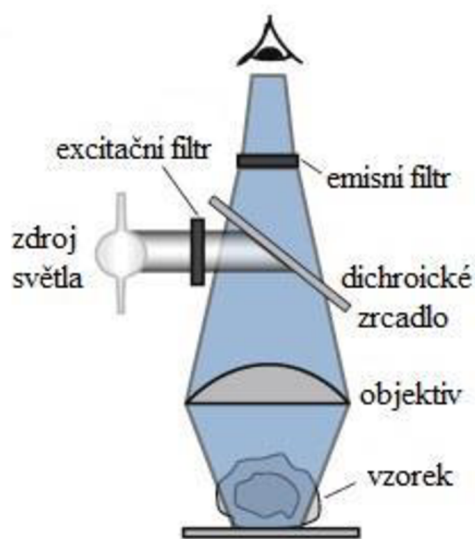


Obrázek 13: Fluorescence, excitační a emisní spektrum. [78]

Fluorescenční mikroskop je zvláštním typem optického mikroskopu, od kterého se liší zdrojem světla a detekcí pozorovaných objektů. Základní uspořádání takového

mikroskopu je patrné na obrázku 14. Zdrojem světla bývá nejčastěji vysokotlaká rtuťová výbojka, která je schopná emitovat záření o dostatečné intenzitě v oblasti blízké UV. Záření ze zdroje prochází excitačním filtrem, ten propouští světelné paprsky v intervalu vlnových délek od 356 do 546 nm. Excitační záření pak dopadá na dichroické zrcadlo, které bývá nastaveno v úhlu 45° a odráží excitační paprsky. Tyto paprsky následně procházejí objektivem a dopadají na preparát, u něhož způsobí excitaci elektronů. Při návratu elektronů do původního stavu dochází k šíření emitovaného fluorescenčního záření všemi směry. Imerzní objektiv a imerzní olej propouštějí jen některé fluorescenční paprsky, které opět dopadají na dichroické zrcadlo. Emitované světlo prochází na bariérový emisní filtr, poté do okulárů, přičemž excitační záření je z větší části odraženo. Dichroické zrcadlo odrazí více jak 90 % excitačního záření a propustí více jak 90 % emitovaného záření. Do okulárů nebo na snímací čip CCD kamery se dostane jen fluorescenční záření.

Tento způsob detekce je charakteristický pro epifluorescenční mikroskop, ve vzácnějších případech je používán transmisní fluorescenční mikroskop, kdy excitační světlo prochází preparátem. [77]



Obrázek 14: Schéma snímání u epifluorescenčního mikroskopu. [79]

2.8.1 Fluorescenční barviva

Fluorescenční barviva neboli fluorofory či fluorochromy jsou chemické sloučeniny. Ve své molekule obsahují reaktivní skupinu schopnou reagovat s nukleofilními skupinami (NH_2 , OH , SH). Obecně je možné fluorofory rozdělit na dvě skupiny, vnitřní (vlastní, intrinsic) a vnější (nevlastní, extrinsic), přičemž se mnohem častěji využívají fluorofory vnější.

Vnější fluorofory se přidávají ke studovanému vzorku a podle typu vazby se dělí na fluorescenční značky a fluorescenční sondy. Vnější fluorofory je možné dále rozdělit do

dvou skupin podle kvantového výtěžku fluorescence. První skupinu tvoří barviva, jejichž kvantový výtěžek se po přidání ke studovanému vzorku nemění. Do druhé skupiny jsou zařazeny látky, kde kvantový výtěžek závisí na bezprostředním okolí fluoroforu.

Fluorescenční značky se nejčastěji používají ke značení proteinů, se kterými vytvoří kovalentní vazbu. Nejznámějšími značkami jsou látky FITC (fluorescein-5-isothiokyanát, zelený fluorofor) a FRITC (tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát). Nevýhodou látky FITC je, že jeho citlivost je velmi ovlivňována hodnotou pH. Další nevýhodou všech derivátů fluoresceinu je jejich snadná fotodestrukce.

Fluorescenční sondy se váží ke studované látce nekovalentní vazbou a velice často při tom mění své fluorescenční vlastnosti. Tento typ fluoroforů se používá ke studiu změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, potenciálu apod. Nejvíce používanou sondou pro vizualizaci jaderné DNA je DAPI (modrý fluorofor), chemicky se jedná o 4',6-diamidino-2-fenylindol. Dalším často používaným fluoroforem je akridinová oranž, jejíž absorpční a emisní spektra se liší v závislosti na vazbě k DNA nebo RNA. [77]

2.8.2 Barviva použitá v praktické části práce

- BODIPY C11 (581/591)

Jedná se o fluorescenční sondu pro sledování lipidové peroxidace a účinků antioxidantů na modelech membránových systémů a na živých buňkách. Sonda je často používána z důvodu svých vynikajících vlastností, jako jsou: i) emise ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra, s dobrým oddělením neoxidovaných a oxidovaných forem, ii) vysoký kvantový výtěžek, který zajišťuje nízkou odchylku a příznivý poměr signál/šum, iii) dobrá fotostabilita, díky které nevzniká mnoho fluorescenčních artefaktů, iv) nízká citlivost na změnu prostředí, například pH nebo polarita rozpouštědla. Další charakteristickou vlastností je posun píku emisního spektra z 590 nm až na 510 nm, což odpovídá zelené barvě.

- Dihydrorhodamin 123 (DHR)

DHR je bez náboje a sám o sobě není schopen fluorescence. Jedná se o ukazatele reaktivních forem kyslíku, který má schopnost pasivně difundovat přes membránu. *In vitro* pak dochází k oxidaci na vysoce fluorescenční rhodamin 123, který se nachází v mitochondriích. Formování rhodaminu je možné sledovat při excitačních a emisních vlnových délkách odpovídajícím 500 a 536 nm.

- Monochlorobiman (mBCI)

mBCI je ve své podstatě nefluorescenční, až do té doby než se nachází v konjugovaném stavu. Je schopný snadno reagovat s některými nízkomolekulárními thioley, včetně glutathionu, N-acetylcysteinu, merkaptopurinu a jiných peptidů. Emisní

maximum glutathionu konjugovaného s mBCI se nachází v oblasti modrého světla (absorpční/emisní vlnové délky: 394/490 nm).

- Rhodamin 123

Rhodamin je zelené permeabilní fluorescenční barvivo, které lze snadno izolovat z aktivních mitochondrií. Barvivo rovněž neprojevuje jakékoliv známky cytotoxicity. Tento produkt se běžně používá k testování mitochondriálního membránového potenciálu v populacích apoptických buněk.

3 Cíle práce

Cílem semestrální práce je zjistit vliv přírodních látek v aplikaci na prostatické nádorové a nenádorové buněčné linie. Pomocí cytotoxických testů (MTT test a systém xCELLigence) a pomocí fluorescenční mikroskopie bude sledována biologická aktivita testované látky a změny na buněčné a jaderné úrovni.

V praktické části budou proto provedeny experimenty, které budou sledovat stav a chování buněk u buněčných linií v závislosti na testované látce. Testovanou látkou je alkaloid vyskytující se v chilli papričkách – kapsaicin, jež je zodpovědný za pálivou chuť paprik. U dané látky se předpokládá cytotoxický mechanismus působení a tím snížení životaschopnosti sledovaných buněk.

Cílem práce je ověřit teoretické předpoklady mechanismu působení přírodních látek na lidské buněčné linie a podat ucelený soubor informací o cytotoxicitě zvolené testované látky. Tomuto bude rovněž sloužit analýza snímků v programovém prostředí MATLAB, jejímž výsledkem bude stanovení emise záření sledovaných buněk.

4 Experimentální protokol

4.1 Materiál

Analýza cytotoxicity kapsaicinu se provede na dvou prostatických liniích. PC-3 je nádorová buněčná linie odvozená z adenokarcinomu 4. stupně, tyto buňky mají vysoký potenciál metastazovat. Jako referenční linie pro srovnání se použije nenádorová linie PNT1A odvozená z lidských prostatických epitelálních buněk.

Pro kultivaci linie PC-3 se použije kultivační médium Ham's F-12 se 7 % obsahem fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % antibiotiky. Linie PNT1A se nechá kultivovat s médiem RPMI 1640 s indikátorem. Kultivační médium navíc obsahuje 10 % FBS a 1 % antibiotika. Antibiotika se do médií přidávají z důvodu zamezení infekce.

Dále se použijí promývací činidla ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) a fosfátový pufr s chloridem sodným (PBS). Dále také trypsin, dimethylsulfoxid (DMSO), methiltetrazoliová sůl (MTT), glycinový pufr a ethanol (EtOH).

Pro mikroskopické pozorování buněk se použijí fluorescenční barviva: BODIPY C11, dihydrorhodamin 123 (DHR) a monochlorobiman (mBCI).

4.2 Kultivace buněk

Nádorové buněčné linie se běžně uchovávají v zamrazeném stavu v kryozkumavkách, rozmrazení probíhá při běžné laboratorní teplotě. K rozmraženým nádorovým liniím se přidají 4 ml příslušného kultivačního média, takto vzniklý roztok se nechá centrifugovat po dobu 7 minut při 2 700 otáčkách a 4°C. Následně se odsaje supernatant a pelet buněk se naředí s 2 ml kultivačního média.

Takto předpřipravená suspenze buněk se napipetuje do kultivačních nádob o velikosti 75 ml společně s 6 ml kultivačního média. Kultivace buněčných linií bude probíhat v inkubátorech při teplotě 37°C. Až bude dosaženo přibližně 90 % pokrytí dna vznikajícími buňkami, dojde k pasážování. Z kultivačních nádob se odsaje kultivační médium a přidají se 3 ml promývacích činidel EDTA a PBS. Promývací činidla se následně odsají a přidají se 3 ml trypsinu pro uvolnění vazby mezi buňkami a dnem nádoby. Po odsátí trypsinu se kultivační nádoby umístí opět do inkubátoru na dobu 3 minut. Pomocí kultivačního média se pak nechají buňky spláchnout, přepipetují se do centrifugační zkumavky a nechají se opět centrifugovat po dobu 7 minut při 2 700 otáčkách a 4°C. Odsaje se vzniklý supernatant, naředí se s 2 ml kultivačního média a buňky se nechají znovu kultivovat stejným způsobem.

Kultivační médium bude měněno podle potřeby, předpokládá se přibližně 2-3x do týdne. Pasážování buněk bude také provedeno podle potřeby, přičemž se odhaduje tak jednou týdně. Pro použití v experimentech je potřeba buňky sklídit, používá se stejný

postup jako při pasážování. Suspenze buněk se pak umístí do Bürkerovy komůrky a spočítá se počet buněk. Vzniklá suspenze se podle požadavků na počet buněk rozředí s kultivačním médiem. Takto připravené buněčné médium se použije jak pro analýzu buněk pomocí MTT testu a systému xCELLigence, tak pro analýzu buněk fluorescenční mikroskopii.

4.3 Metody

4.3.1 MTT test

Pro MTT test se použije 96 – jamková destička. Destička je tvořena osmi řadami (A – H) a dvanácti sloupci. Testovaná látka se na destičku umístí po řádcích, přičemž jeden řádek pro jednu látku. Sloupce jsou vymezeny pro koncentrační posloupnost testované látky, přičemž ve sloupci 2 bude koncentrace nulová a ve sloupci 11 nejvyšší.

Do jamek sloupce 1 a 12 se přidá 200 μ l příslušného kultivačního média bez buněk. Do jamek zbylých sloupců (2 – 11) se přidá 200 μ l buněčné suspenze s napočítaným počtem buněk na jamku, který bude experimentálně stanoven. MTT destička se poté umístí do inkubátoru a buňky se nechají kultivovat 1 – 2 dny.

Po kultivaci se do jamek sloupců 2 – 11 přidá testovaná látka o určitých koncentracích a buňky se nechají znovu kultivovat 1 – 2 dny. Poté se do jamek sloupců 1 – 11 přidá čerstvé médium a 50 μ l MTT. Destička se následně zabalí do alobalu a nechá se inkubovat v inkubátoru po dobu 4 hodin. Po inkubaci se odsaje obsah jamek sloupců 1 – 11 a poté se do těchto jamek přidá 200 μ l detergentu DMSO a 25 μ l glycinového pufru a obsah se důkladně promíchá. Tento test se provede dvakrát s tím rozdílem, že v druhém pokusu se v konečné fázi místo rozpouštědla DMSO přidá ethanol. Pomocí přístroje Elisa reader se nakonec změří absorbance při vlnové délce 595 nm.

4.3.2 xCELLigence

Nejdříve se provedou experimenty pro optimalizaci nejvhodnějšího počtu buněk na jamku. Ten bude stanoven na základě růstové křivky dané buněčné linie.

Samotné experimenty se provedou jak na 16 – jamkových, tak 96 – jamkových E-destičkách. Každá destička je tvořena celkem osmi řadami (A – H), sloupce jsou vymezeny pro testovanou látku. Do řady A se přidá pouze kultivační médium bez buněk. Do jamek zbylých řad se přidá suspenze buněk. Počínaje řadou B se vytvoří koncentrační řada testované látky, přičemž v řadě B bude koncentrace nulová.

Do všech jamek na E-destičce se přidá 100 μ l kultivačního média a zahájí se test pro kontrolu funkčnosti elektrod v jamkách. Poté se do všech jamek řad B – H přidá 100 μ l buněčné suspenze s napočítaným počtem buněk na jamku. Buňky se pak nechají kultivovat 1 – 2 dny, aby bylo dosaženo požadovaného buněčného indexu. Po kultivaci se do jamek

sloupců od řady B – H přidá testovaná látka o určitých koncentracích, přičemž v řadě B je koncentrace nulová a v řadě H nejvyšší.

Destička se nakonec vloží do řídicí stanice a zahájí se experiment. Vliv testované látky bude sledován zhruba 2 – 3 dny. Výsledkem bude křivka buněčného indexu závislá na čase a vlivu testované látky.

4.3.3 Fluorescenční mikroskopie

Buňky se nejdříve opláchnou čerstvým médiem. Poté se nechají v temnu kultivovat po dobu jedné hodiny s médiem obsahujícím fluorescenční barviva. Barviva se do média přidají v různých koncentracích. Pro BODIPY C11 to je koncentrace 50 μM , pro dihydrorhodamin 123 taktéž 50 μM , a nakonec pro monochlorobiman 25 μM .

Po kultivaci se buňky třikrát opláchnou promývacím činidlem PBS. K pozorování se použije fluorescenční mikroskop Axioskop 40 (Zeiss, Německo) za použití širokopásmové excitace a sady příslušných emisních filtrů.

4.4 Sledované parametry

Výsledkem MTT testu bude absorbance, která je přímo úměrná životaschopnosti buněk v závislosti na vlivu testované látky. Čím více přeživších buněk, tím tmavší barva a tím vyšší absorbance. Předpokládá se cytotoxicita testované látky u buněčných linií a tím nižší absorbance.

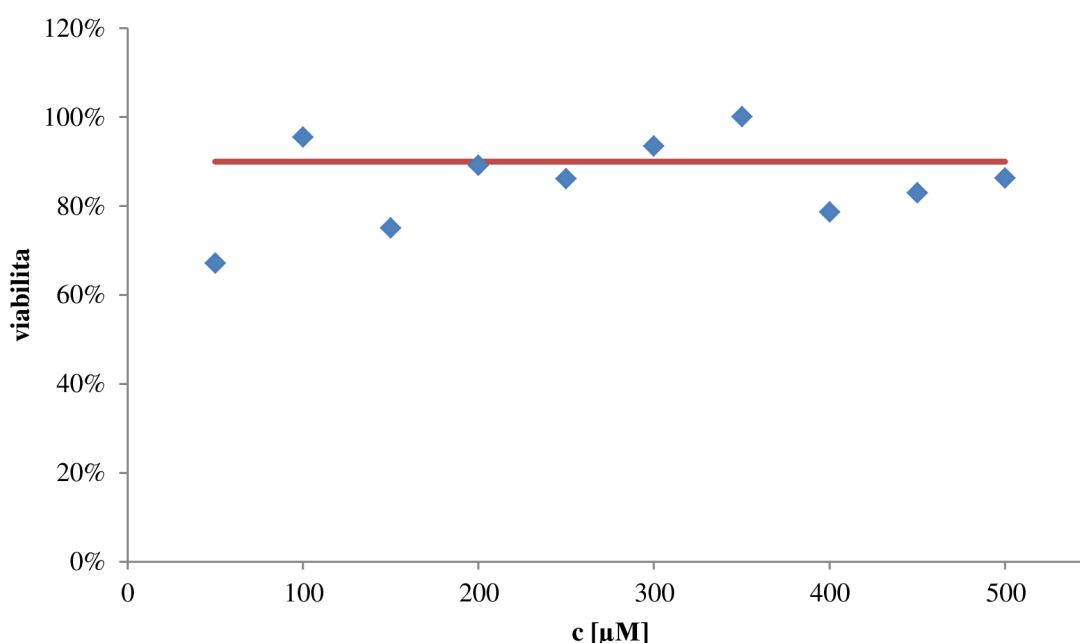
U analýz pomocí systému xCELLigence je výsledkem graf buněčného indexu. Z počátku se předpokládají rostoucí hodnoty buněčného indexu, což by souviselo s buněčnou proliferací a diferenciací. Po přidání testované látky se však očekává pokles hodnot buněčného indexu, z důvodu předpokladu cytotoxického působení testované látky na buněčné linie.

Pomocí fluorescenční mikroskopie budou sledovány jednotlivé buňky, především jejich morfologický stav při zvyšující se koncentraci testované látky. Předmětem zájmu budou změny na buněčné a jaderné úrovni. Přičemž se taktéž předpokládá pokles viability a růstu analyzovaných buněk. U výsledných snímků bude provedena segmentace buněk a vyhodnocení emise záření.

5 Výsledky a diskuze

5.1 MTT test

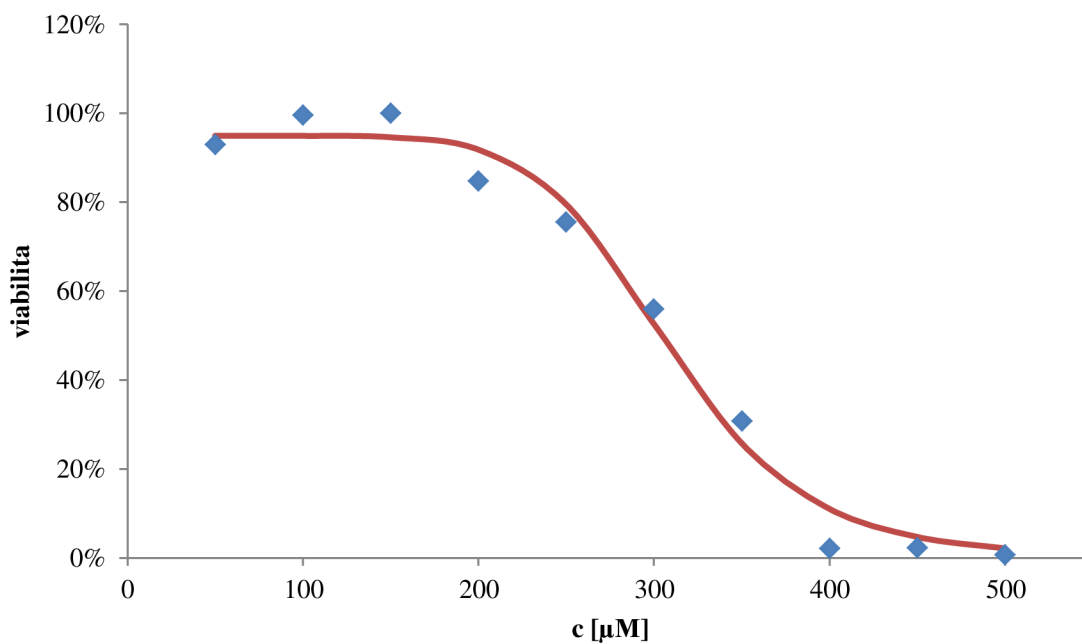
Jelikož jsou látky špatně rozpustné ve vodě, je nutné k buněčnému médiu přidávat detergenty. Před samotným testováním vlivu kapsaicinu na růst buněk byly tedy provedeny testy pro určení vlivu samotného rozpouštědla, aby bylo možné vyloučit případné nesrovnalosti. V experimentu byly použity dva typy detergentů, jedním z nich byl DMSO a druhým ethanol. Ethanol se projevil jako vhodnější rozpouštěcí činidlo, které nemá zásadní vliv na buňky. Toto je patrné na grafu 1.



Graf 1: Vliv detergentu (EtOH) na viabilitu buněk. Buněčná linie PC-3.

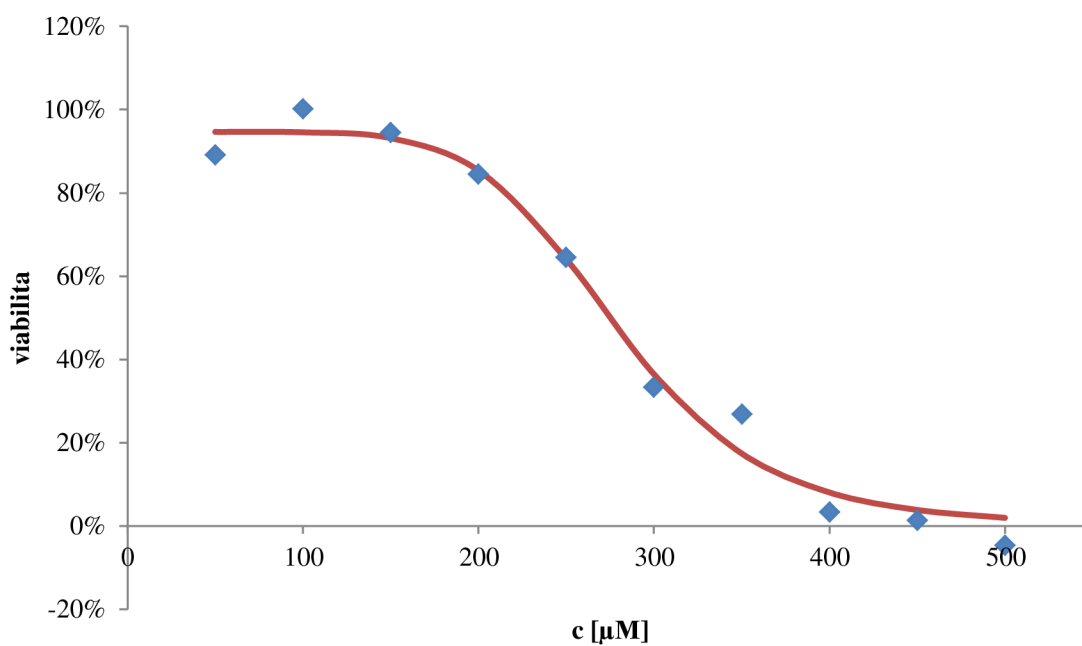
Buněčné médium obou linií bylo vystaveno působení kapsaicinu v rozmezí koncentrací od 50 – 500 μM . Naměřené hodnoty absorbancí pro jednotlivé koncentrace kapsaicinu byly přepočítány na procentuální hodnotu udávající množství živých buněk (viabilita). Získané hodnoty byly vyneseny do grafů a byly proloženy sigmoideální „dose-response“ křivkou, ze které byla vypočtena inhibiční koncentrace kapsaicinu. Inhibiční koncentrace udává hodnotu, při které dojde k usmrcení 50 % buněk, přičemž platí, že čím nižší koncentrace, tím je látka toxičtější.

Graf 2 znázorňuje vliv zvyšující se koncentrace kapsaicinu na nenádorovou buněčnou linii PNT1A, graf 3 je pro linii nádorovou PC-3. Průběhy snižování životaschopnosti buněk jsou u obou linií podobného charakteru. Pro srovnání slouží i hodnoty inhibiční koncentrace.



Graf 2: Vliv kapsaicinu na buněčnou linii PNT1A.

Inhibiční koncentrace kapsaicinu u buněčné linie PNT1A byla stanovena jako:
 $IC_{50} = 308,5 \mu M$.



Graf 3: Vliv kapsaicinu na buněčnou linii PC-3.

Inhibiční koncentrace pro linii PC-3:
 $IC_{50} = 279,6 \mu M$.

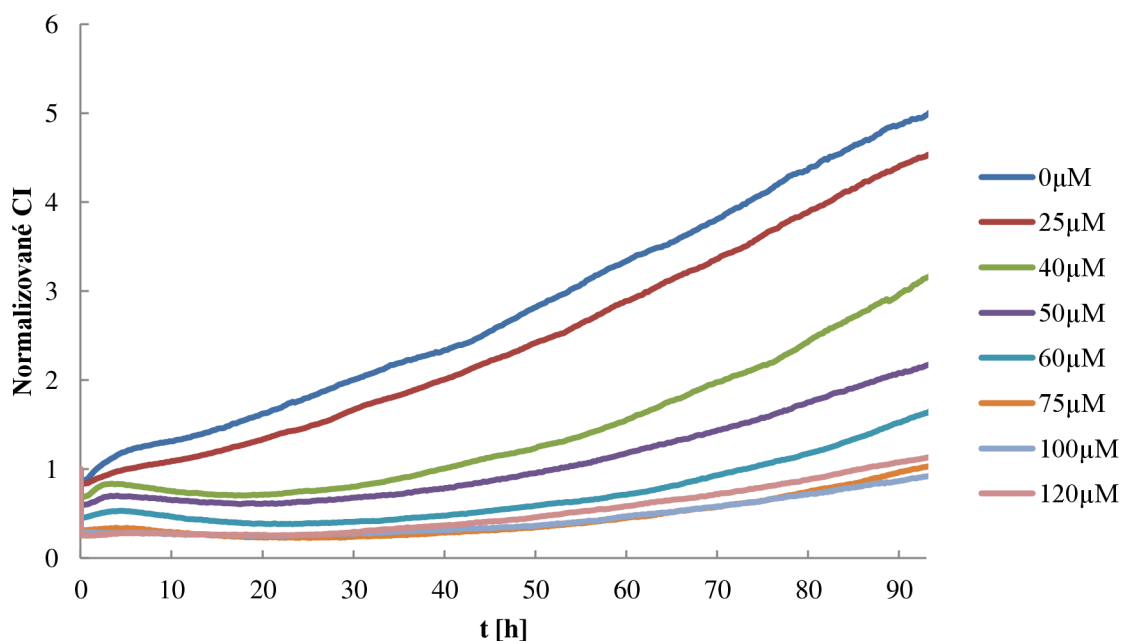
U obou grafů je patrné, že se zvyšující se koncentrací kapsaicinu, dochází ke snižování viability buněk postupně vedoucí k usmrcení. Kapsaicin působí u obou linií cytotoxicky, přičemž u nádorové linie PC-3 je cytotoxický vliv mírně větší a dochází rychleji ke snižování životaschopnosti. Toto je zřejmé i z hodnot inhibiční koncentrace, která je u nádorové linie PC-3 nižší než u nenádorové linie PNT1A.

Rozdíl v působení kapsaicinu na obě linie není z tohoto testu příliš zřejmý, protože se jedná o end-point metodu, kdy je možné hodnotit až konečný výsledek. Měření v reálném čase pomocí systému xCELLigence poskytlo fyziologicky relevantnější výsledky, odpovídající skutečnému stavu buněk před a po přidání kapsaicinu.

5.2 xCELLigence

Výsledkem analýzy v reálném čase je graf znázorňující hodnotu buněčného indexu v závislosti na čase, přičemž buněčný index reprezentuje skutečnou viabilitu buněk. Buňky byly sledovány po dobu 96 hodin, u obou buněčných linií byla vypočtena inhibiční koncentrace kapsaicinu.

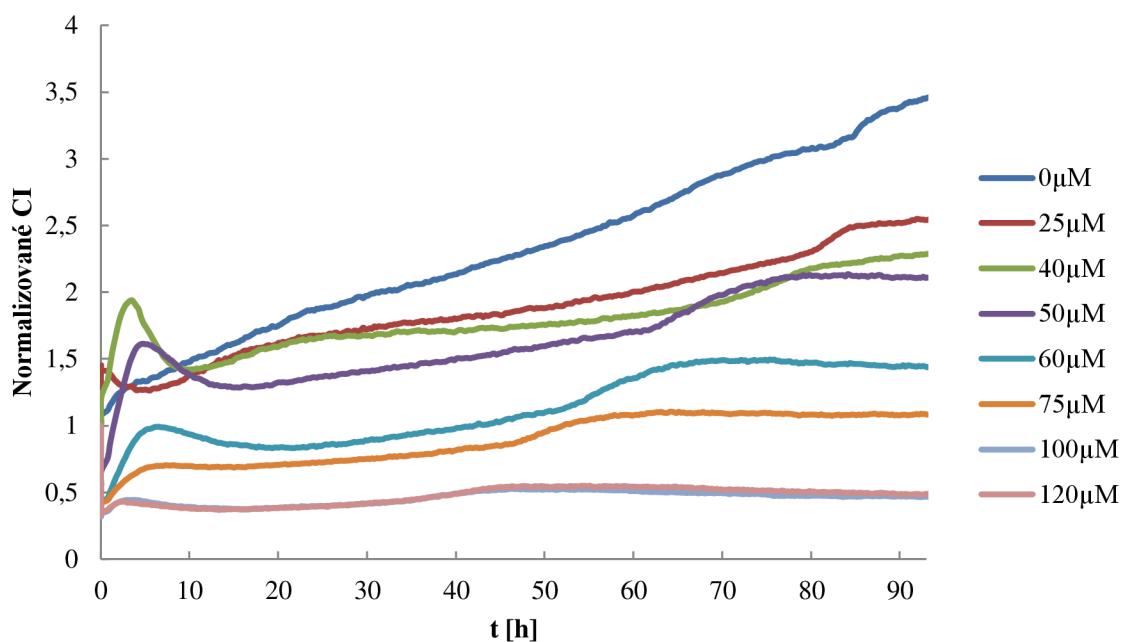
Graf 4 ukazuje vliv kapsaicinu na nenádorovou buněčnou linii PNT1A, zatímco graf 5 nádorovou buněčnou linii PC-3. Při porovnání obou grafů je možné zaznamenat určité změny ve viabilitě a proliferaci buněk.



Graf 4: Kapsaicin (PNT1A).

Inhibiční koncentrace kapsaicinu pro buněčnou linii PNT1A, při které dojde k usmrcení 50 % buněk, byla stanovena jako:

$$IC_{50} = 7,87 \times 10^{-4} \text{ M} = 78,7 \text{ } \mu\text{M}.$$



Graf 5: Kapsaicin (PC-3).

Inhibiční koncentrace kapsaicinu pro buněčnou linii PC-3:

$$IC_{50} = 4,23 \times 10^{-4} \text{ M} = 42,3 \text{ } \mu\text{M}.$$

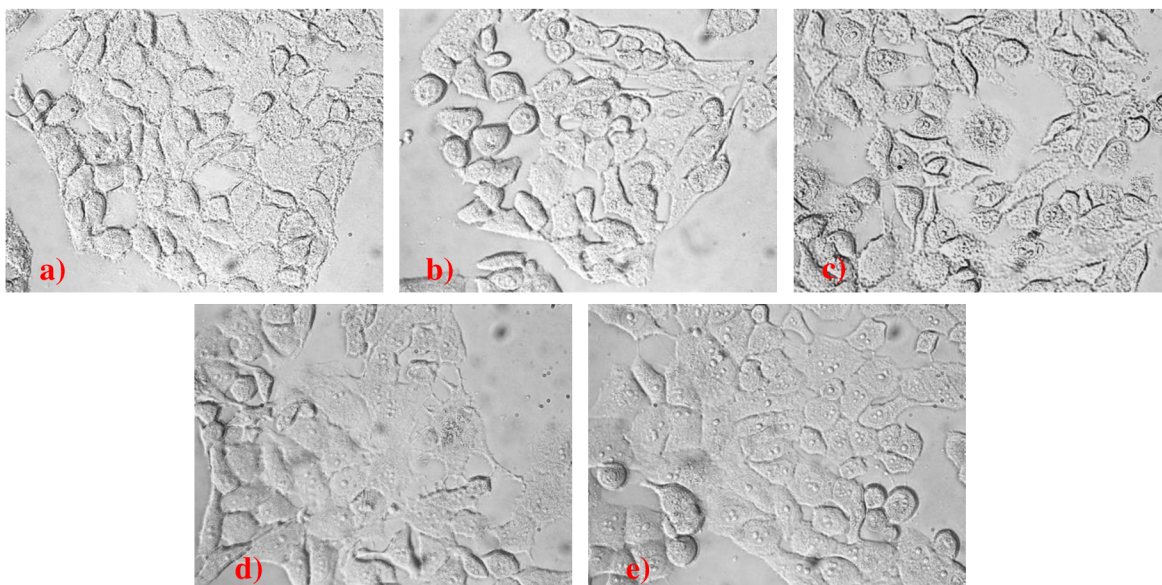
Jak již bylo zmíněno, nebylo dokázáno cytotoxické působení kapsaicinu na zdravé buňky, což potvrzuje graf 4. Z postupně rostoucích hodnot buněčného indexu u linie PNT1A je patrné, že nedochází k usmrcení buněk, naopak buňky jsou schopny dalšího růstu. Ve vyšších koncentracích, přibližně od hodnoty 75 μM a výše, je však proliferace buněk pomalejší. I přesto nedochází k výraznému cytotoxickému působení kapsaicinu na buňky nenádorové linie.

Na druhém grafu, který popisuje chování buněčné linie PC-3 je možné na začátku experimentu zaznamenat rychlý nárůst a poté postupné klesání hodnot buněčného indexu, přičemž nulová koncentrace slouží jako kontrola. Tento jev může být způsobený změnou morfologie buněk v závislosti na působení kapsaicinu. Buňky mohou do šířky zvětšovat svůj tvar a pokrýt větší plochu dna jamek, kde jsou umístěny zlaté elektrody. Tím se zvyšuje impedance, která je převedena na buněčný index. Toto však vyžaduje další zkoumání, především mikroskopické, aby bylo možné hypotézu potvrdit či vyvrátit. U vyšších koncentrací tento počáteční nárůst není patrný, buněčný index stagnuje kolem hodnot 0,5 – 1. Je možné konstatovat, že kapsaicin působí na nádorové buňky cytotoxicky, především ve vyšších koncentracích.

5.3 Fluorescenční mikroskopie

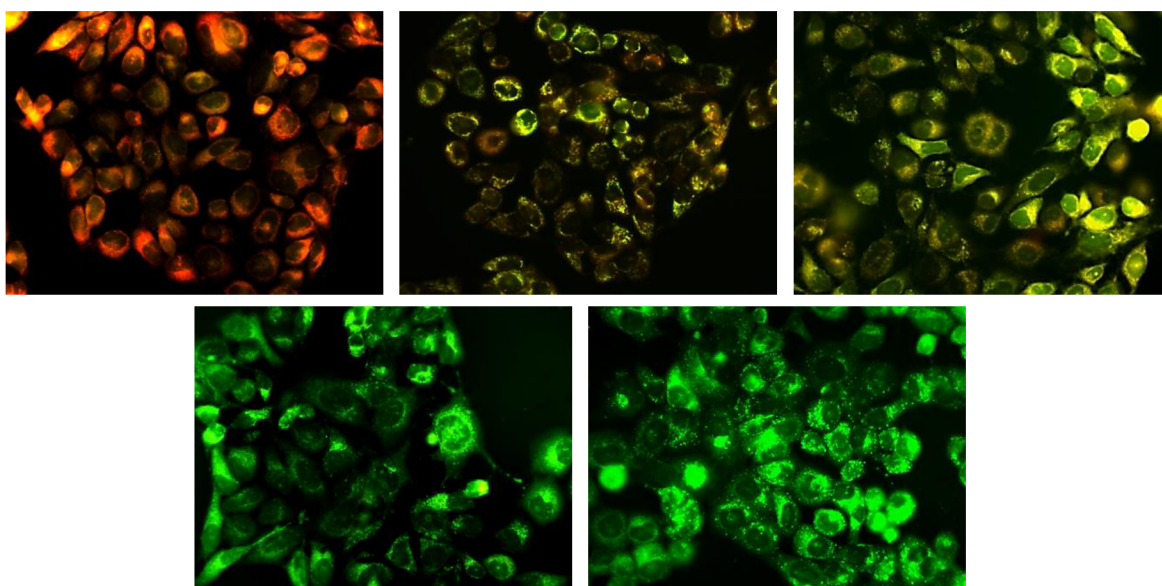
Buněčné linie byly vystaveny působení kapsaicinu v rozmezí koncentrací kapsaicinu od 0 – 100 μM s krokem 25 μM . Pro jednotlivé koncentrace byly nejdříve zhotoveny snímky z fázového kontrastu a poté pro tři různé typy barvení, kdy každé barvení reprezentovalo jiný biologický proces. V zelené oblasti spektra byla sledována lipidová peroxidace, v modré oblasti produkce thiolů a nakonec v červené oblasti byla sledována produkce reaktivních forem kyslíku.

5.3.1 Buněčná linie PNT1A

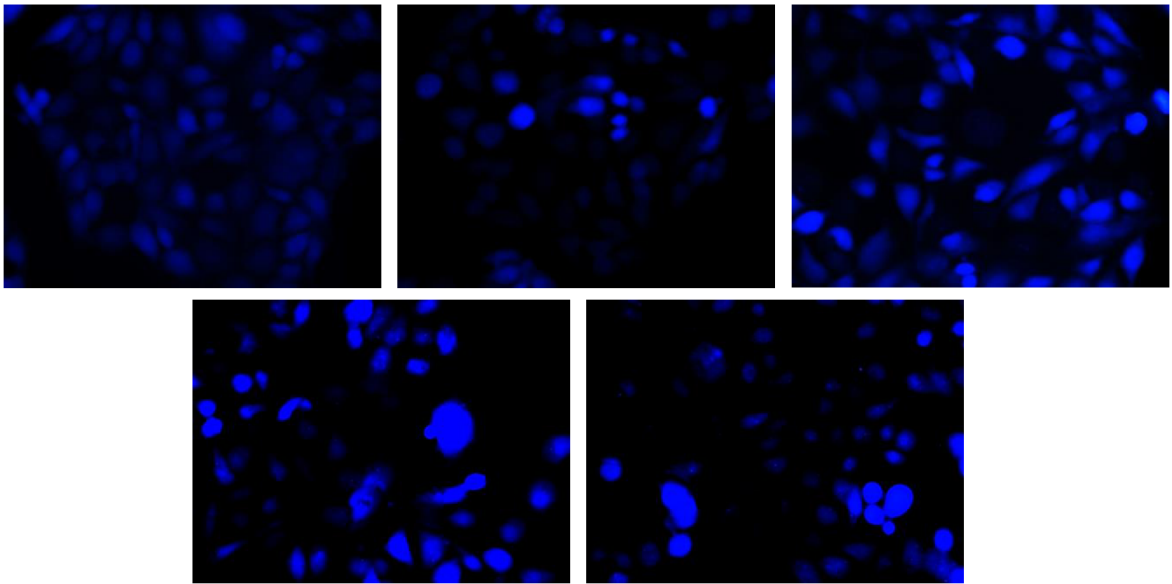


Obrázek 15: Snímky z fázového kontrastu při různých koncentracích kapsaicinu.

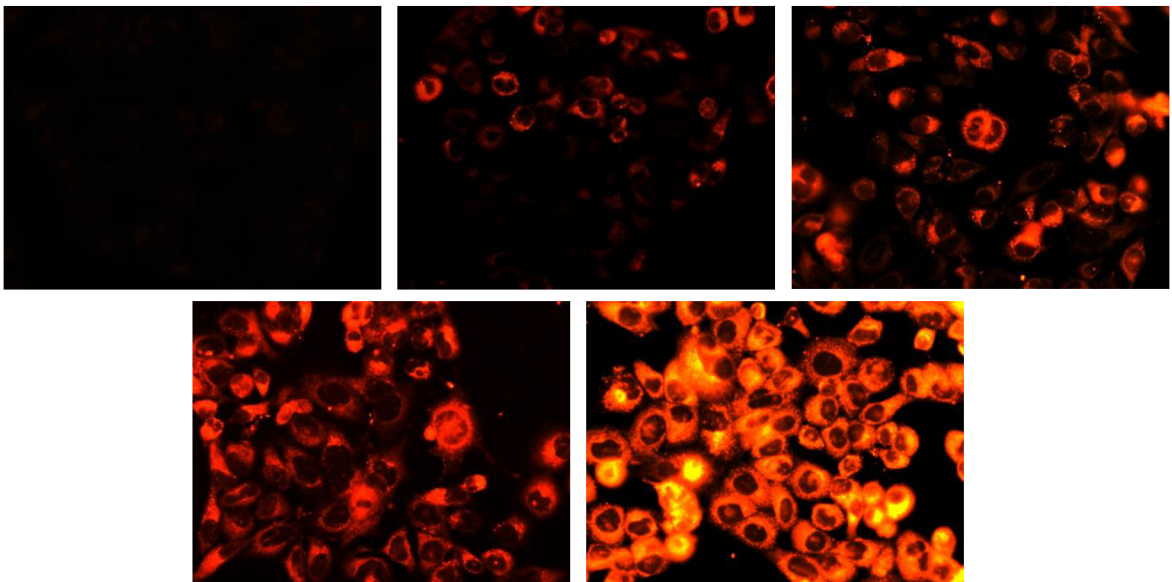
a) 0 μM , b) 25 μM , c) 50 μM , d) 75 μM , e) 100 μM



Obrázek 16: Lipidová peroxidace.

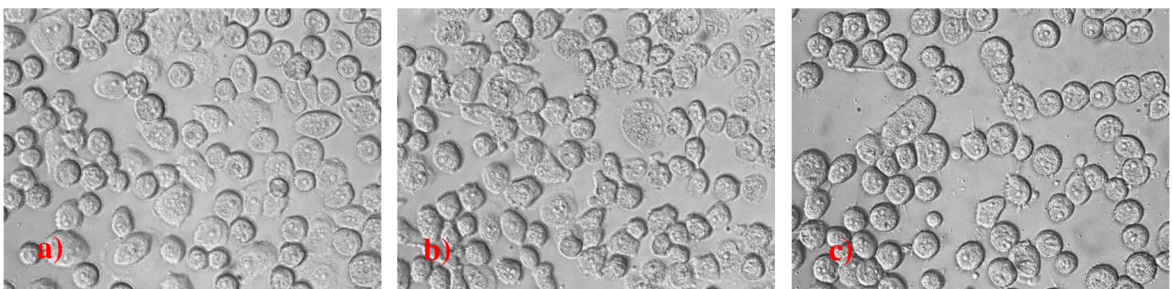


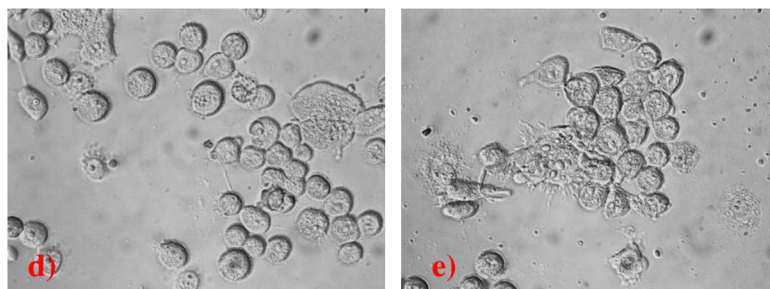
Obrázek 17: Produkce thiolů.



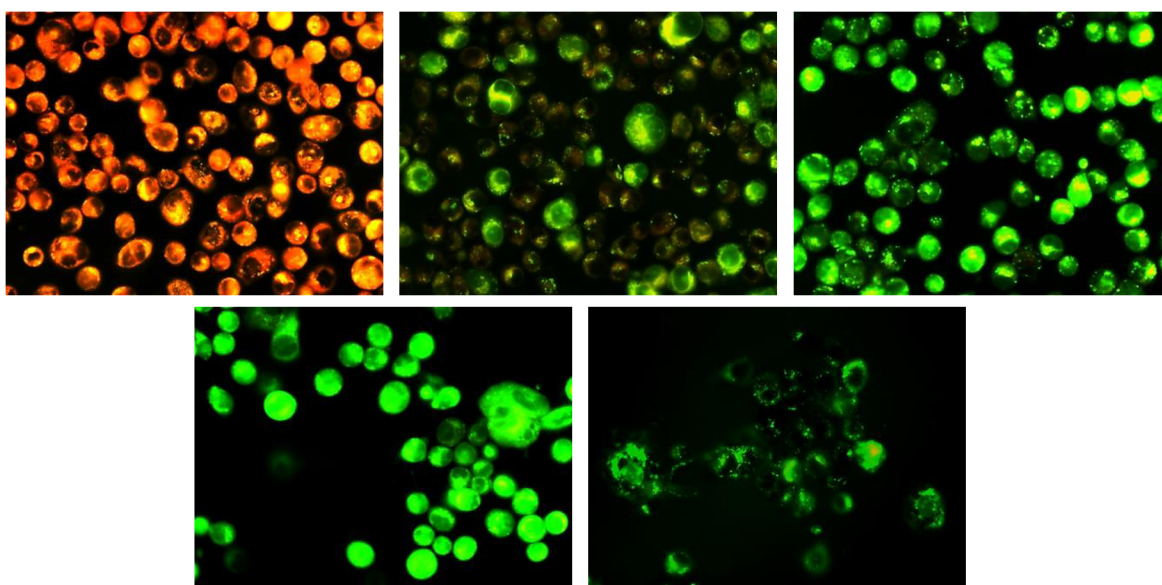
Obrázek 18: Produkce reaktivních forem kyslíku.

5.3.2 Buněčná linie PC-3

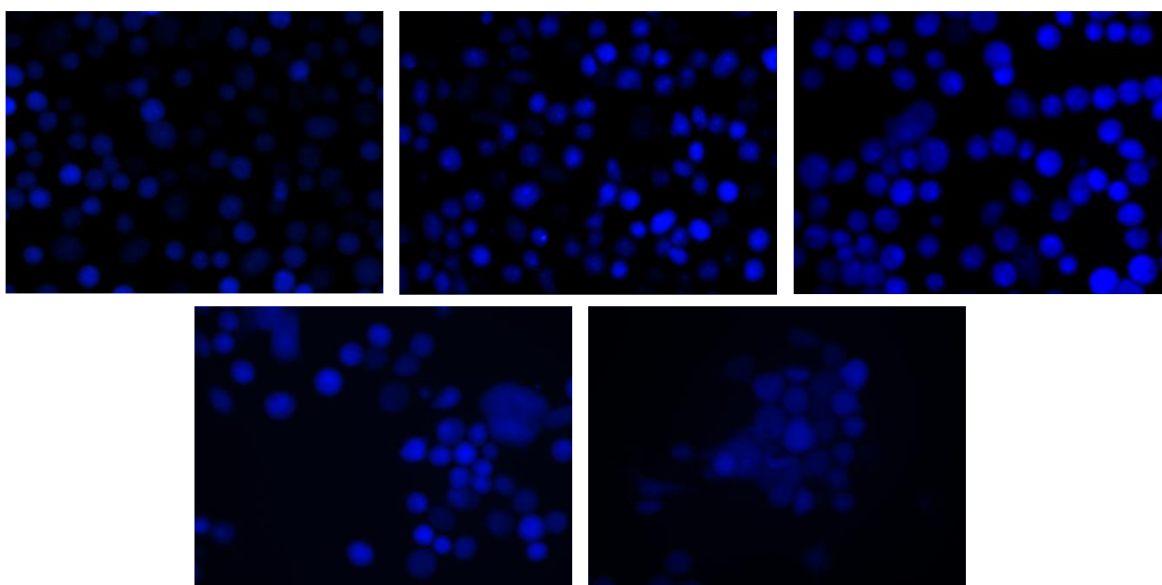




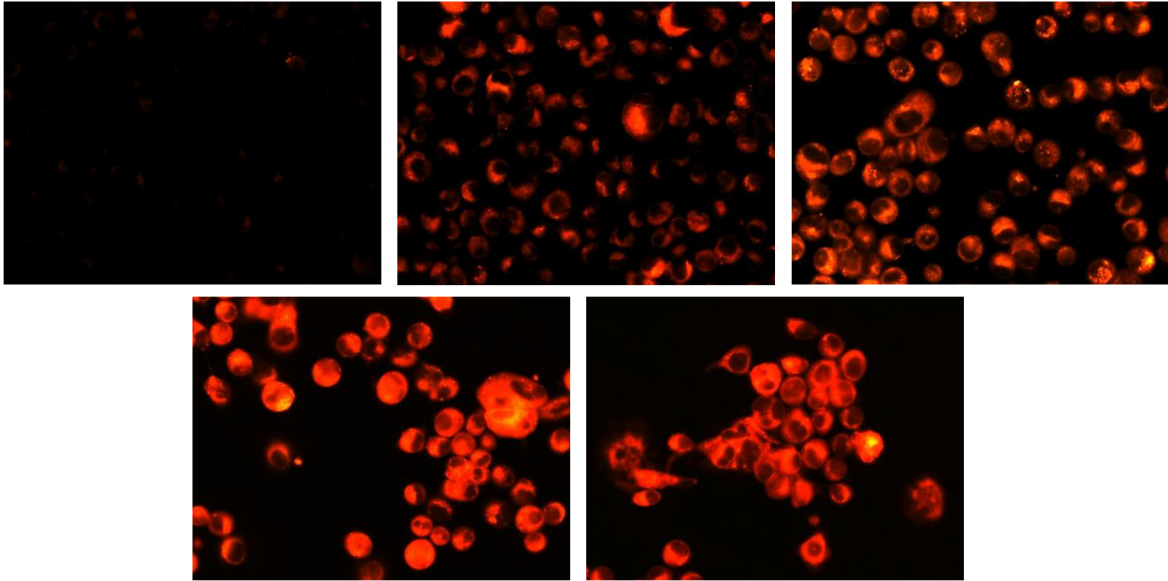
Obrázek 19: Snímky z fázového kontrastu při různých koncentracích kapsaicinu.
 a) 0 μM , b) 25 μM , c) 50 μM , d) 75 μM , e) 100 μM



Obrázek 20: Lipidová peroxidace.



Obrázek 21: Produkce thiolů.

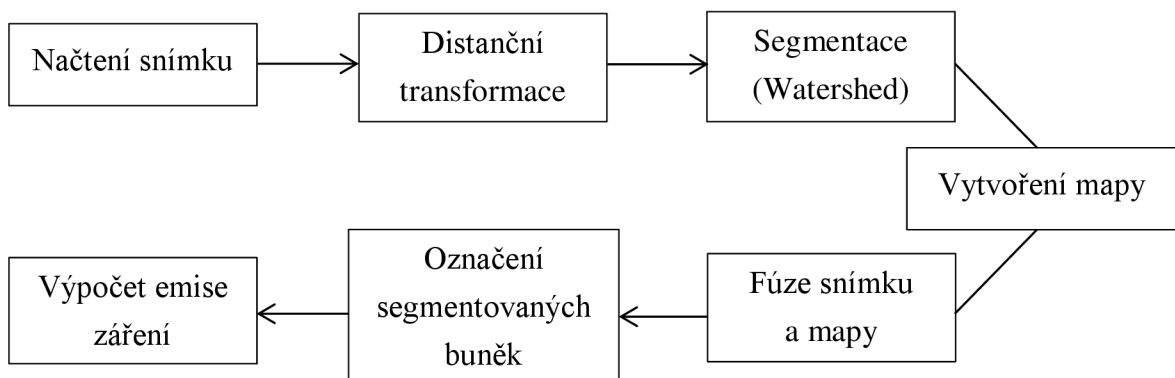


Obrázek 22: Produkce reaktivních forem kyslíku.

5.4 Analýza obrazu v MATLABu

Cílem analýzy obrazu bylo vytvoření algoritmu pro segmentaci buněk, vytvoření mapy pro detekci hran jednotlivých buněk a vyhodnocení emise záření. K tomuto měly být použity snímky z fázového kontrastu (viz Obrázek 15 a Obrázek 19). Tyto snímky jsou však pro segmentaci nevhodné, buňky nejsou dobře oddělené a při segmentaci vznikaly artefakty, například dvojité hrany nebo detekce jen půlky hrany. Dalším problémem byla vnitřní struktura buněk, která způsobovala detekci falešných buněk, a nebylo možné tuto strukturu ze snímků odstranit. Z těchto důvodů byly pro segmentaci použity snímky, kde jsou buňky nabarveny, přičemž byly vybírány snímky s nejvyšším kontrastem.

Na obrázku 23 je znázorněno blokové schéma vytvořeného algoritmu. Algoritmus byl vytvořen v programovém prostředí MATLAB, verze R2012b, kdy byly především použity funkce a postupy obsažené v knihovně pro analýzu obrazu (*Image Processing Toolbox*).



Obrázek 23: Blokové schéma algoritmu pro analýzu snímků.

Analyzované snímky jsou po načtení převedeny na obraz reprezentovaný odstíny šedi, tak aby došlo k váhování jednotlivých RGB složek (*R-red, G-green, B-blue*). Díky tomuto je výsledná emise záření dána pouze jednou hodnotou, která zastupuje všechny složky stejnou mírou. Stěžejní částí algoritmu je konvoluce snímku pro vyhlazení, prahování a převedení na binární obraz, distanční transformace, segmentace metodou povodí a vytvoření mapy. Toto je znázorněno níže na úryvku algoritmu.

```

obr=(imread([kam title]));           % načtení snímku v GUI
obr(:, :, 4)=[];                    % odstranění 4. složky snímku (průhlednost)

% převedení na šedotónový obraz, váhování jednotlivých složek RGB
obr = rgb2gray(obr);
obr = rgb2gray(obr);

% konvoluce pro vyhlazení
obr = conv2(obr, ones(vel_maska) ./ (vel_maska.^2), 'same');

% vytvoření prázdné binární matice
bw=zeros(size(obr));

% prahování (binární obraz)
bw(obr>=prah*255)=1;

% distanční transformace pro objekty binárního obrazu
D = bwdist(~bw, metoda{met}); % výpočet vzdáleností
D = -D;                        % doplnění distanční transformace
D(~bw) = -Inf;                % pixely nepatřící do objektů jsou nahrazeny
nekonečnem (pro Watershed)

% segmentace metodou povodí
L = watershed(D, 8);

% přeuložení výsledku pro další zpracování
l = L;

l(L>0)=1;                       % vytvoření binárního obrazu, kde jsou
viditelné pouze hranice
imshow(~l, []);                  % vytvoření mapy, negace na černý obraz s
bíлыми hranicemi

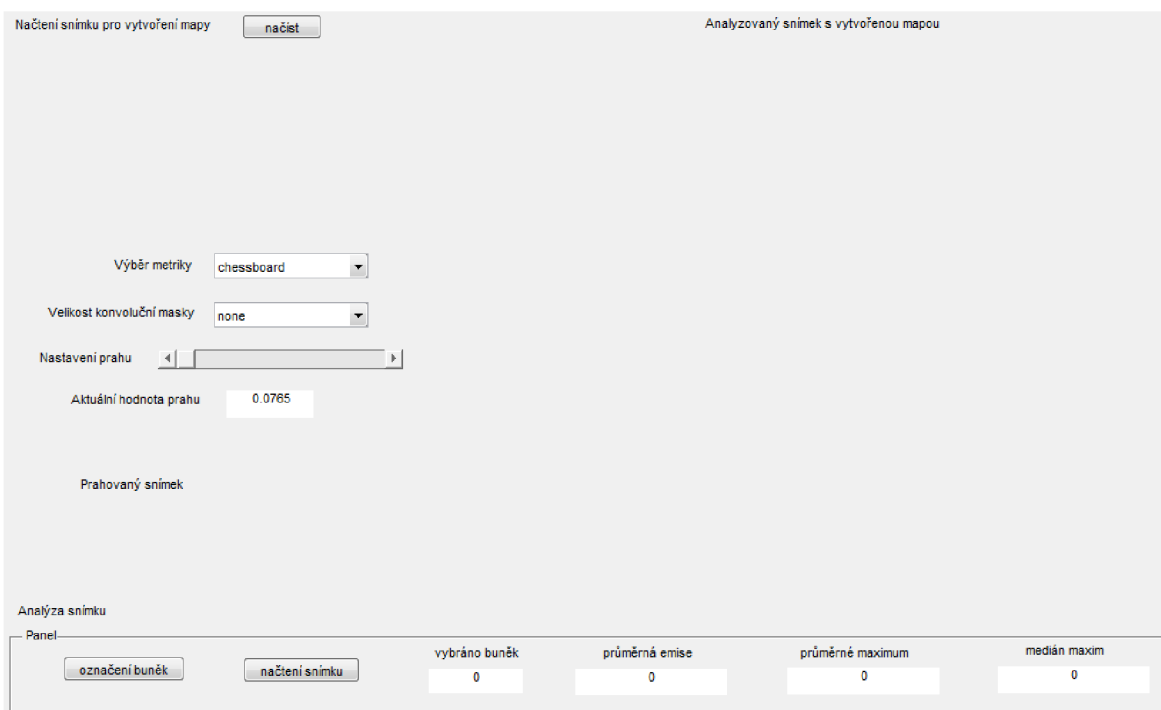
```

Výstupem segmentační metody povodí je matice hodnot, kdy každý objekt binárního obrazu má přiřazené číslo. Jednotlivé pixely daného objektu mají stejnou celočíselnou hodnotu, přičemž nula reprezentuje hranice mezi těmito oblastmi. Negovaný binární obraz pak tvoří mapu, která byla použita pro fúzi s analyzovaným snímek.

Při fúzi mapy a analyzovaného snímku byla použita průhlednost 0,5. Vhodně segmentované buňky byly poté označeny a byla spočítána emise záření pro jednotlivé koncentrace kapsaicinu a druhy barvení.

5.4.1 Grafické rozhraní GUI

Algoritmus pro analýzu snímků byl realizován v grafickém rozhraní GUI, tak aby práce se snímky byla uživatelsky co nejjednodušší. Na obrázku 24 je ukázáno grafické GUI při spuštění algoritmu.



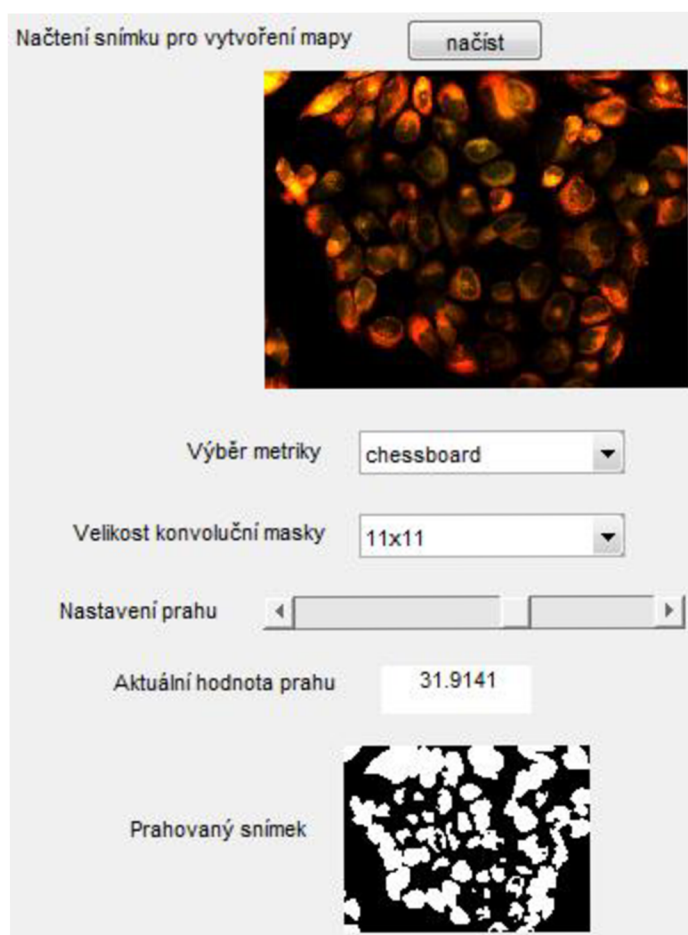
Obrázek 24: Grafické rozhraní pro analýzu snímků.

V grafickém rozhraní je na výběr několik parametrů ovlivňujících segmentaci a to z důvodu dosažení co nejoptimálnějších výsledků. Jedním z parametrů je volba metriky pro výpočet vzdáleností u distanční transformace. Na výběr jsou 4: *Chessboard*, *City Block*, *Euclidean* a *Quasi-Euclidean*. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u metriky *Chessboard*, která měří vzdálenost mezi pixely založenou na 8-spojivosti, a u metriky *City Block*. Ta používá pro měření vzdálenosti 4-spojivost. U dvou dalších metod docházelo ke vzniku dělicích přímek, které však neodpovídaly skutečným hranicím buněk.

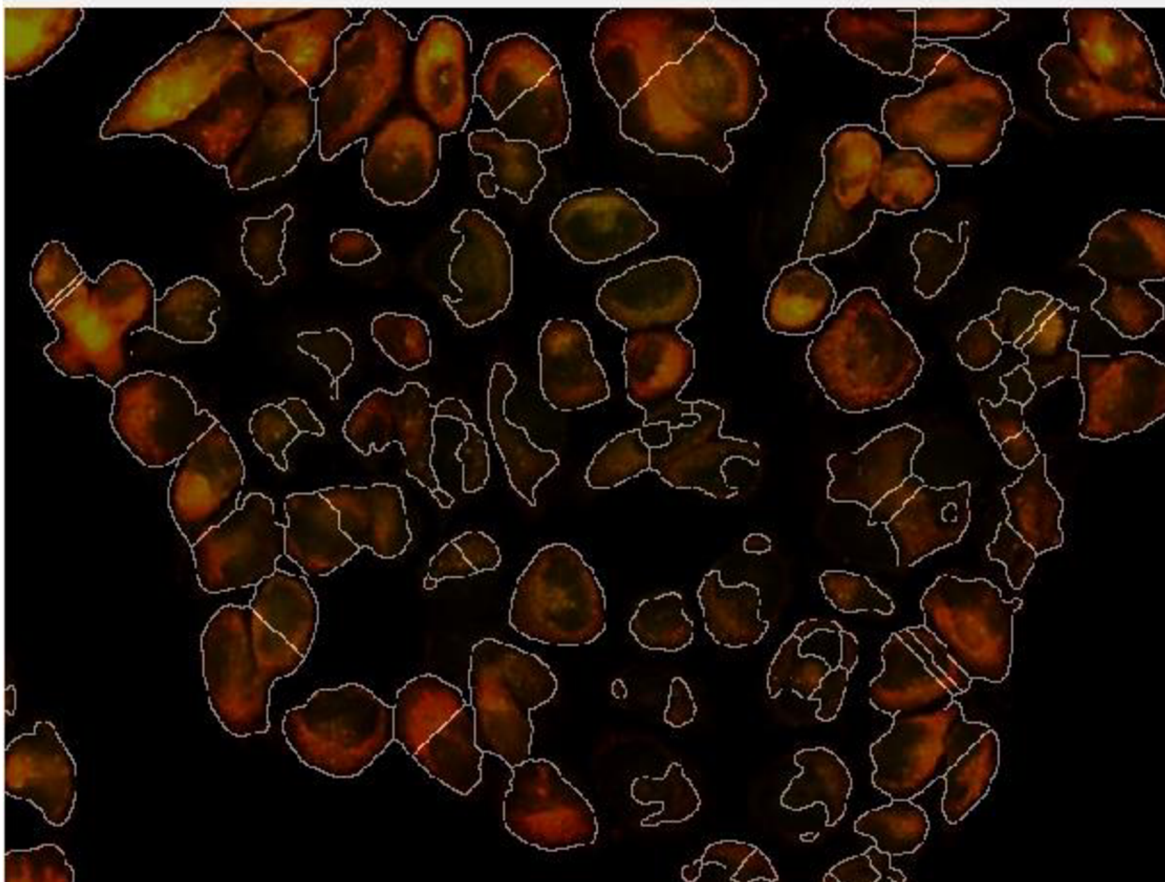
Dalším parametrem je volba velikosti konvoluční masky, přičemž čímž větší maska, tím větší vyhlazení. Konvolucí se předcházelo vzniku jednotlivých artefaktů na okrajích hranic buněk, které by negativně ovlivňovaly výsledky počítané emise záření. Nejčastěji byla volena konvoluční maska velikosti 7x7, 9x9 nebo 11x11.

Posledním parametrem je nastavení prahu pro vytvoření binárního obrazu. Práh byl empiricky volen zvlášť pro každý snímek, který sloužil pro vytvoření mapy. Výsledná segmentace a vytvořená mapa je závislá na nastavení těchto dílčích parametrů a na subjektivním pohledu uživatele.

Na následujících obrázcích je ukázána práce s grafickým rozhraním. Na obrázku 25 je ukázka nastavení dílčích parametrů pro segmentaci. Toto nastavení odpovídá bílé mapě zřetelné na obrázku 26, kde je zobrazena fúze analyzovaného snímku a vzniklé mapy.



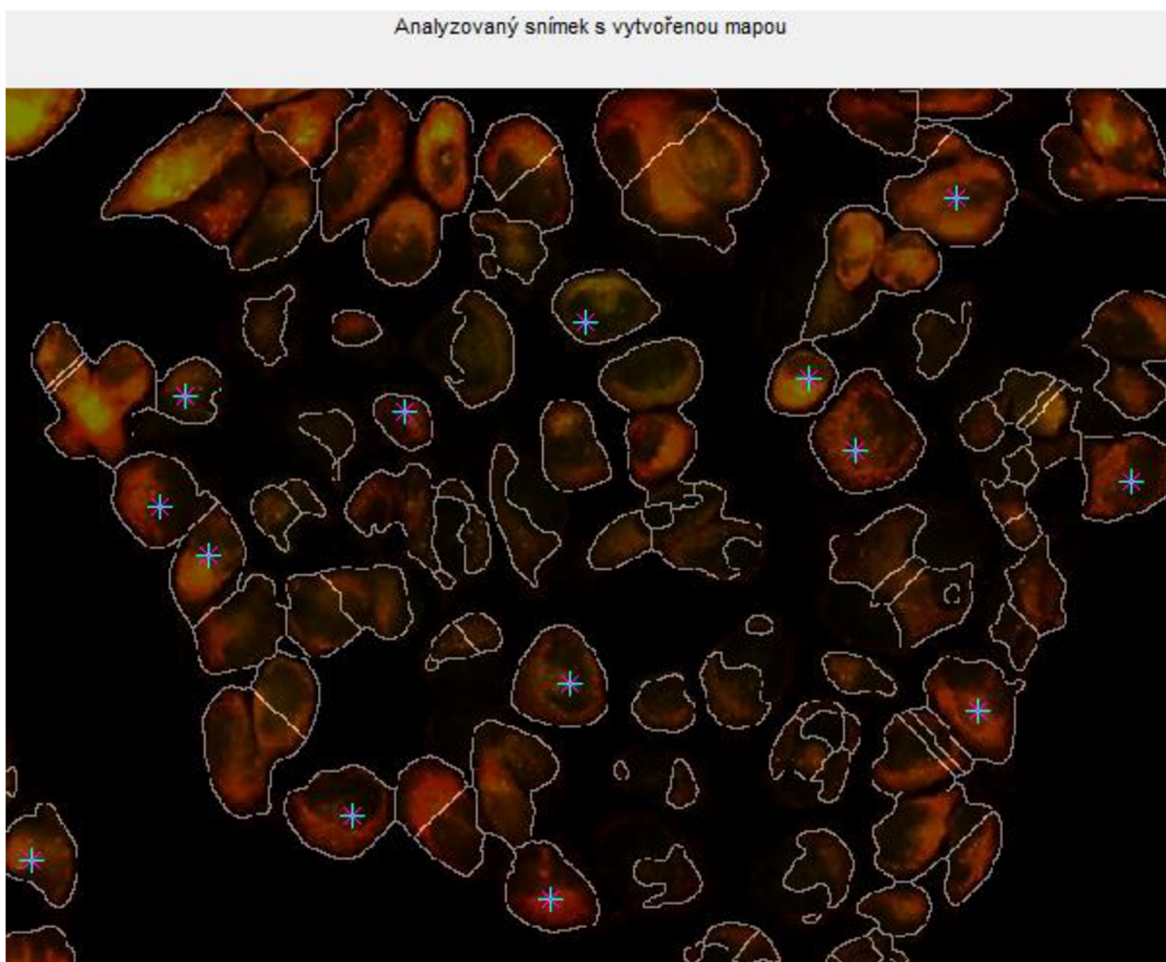
Obrázek 25: Ukázka nastavení parametrů segmentace.



Obrázek 26: Fúze mapy a analyzovaného snímku.

Na takto vzniklém snímku je pak možné označit vhodně segmentované buňky, u kterých se vypočte emise záření. Hodnoceny byly 3 parametry a to: průměrná emise záření buněk, průměrná maximální emise a průměr mediánů 10 nejvyšších hodnot. Pro další zpracování nebyla používána hodnota průměrného maxima. Tato hodnota není pro vyhodnocení emise záření dostatečně relevantní a byla nahrazena průměrem mediánů.

Na následujícím obrázku 27 jsou vidět označené buňky, u kterých se poté vyhodnotí emise záření. Označení buněk je závislé na uživateli a jeho volbě segmentovaných buněk. Výstup algoritmu je na obrázku 28. Poté je možné načíst další snímek, který odpovídá stejné koncentraci kapsaicinu, liší se však v druhu barvení. U nového aktuálního snímku se automaticky přepočítá emise záření.



Obrázek 27: Označení buněk pro vyhodnocení intenzity záření.

vybráno buněk	průměrná emise	průměrné maximum	medián maxim
14	57.4104	155.7143	146.6429

Obrázek 28: Výstupem algoritmu jsou vypočtené hodnoty emise záření.

5.5 Vyhodnocení emise záření

Výše zmíněným způsobem byly vyhodnoceny všechny snímky pro jednotlivé koncentrace kapsaicinu a druhy barvení, hodnoty emise byly dále zpracovány a vyhodnoceny v grafech. Emise záření je vyhodnocena jako jasová hodnota v rozsahu hodnot od 0 – 255, kdy nula odpovídá černé a 255 bílé, tedy od nejtmaší po nejsvětější. Pro zpracování získaných hodnot byl použit statistický software STATISTICA, verze 10.

Pro každou buněčnou linii a koncentraci byly nastaveny parametry segmentace, tak aby byla co nejoptimálnější. V tabulce 9 je souhrn dílčích nastavení pro buněčnou linii PNT1A, v tabulce 10 pak pro linii PC-3.

Tabulka 9: Nastavení dílčích parametrů pro vytvoření mapy u buněčné linie PNT1A.

Parametry	Koncentrace kapsaicinu [μM]				
	0	25	50	75	100
Snímek pro vytvoření mapy	LP ¹	LP	LP	ROS ²	ROS
Metrika	Chessboard	Chessboard	Chessboard	Chessboard	Chessboard
Maska	11x11	9x9	11x11	13x13	žádná
Práh	30,9755	10,9815	22,8405	32,0161	20,3119
Počet označených buněk	16	13	17	12	10

¹ lipidová peroxidace, ² reaktivní formy kyslíku

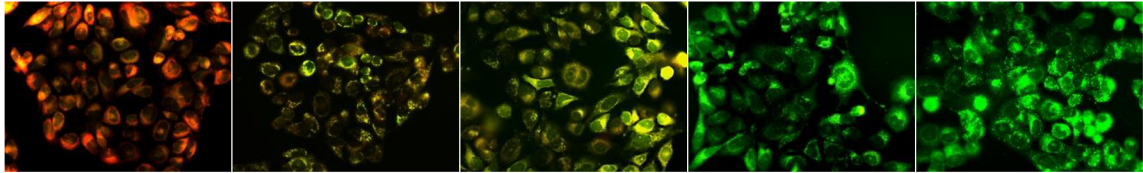
Tabulka 10: Nastavení dílčích parametrů pro vytvoření mapy u buněčné linie PC-3.

Parametry	Koncentrace kapsaicinu [μM]				
	0	25	50	75	100
Snímek pro vytvoření mapy	LP	LP	LP	LP	ROS
Metrika	Chessboard	City Block	Chessboard	Chessboard	Chessboard
Maska	7x7	7x7	9x9	9x9	3x3
Práh	29,7239	8,135	1,2515	0,1734	45,681
Počet označených buněk	38	17	33	15	10

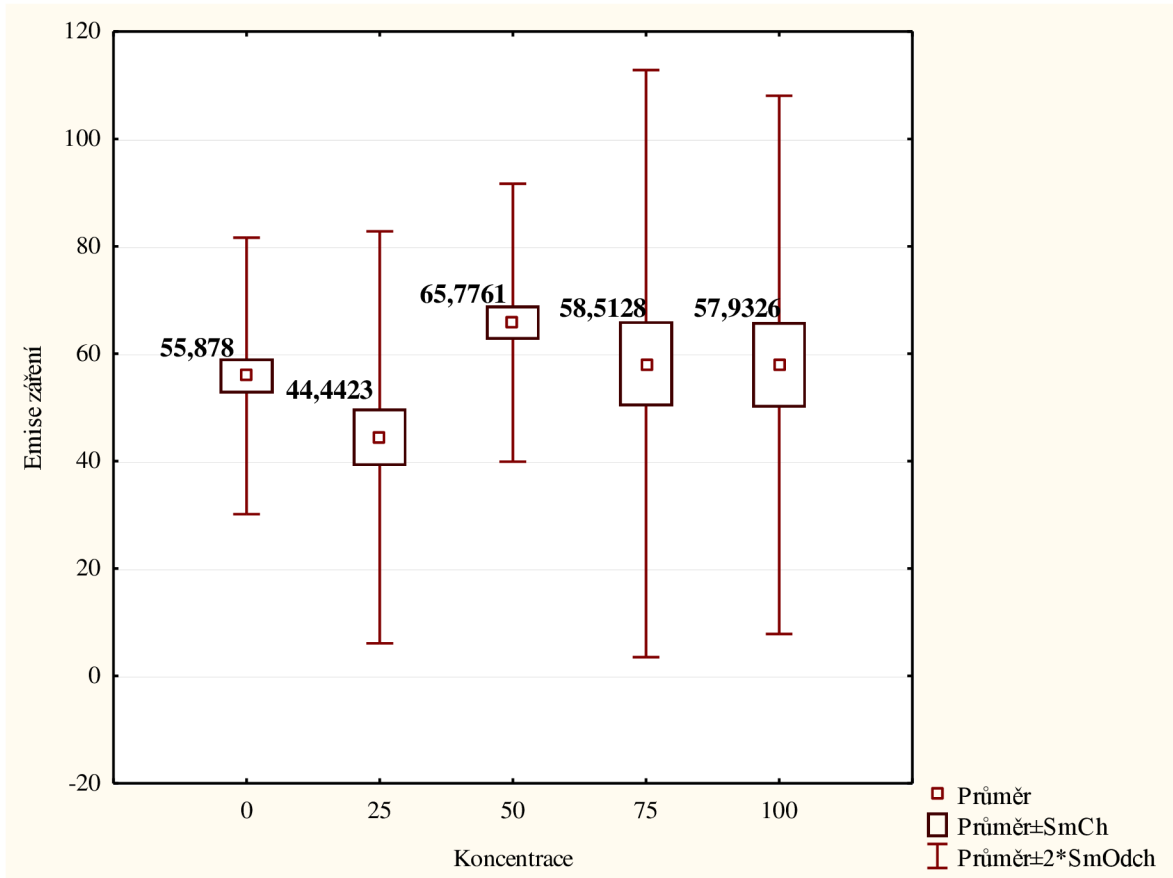
U nádorové linie PC-3 při nulové koncentraci kapsaicinu nebylo možné segmentovat buňky v červené oblasti podle vytvořené mapy. Snímek je příliš tmavý a bylo potřeba buňky segmentovat na tomto snímku zvlášť. Jako metrika byla zvolena metoda *Chessboard*, konvoluční maska nebyla použita a práh byl nastaven na hodnotu 0,0051.

5.5.1 Lipidová peroxidace (PNT1A)

Peroxidací lipidů lze nazvat proces oxidační degradace lipidů. Lipidy jsou základní stavební jednotkou buněčných membrán a během jejich peroxidace dochází k vyvážení elektronů volnými radikály. Tento proces pak vede k poškození buněčných membrán. Konečné produkty lipidové peroxidace mohou být mutagenní či karcinogenní.



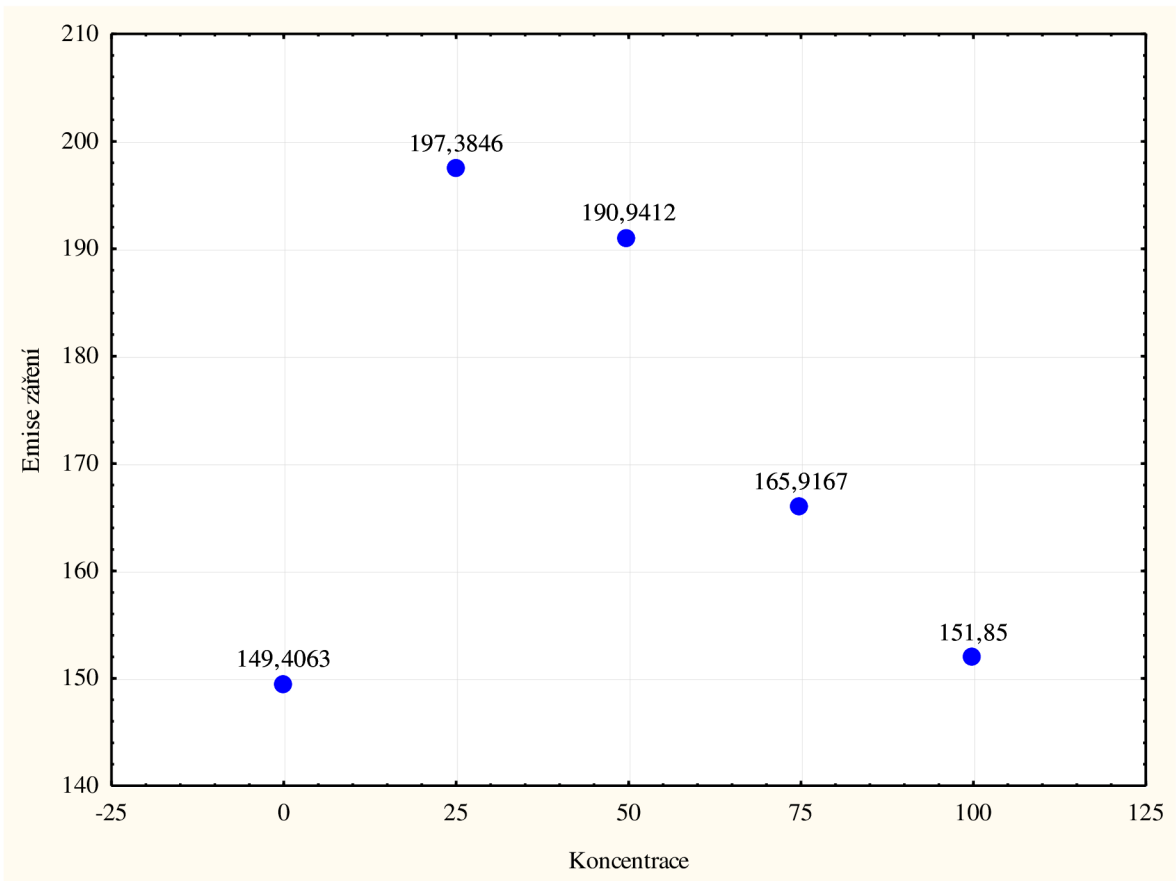
Obrázek 29: Lipidová peroxidace.



Graf 6: Průměrná emise záření buněk při různé koncentraci kapsaicinu.

Na grafu 6 je možné pozorovat při zvyšující se koncentraci kapsaicinu klesající průměrnou intenzitu záření sledovaných buněk. Rozdíly v průměrné emisi záření u této zdravé buněčné linie však nejsou příliš velké a proces poškození buněčné membrány není rychlý.

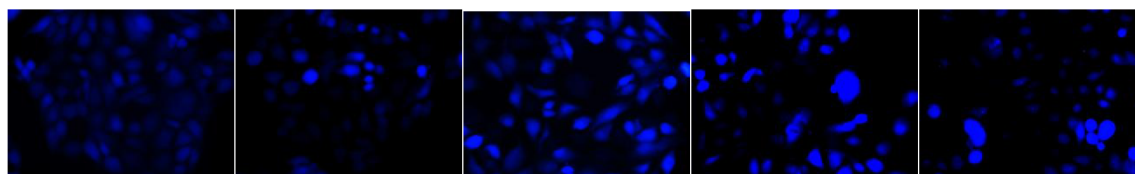
I přesto lze na základě klesající tendence v emisi záření konstatovat, že dochází k degradaci lipidů a naopak ke zvyšování lipidové peroxidace. Celkově u buněk nastává oxidační stres. Pokles maximálních intenzit záření je patrný více na následujícím grafu (viz Graf 7).



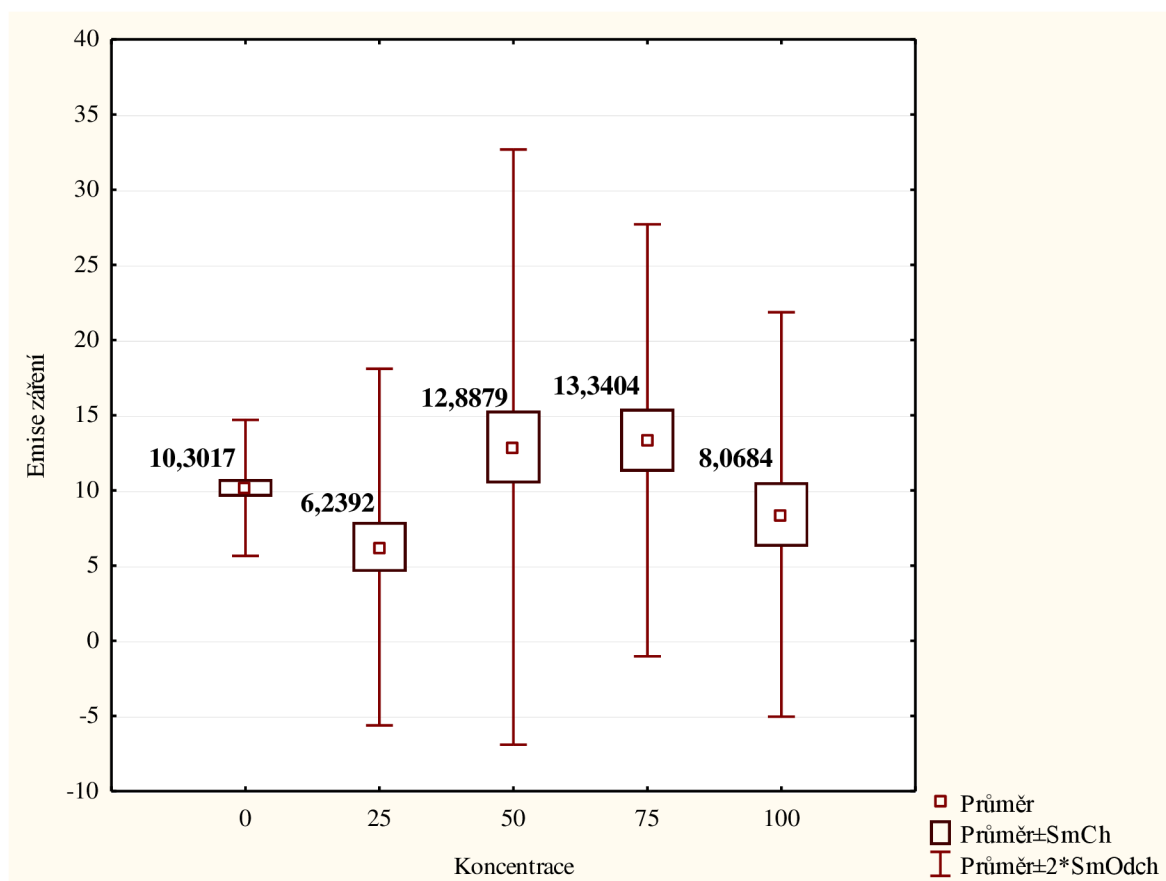
Graf 7: Průměrný medián maximálních intenzit.

5.5.2 Produkce thiolů (PNT1A)

Jak již bylo zmíněno, při metabolických pochodech dochází ke vzniku reaktivních forem kyslíku a dusíku, v důsledku toho v organismu nastává oxidační stres. Nadměrnému působení těchto volných radikálů se organismus brání několika způsoby. Nízkomolekulární thioley patří mezi endogenní antioxidanty, jejichž úkolem je zachycení a odstranění vzniklých radikálů.



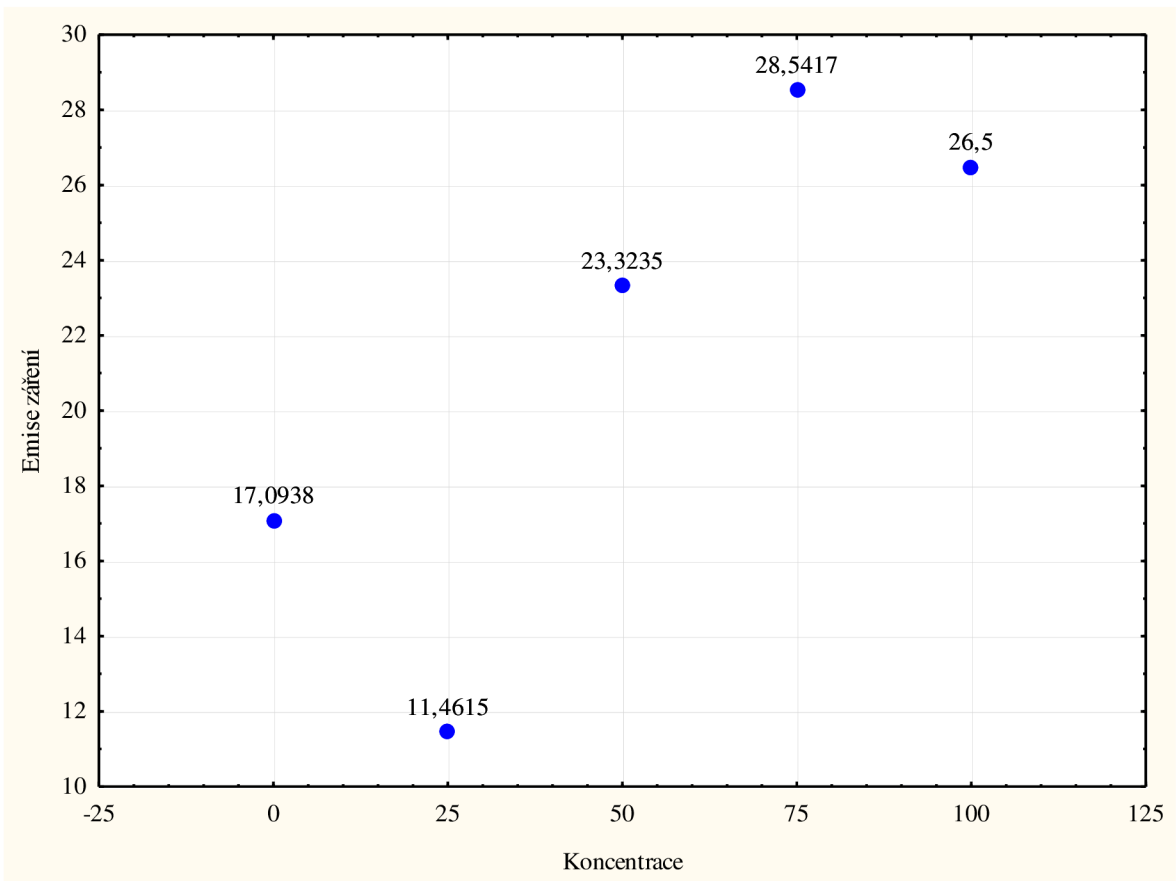
Obrázek 30: Produkce thiolů.



Graf 8: Průměrná emise záření buněk.

Na grafu 8 a 9 je vidět stejný průběh změn emise záření v závislosti na koncentraci kapsaicinu. Změny v průměrné emisi záření buněk současně odpovídají i změnám v maximální intenzitě záření naměřené při různých koncentracích kapsaicinu.

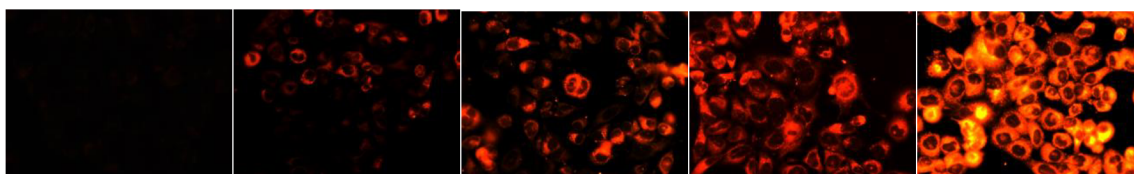
Nízké koncentrace kapsaicinu zvyšovaly produkci nízkomolekulárních thiolů, zatímco zvýšení koncentrace na 100 μ M vedlo ke snížení produkce nízkomolekulárních thiolů. Tento fakt může souviset s regulační rolí konjugovaného glutathionu.



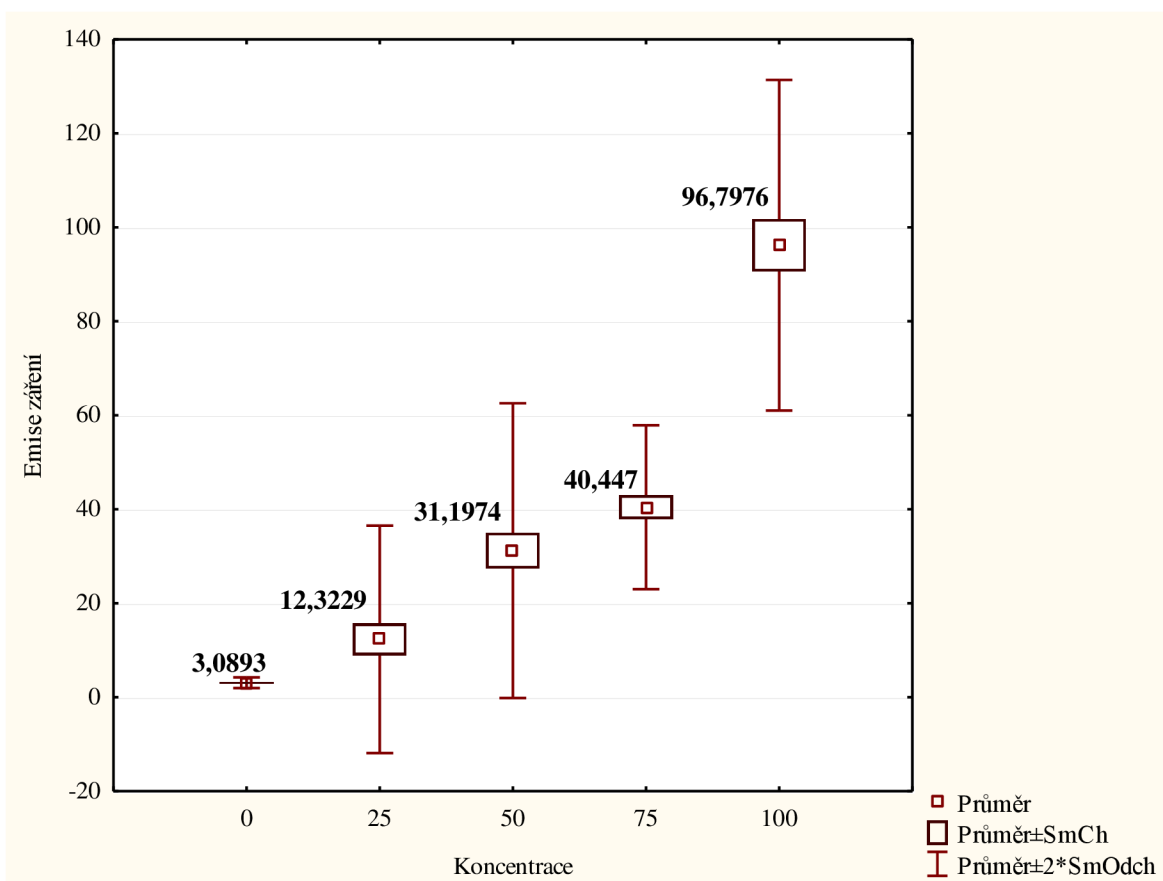
Graf 9: Průměrný medián maximálních intenzit.

5.5.3 Reaktivní formy kyslíku (PNT1A)

Hladina reaktivních forem kyslíku je v organismech udržována v určitých mezích mechanismy antioxidační ochrany. Při vychýlení rovnováhy směrem k oxidaci dochází k oxidačnímu stresu. U buněčných organismů dochází k tvorbě ROS produktů především v mitochondriích, kde je hlavním producentem ROS superoxid účastníci se respiračního řetězce.

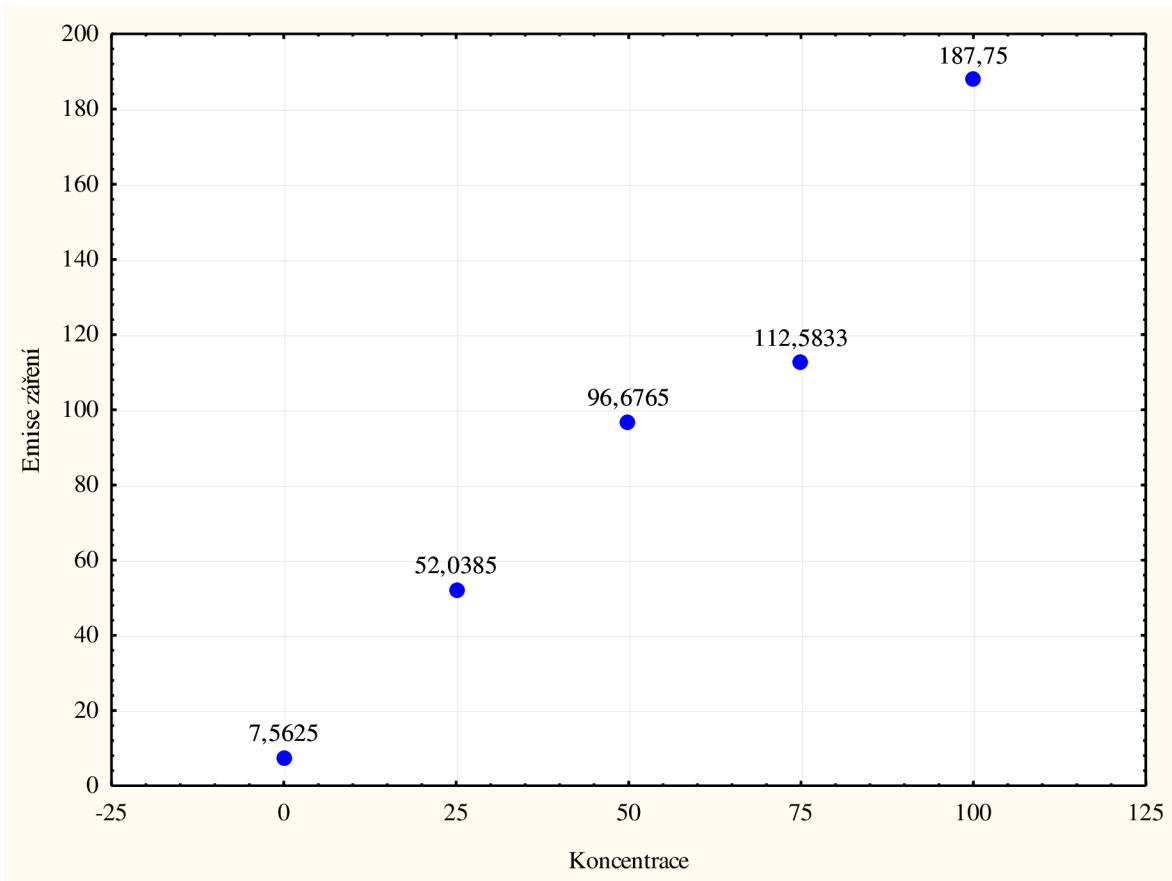


Obrázek 31: Reaktivní formy kyslíku.



Graf 10: Průměrná emise záření buněk.

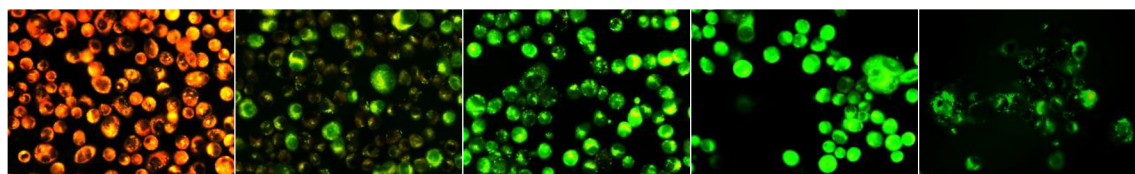
Graf 10 a graf 11 jsou jasným důkazem narůstajícího vzniku reaktivních forem kyslíku při zvyšující se koncentraci kapsaicinu. V důsledku toho lze konstatovat, že zvyšující koncentrace kapsaicinu vede k oxidačnímu stresu.



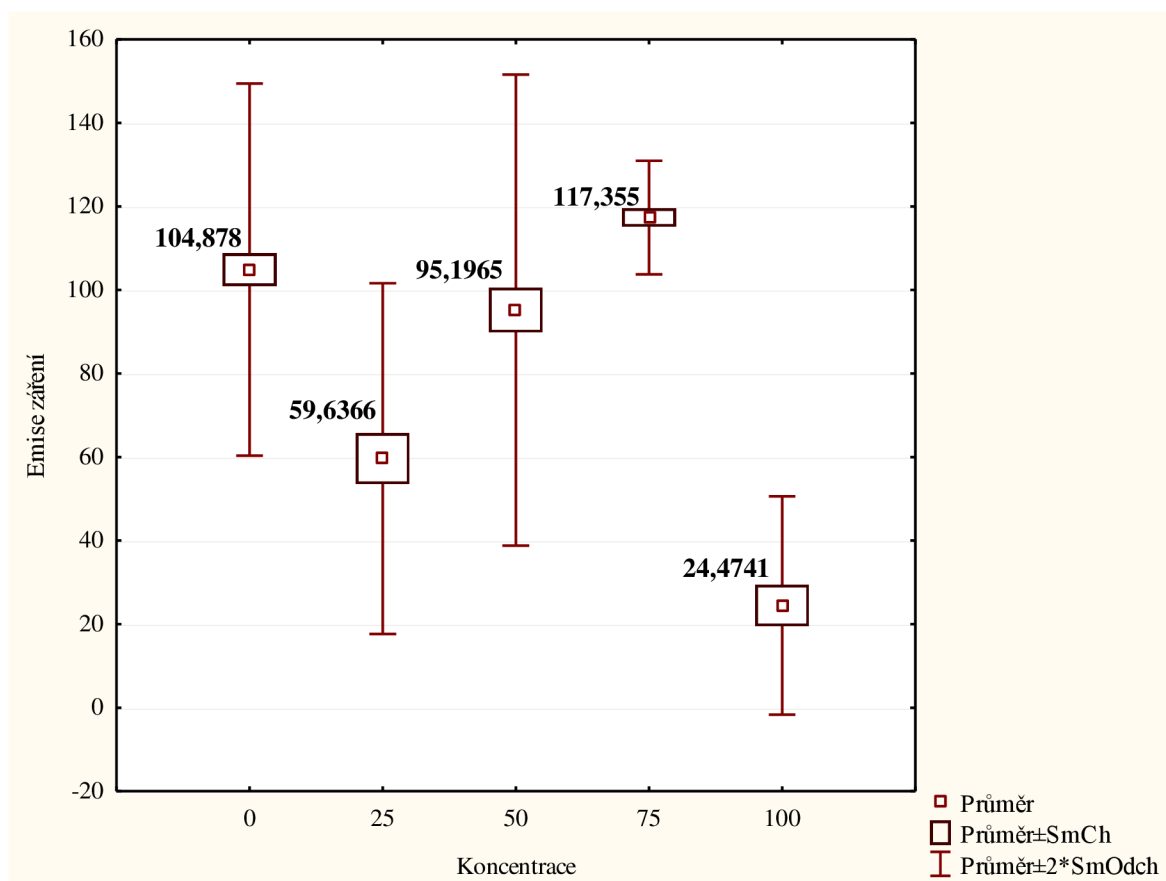
Graf 11: Průměrný medián maximálních intenzit.

5.5.4 Lipidová peroxidace (PC-3)

Na následujícím obrázku je znázorněn vliv zvyšující koncentrace kapsaicinu na nádorovou buněčnou linii PC-3. Jak již bylo zmíněno, lipidová peroxidace je známkou degradace lipidů a poškození buněčné membrány. Toto je jasně zřetelné na posledním snímku, při koncentraci kapsaicinu 100 μM , kdy došlo k rozpadu buněčných membrán a odumření buněk.



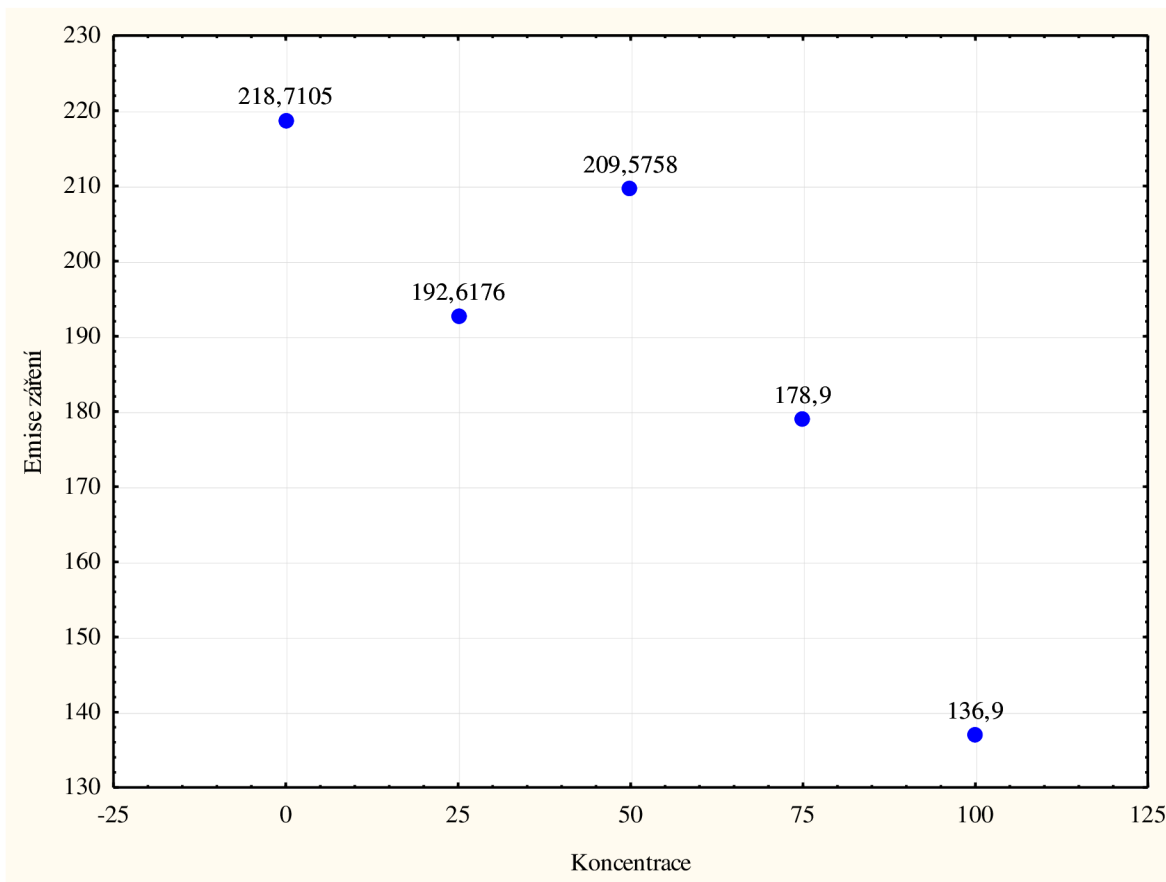
Obrázek 32: Lipidová peroxidace.



Graf 12: Průměrná emise záření buněk.

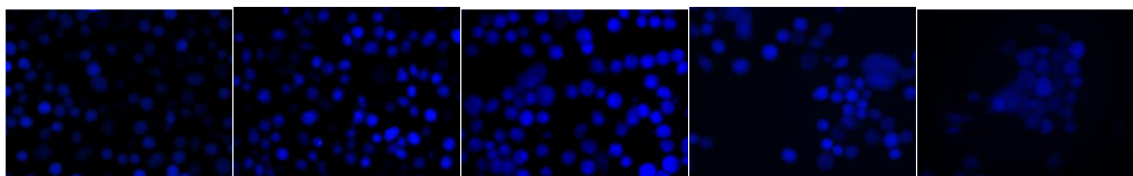
Při porovnání emise záření zdravé a nádorové buněčné linie, lze u té nádorové zaznamenat větší změny. Tou hlavní odlišností oproti zdravé linii je prudký pokles intenzity záření u koncentrace kapsaicinu 100 μM . Tento pokles je ekvivalentní výše zmiňovanému poslednímu snímku. Lipidová peroxidace se u této koncentrace rapidně zvýšila a u buněk nastal oxidační stres. Na Graf 13 je vidět rovněž pokles maximální

intenzity záření, související poškozením buněčné membrány a postupným odumíráním buněk.

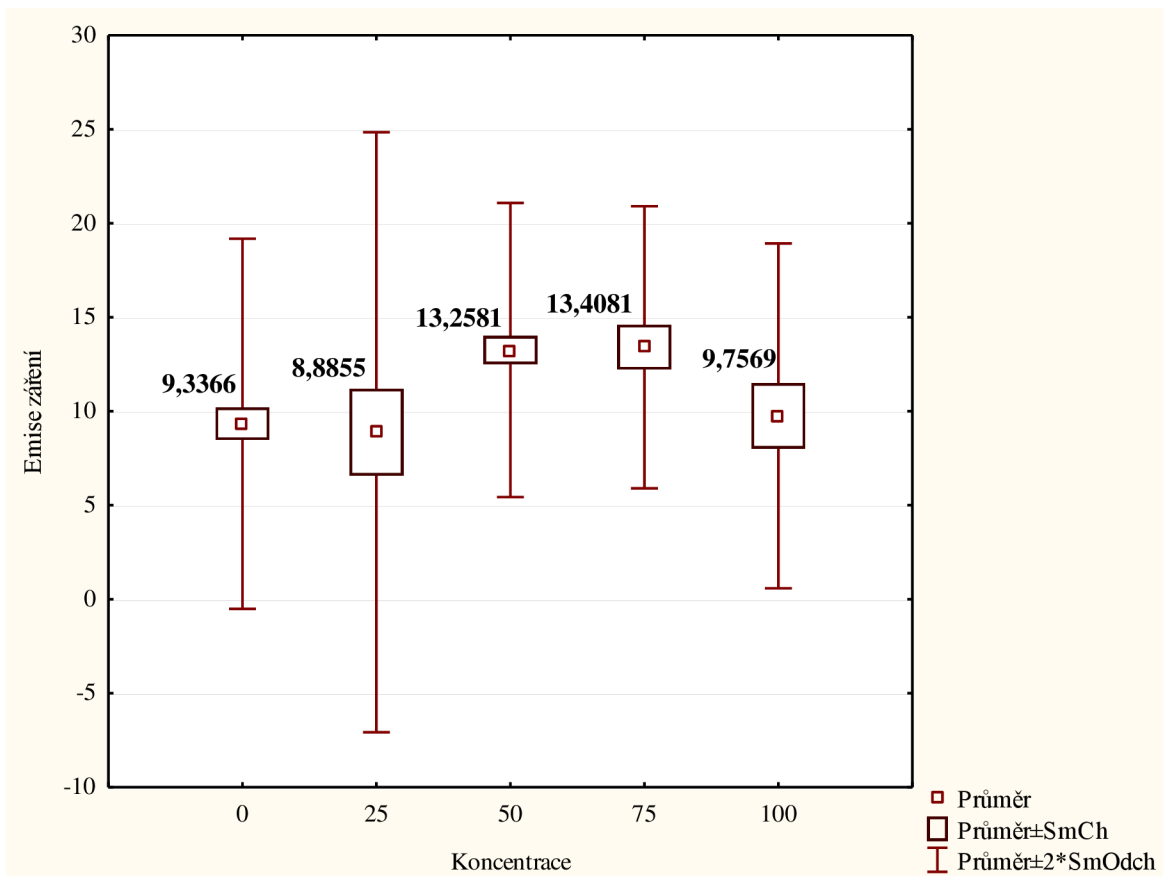


Graf 13: Průměrný medián maximálních intenzit.

5.5.5 Produkce thiolů (PC-3)

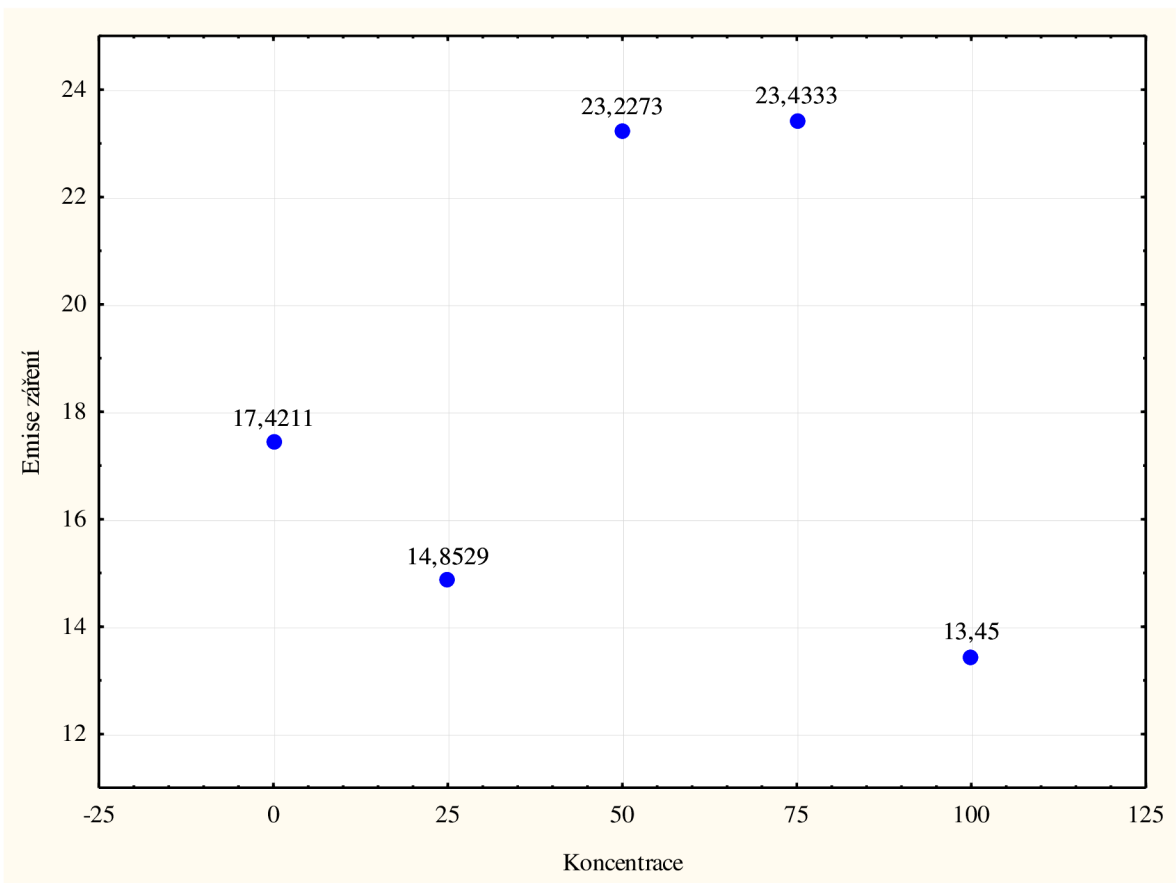


Obrázek 33: Produkce thiolů.



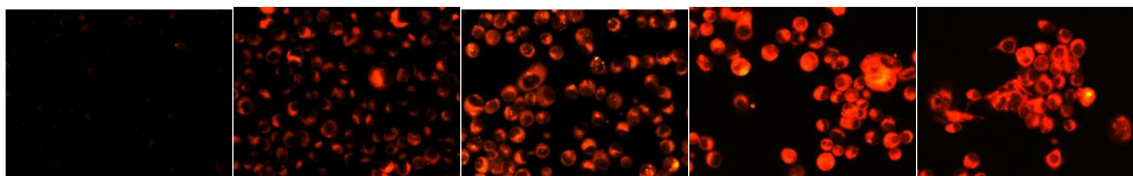
Graf 14: Průměrná emise záření buněk.

Zde není patrný žádný markantní rozdíl v průběhu intenzit záření oproti zdravé buněčné linii. Rovněž dochází nejdříve ke zvyšování a poté k postupnému snižování produkce nízkomolekulárních thiolů. U nejvyšší koncentrace kapsaicinu je taktéž možné zaznamenat výraznější pokles intenzity záření, stejně jako u lipidové peroxidace.

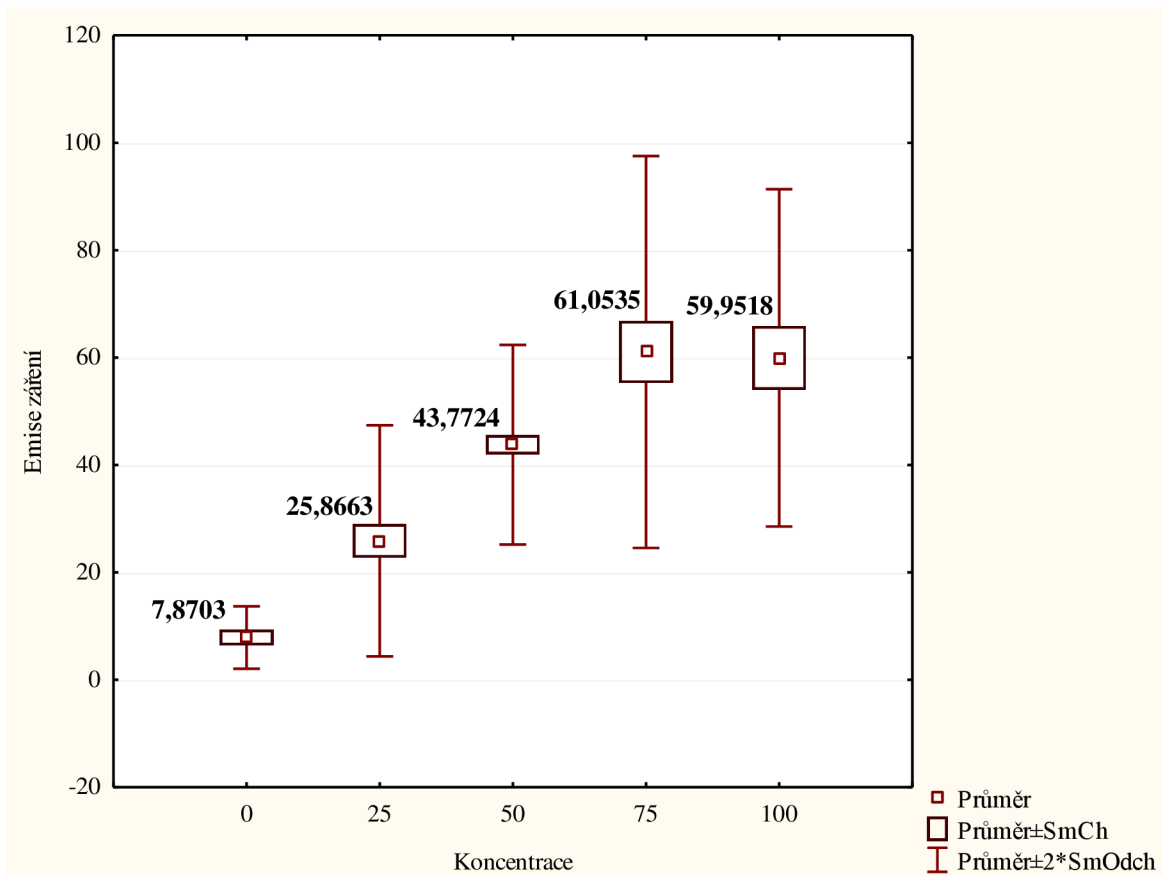


Graf 15: Průměrný medián maximálních intenzit.

5.5.6 Reaktivní formy kyslíku (PC-3)

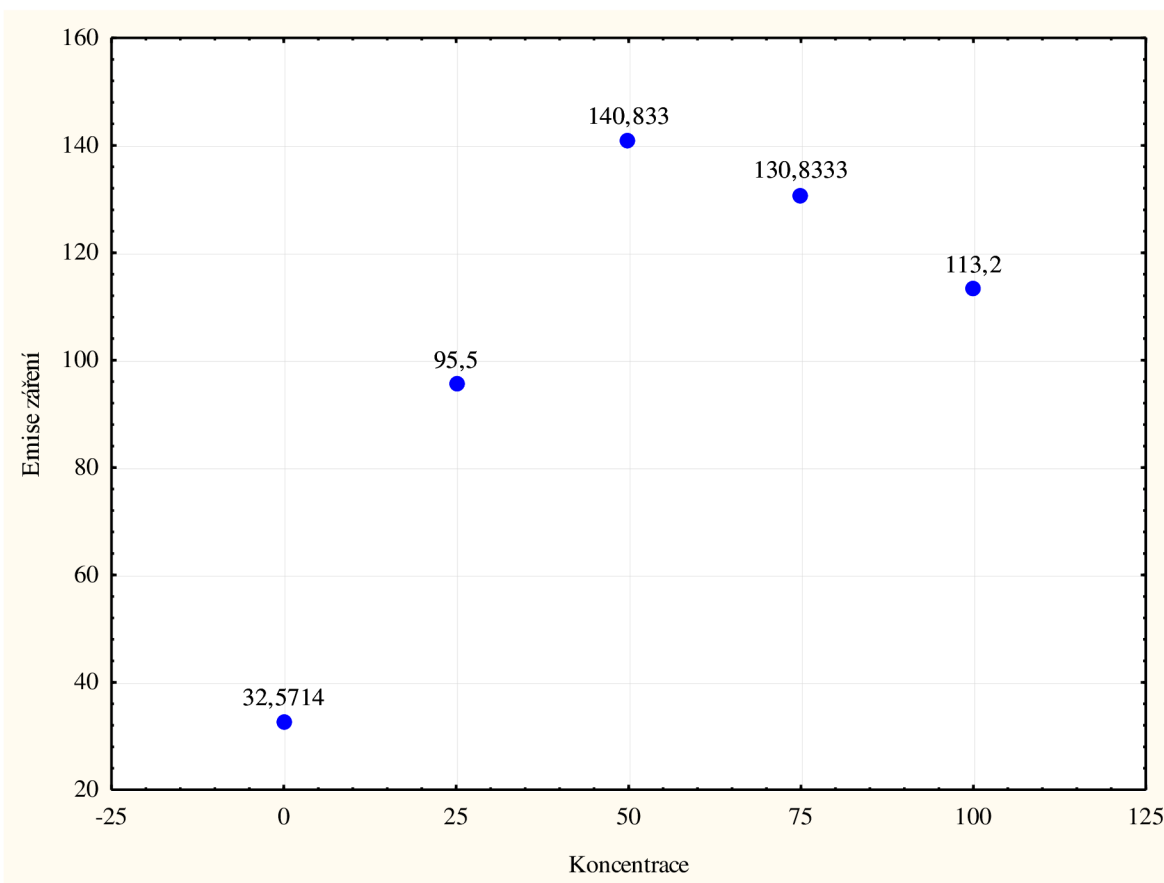


Obrázek 34: Reaktivní formy kyslíku.



Graf 16: Průměrná emise záření buněk.

Stejně jako u zdravé buněčné linie i zde dochází ke zvyšování emise záření dané zvyšující se produkcí reaktivních forem kyslíku při zvyšování koncentrace kapsaicinu. A stejně jako u předchozích grafů je zde pokles intenzity u nejvyšší koncentrace. Toto jen dokazuje, že buňky postupně umírají a v mitochondriích nedochází k tak intenzivní produkci ROS produktů.



Graf 17: Průměrný medián maximálních intenzit.

Z výše uvedených obrázků a grafů je patrné, že kapsaicin ve vyšších koncentracích působí cytotoxicky na buněčné linie. Cytotoxicita je zřejmá hlavně u nádorové buněčné linie PC-3, kde u všech metabolických procesů docházelo ke snižování emise záření buněk u nejvyšší koncentrace kapsaicinu. Zvyšující se koncentrace kapsaicinu vedla u všech sledovaných dějů k oxidačnímu stresu. Zejména na mitochondriích bylo patrné, že kapsaicin generuje reaktivní formy kyslíku, to bylo zřetelně vidět při použití dihydrorhodaminu 123. Z tohoto je možné předpokládat, že generování ROS produktů je jedním z hlavních mechanismů účinků kapsaicinu na buněčné linie. Dalším možným mechanismem je souvislost nízkomolekulárních thiolů s rolí glutathionu při konjugačních reakcích s xenobiotiky a tím zajištění detoxikace.

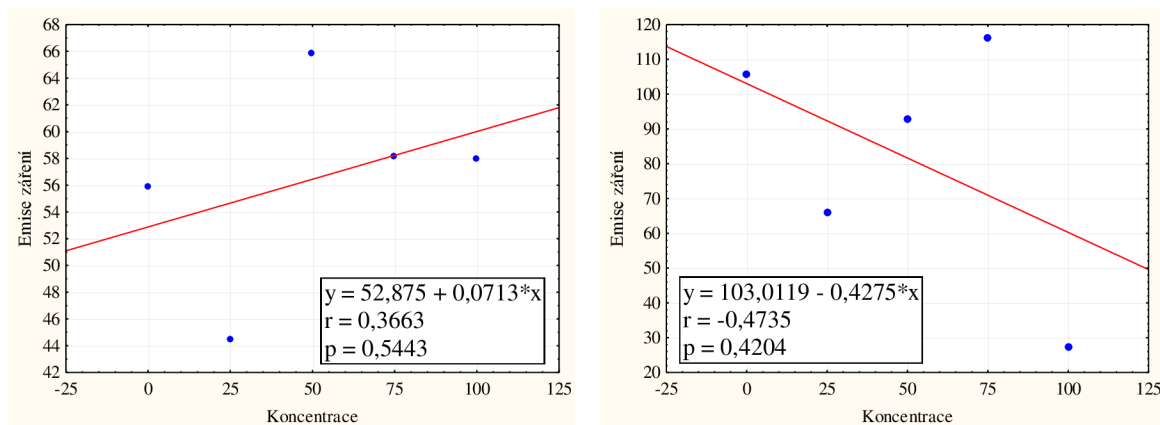
5.6 Porovnání obou linií (PNT1A x PC-3)

Hodnoty emise záření byly porovnávány u všech typů barvení a koncentrací kapsaicinu graficky pomocí regresní přímky a korelačního koeficientu r . Do grafů byly vyneseny hodnoty průměrné emise záření buněk.

Data nejsou stejného charakteru z důvodu různých snímků a detekce jiných buněk, proto nebylo možné použít Wilcoxonův párový test, který testuje hypotézu rovnosti

distribučních funkcí na základě ověření symetrického rozložení sledované náhodné veličiny. Pro získaná data je tedy nevhodný.

5.6.1 Lipidová peroxidace



Graf 18: Porovnání lipidové peroxidace u obou linií (PNT1A x PC-3).

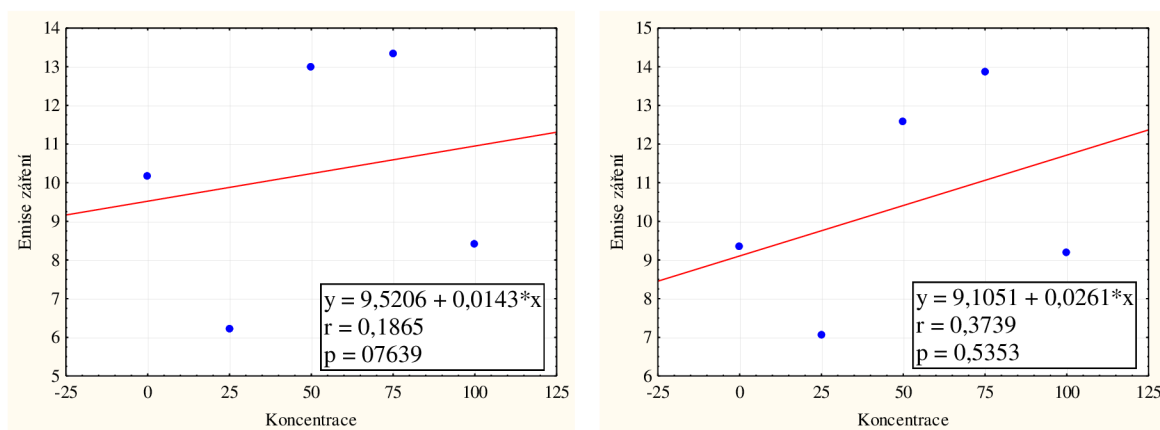
Z průběhu regresní přímky je již na první pohled patrné, že zdravá a nádorová linie se odlišují. Tento fakt je podporován i hodnotami korelačního koeficientu, který má u zdravé linie kladnou hodnotu, zatímco u nádorové linie zápornou.

Hodnoty emise záření u zdravé buněčné linie se pohybují v rozmezí 40 – 70. U nádorové linie jsou hodnoty emise záření vyšší, pohybují se v rozmezí 60 – 120. U koncentrace kapsaicinu 100 μM však dochází k prudkému poklesu na hodnotu okolo 30.

Klesající regresní přímka vypovídá o cytotoxickém působení kapsaicinu, lipidová peroxidace se zvýšila, nastal oxidační stres, a postupně docházelo k poškození buněčné membrány. To je dáno procesem programované buněčné smrti, která při této koncentraci kapsaicinu u nádorové linie nastala (viz Obrázek 32).

Lipidová peroxidace je tedy dostatečně prokazatelným ukazatelem odlišnosti zdravé a nemocné tkáně.

5.6.2 Produkce thiolů

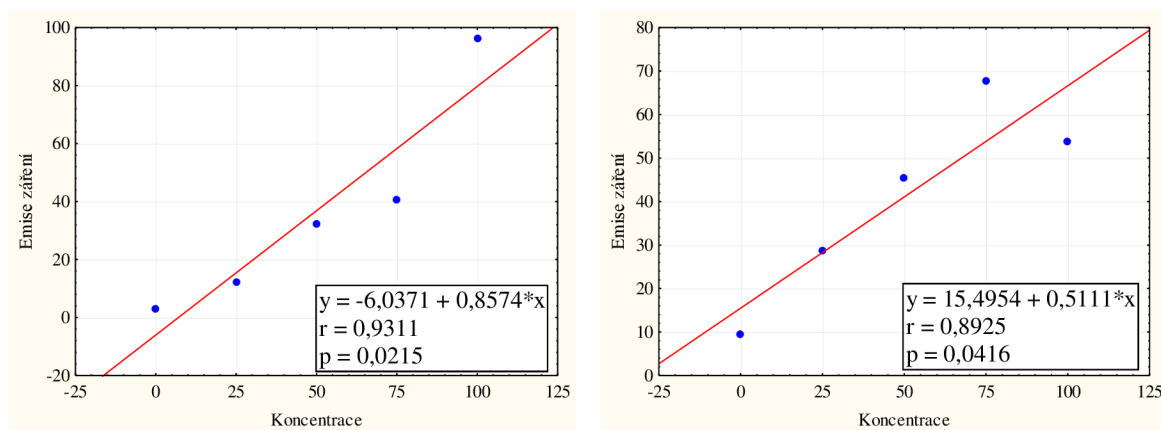


Graf 19: Porovnání produkce thiolů u obou linií (PNT1A x PC-3).

Oproti zdravé linii je možné u nádorové linie pozorovat strmější sklon regresní přímky a tedy rychlejší změny v produkci thiolů při zvyšující se koncentraci kapsaicinu. Tento fakt však nemá příliš výraznou vypovídací hodnotu a pro porovnání obou linií není zcela vhodný.

Hodnoty emise záření se u obou linií pohybují v rozmezí 5 – 15. Ani zde tedy nedochází k markantním změnám. U obou linií je však možné pozorovat pokles u koncentrace kapsaicinu 100 μM a tedy snížení produkce thiolů, rovněž dané postupným usmrcením buněk.

5.6.3 Reaktivní formy kyslíku



Graf 20: Porovnání produkce reaktivních forem kyslíku u obou linií (PNT1A x PC-3).

V porovnání s předchozími jsou na tomto grafu regresní přímky nejstrmější, u obou linií vidět je nárůst v produkci reaktivních forem kyslíku. Při zvyšující se koncentraci kapsaicinu dochází k četnějšímu výskytu ROS produktů. Jedinou odlišností je v tomto případě pokles u linie nádorové při koncentraci kapsaicinu 100 μM . Jak již bylo zmíněno, je to dáno buněčnou smrtí.

Nicméně pro celkové porovnání obou linií je sledování změn v produkci reaktivních forem kyslíku nedostatečně signifikantní. Průběhy regresních přímek jsou téměř totožné a i rozmezí hodnot emise záření je obdobné.

6 Závěr

Nádorové onemocnění patří v České republice k nejčastějším typům onemocnění, a co se týče léčby k nejzávažnějším. V léčbě nádorového onemocnění se nejčastěji přistupuje k invazivním operativním zákrokům, které jsou následovány radioterapií a chemoterapií. Léčebný proces není pro pacienty příznivý a často dochází ke zhoršení kvality života.

Výzkumné týmy se proto stále častěji zabývají studiem nádorového onemocnění, pochopením mechanismů kancerogeneze a vývojem nových léčebných strategií. V práci jsou diskutovány nádorové buněčné linie a jejich zastoupení ve výzkumu nádorového onemocnění. Jejich využití při studiu mechanismů nádorového růstu je dnes již běžnou záležitostí a to z několika důvodů, jsou immortalizované a je možné je pasážovat po mnoho cyklů.

Na základě několika studií uskutečněných na různých nádorových buněčných liniích bylo zjištěno, že přírodní látky mají příznivý vliv na lidský organismus a působí cytotoxicky na nádorové buňky. Ke studiu cytotoxicity látek bylo vyvinuto několik metod, jako například běžně dostupná metoda MTT test, jejímž výsledkem je absorbance, která je přímo úměrná životaschopnosti sledovaných buněk. Průlom ve studiu buněčného růstu je monitorování v reálném čase, které umožňuje přidání testovaných látek během analýzy a přímé sledování vlivu těchto látek na buňky.

Testovanou látkou v této práci byl přírodní alkaloid – kapsaicin, který se vyskytuje v chilli. Pomocí MTT testu a měření v reálném čase systémem xCELLigence bylo zjištěno cytotoxické působení kapsaicinu při zvyšujících se koncentracích. U nádorové buněčné linie PC-3 byl zaznamenán vyšší cytotoxický účinek než u zdravé tkáně. Na základě těchto výsledků byly poté provedeny experimenty založené na fluorescenční mikroskopii, kdy byla sledována lipidová peroxidace, produkce nízkomolekulárních thiolů a reaktivních forem kyslíku. U všech těchto metabolických pochodů byl rovněž zjištěn cytotoxický účinek kapsaicinu a to především na nádorové buňky.

Zvyšující se koncentrace kapsaicinu vede ke zvýšení oxidačního stresu. Kapsaicin generuje ROS produkty, což bylo patrné zejména na mitochondriích. Dá se tedy předpokládat, že toto je jeden z významných mechanismů účinku kapsaicinu na buněčné linie. Zvýšená produkce ROS byla patrná i při použití barviva dihydrorhodaminu 123, opět byla zjevná oxidační zátěž mitochondrií. Současně nízké koncentrace kapsaicinu zvyšovaly produkci nízkomolekulárních thiolů, naopak vysoké koncentrace vedly ke snížení koncentrace nízkomolekulárních thiolů. Tento fakt může souviset s rolí glutathionu při konjugacích reakcích s xenobiotiky jako s jedním z mechanismů jejich detoxikace.

Samotné mechanismy působení přírodních látek jsou stále nejasné, ale nejčastějším účinkem přírodních látek jsou reakce vedoucí k zahájení programované buněčné smrti

nádorově poškozených buněk. Tím je zabráněno další proliferaci a metastazování. Pochopení mechanismů, kterými působí přírodní látky, však vyžaduje další zkoumání. Nicméně je možné konstatovat, že přírodní produkty mají příznivý vliv na lidský organismus a jsou účinnými látkami v boji s nádorovým onemocněním.

Seznam literatury

- [1] 10 facts about cancer. *World Health Organization* [online]. 2011 [cit. 2012-10-11]. Dostupné z: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/index.html>
- [2] Cancer. *World Health Organization* [online]. 2012 [cit. 2012-10-11]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
- [3] PETRUŽELKA, Luboš a Bohuslav KONOPÁSEK. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 274 s. ISBN 80-246-0395-0.
- [4] ADAM, Zdeněk, Jiří VORLÍČEK a Jana KOPTÍKOVÁ. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2003, 787 s. ISBN 80-247-0677-6.
- [5] IRIGARAY, P, J A NEWBY, R CLAPP, L HARDELL, V HOWARD, L MONTAGNIER, S EPSTEIN a D BELPOMME. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2007, roč. 61, č. 10, s. 640–658. doi 10.1016/j.biopha.2007.10.006.
- [6] JAKOBISIAK, M, W LASEK a J GOLAB. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Letters*. 2003, roč. 90, č. 2-3, s. 103–122. doi 10.1016/j.imlet.2003.08.005.
- [7] HOFF, Paulo M a Karime Kalil MACHADO. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012, roč. 38, č. 7, s. 825–833. doi 10.1016/j.ctrv.2012.04.006.
- [8] GEIGER, Thomas R a Daniel S PEEPER. Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*. 2009, roč. 1796, č. 2, s. 293–308. doi 10.1016/j.bbcan.2009.07.006.
- [9] JEFFORD, Charles Edward a Irmgard IRMINGER-FINGER. Mechanisms of chromosome instability in cancers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2006, roč. 59, č. 1, s. 1–14. doi 10.1016/j.critrevonc.2006.02.005.
- [10] KLENER, Pavel a Pavel KLENER JR. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, 209 s. ISBN 978-802-4728-087.
- [11] VAN STAVEREN, W C G, D Y Weiss SOLIS, A HEBRANT, V DETOURS, J E DUMONT a C MAENHAUT. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*. 2009, roč. 1795, č. 2, s. 92–103.
- [12] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: Úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 120 s. ISBN 80-246-1069-8.
- [13] DUŠEK, Ladislav, Jan MUŽÍK, Jitka ABRAHÁMOVÁ, Tomáš PAVLÍK, Ondřej MÁJEK, Jana KOPTÍKOVÁ, Rostislav VYZULA, Jindřich FÍNEK a Jiří VORLÍČEK.

Epidemiologie solidních nádorů v ČR podle dat Národního onkologického registru za období 1977-2007. *Postgraduální medicína*. 2010, č. 3, s. 268–277.

[14] DUŠEK, Ladislav, Jan MUŽÍK, Miroslav KUBÁSEK, Jana KOPTÍKOVÁ, Jan ŽALOUDEK a Rostislav VYZULA. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Verze 7.0 [2007]. *SVOD, Masarykova univerzita* [online]. 2007 [cit. 2012-11-03]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>

[15] KANZAWA, F, Y AKIYAMA, N SAIJO a K NISHIO. In vitro effects of combinations of cis-amminedichloro (2-methylpyridine) platinum (II) (ZD0473) with other novel anticancer drugs on the growth of SBC-3, a human small cell lung cancer cell. *Lung Cancer*. 2003, roč. 40, č. 3, s. 325–332. doi 10.1016/S0169-5002(02)00072-2.

[16] FUJITA, J, Y OHTSUKI, S BANDO, Y UEDA, A KUBO, Y TOJO, Y YAMAJI a T ISHIDA. Expression of thyroid transcription factor-1 in 16 human lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 2003, roč. 39, č. 1, s. 31–36. doi 10.1016/S0169-5002(02)00390-2.

[17] KOTY, P P, H F ZHANG a M L LEVITT. Antisense bcl-2 treatment increases programmed cell death in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 1999, roč. 23, č. 2, s. 115–127. doi 10.1016/S0169-5002(98)00097-X.

[18] KAWAI, H, K KIURA, M TABATA, T YOSHINO, I TAKATA, A HIRAKI, K CHIKAMORI, H UEOKA, M TANIMOTO a M HARADA. Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy. *Lung Cancer*. 2002, roč. 35, č. 3, s. 305–314. doi 10.1016/S0169-5002(01)00430-5.

[19] BUECHER, B, A BROQUET, D BOUANCHEAU, M F HEYMANN, A JARRY, M G DENIS, C BONNET, J P GALMICHE a H M BLOTTIERE. Molecular mechanisms involved in the antiproliferative effect of two COX-2 inhibitors, nimesulide and NS-398, on colorectal cancer cell lines. *Digestive and Liver Disease*. 2003, roč. 35, č. 8, s. 557–565. doi 10.1016/S1590-8658(03)00272-X.

[20] FLIS, Sylwia, Agnieszka GNYSZKA a Jacek SPLAWINSKI. HDAC inhibitors, MS275 and SBHA, enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin in the colorectal cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009, roč. 387, č. 2, s. 336–341. doi 10.1016/j.bbrc.2009.07.017.

[21] LI, Y, P J COZZI, C F QU, D Y ZHANG, S M A RIZVI, C RAJA a B J ALLEN. Cytotoxicity of human prostate cancer cell lines in vitro and induction of apoptosis using Bi-213-Herceptin alpha-conjugate. *Cancer Letters*. 2004, roč. 205, č. 2, s. 161–171. doi 10.1016/j.canlet.2003.10.035.

[22] BIDOSEE, Maslama, Rachel KARRY, Esther WEISS-MESSER a Ronnie J BARKEY. Regulation of growth hormone receptors in human prostate cancer cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009, roč. 309, č. 1-2, s. 82–92. doi 10.1016/j.mce.2009.06.004.

[23] ANAGANTI, Suresh, Lynnette FERNANDEZ-CUESTA, Anita LANGEROD, Pierre HAINAUT a Magali OLIVIER. p53-Dependent repression of focal adhesion kinase in

response to estradiol in breast cancer cell-lines. *Cancer Letters*. 2011, roč. 300, č. 2, s. 215–224. doi 10.1016/j.canlet.2010.10.008.

[24] MURIAS, Marek, Michaela MIKSITS, Sylvia AUST, Margit SPATZENEGGER, Theresia THALHAMMER, Thomas SZEKERES a Walter JAEGER. Metabolism of resveratrol in breast cancer cell lines: Impact of sulfotransferase 1A1 expression on cell growth inhibition. *Cancer Letters*. 2008, roč. 261, č. 2, s. 172–182. doi 10.1016/j.canlet.2007.11.008.

[25] SU, Chang, Zhong-Jie REN, Fang WANG, Min LIU, Xin LI a Hua TANG. PIWIL4 regulates cervical cancer cell line growth and is involved in down-regulating the expression of p14ARF and p53. *FEBS Letters*. 2012, roč. 586, č. 9, s. 1356–1362. doi 10.1016/j.febslet.2012.03.053.

[26] KUNCHARIN, Yanin, Naunpun SANGPHECH, Patipark KUEANJINDA, Parvapan BHATTARAKOSOL a Tanapat PALAGA. MAML1 regulates cell viability via the NF-kappa B pathway in cervical cancer cell lines. *Experimental Cell Research*. 2011, roč. 317, č. 13, s. 1830–1840. doi 10.1016/j.yexcr.2011.05.005.

[27] NISHIOKA, K, Y DOKI, H MIYATA, S TAMURA, T YASUDA, Y KIMURA, K KISHI, K YOSHIDA, Y FUJIWARA, M YANO a M MONDEN. Bile acid promotes the proliferation of squamous cell carcinoma of the esophagus, independent of its inducing COX-2 expression. *Journal of Surgical Research*. 2006, roč. 132, č. 1, s. 130–135. doi 10.1016/j.jss.2005.09.024.

[28] JUNG, I D, S Y YANG, C G PARK, K B LEE, S K JONG, S Y LEE, J W HAN, H W LEE a H Y LEE. 5-Fluorouracil inhibits nitric oxide production through the inactivation of I kappa B kinase in stomach cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. 2002, roč. 64, č. 10, s. 1439–1445. doi 10.1016/S0006-2952(02)01381-3.

[29] YAN, Sheng-lei, Chun-yin HUANG, Shwu-tzy WU a Mei-chin YIN. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*. 2010, roč. 24, č. 3, s. 842–848. doi 10.1016/j.tiv.2009.12.008.

[30] WANG, Wei, Yue-ping SUN, Xin-zhi HUANG, Min HE, Yu-ying CHEN, Gui-ying SHI, Hui LI, Jing YI a Jian WANG. Emodin enhances sensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs via glutathion depletion and MRP1 downregulation. *Biochemical Pharmacology*. 2010, roč. 79, č. 8, s. 1134–1140. doi 10.1016/j.bcp.2009.12.006.

[31] AZZARITI, Amalia, Letizia PORCELLI, Giuliana GATTI, Angelo NICOLIN a Angelo PARADISO. Synergic antiproliferative and antiangiogenic effects of EGFR and mTor inhibitors on pancreatic cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. 2008, roč. 75, č. 5, s. 1035–1044. doi 10.1016/j.bcp.2007.11.018.

[32] OSMAK, M, L BIZJAK, B JERNEJ a S KAPITANOVIC. Characterization of carboplatin-resistant sublines derived from human larynx-carcinoma cells. *Mutation Research Letters*. 1995, roč. 347, č. 3-4, s. 141–150. doi 10.1016/0165-7992(95)00033-X.

- [33] FINN, G J, B S CREAVER a D A EGAN. A study of the role of cell cycle events mediating the action of coumarin derivatives in human malignant melanoma cells. *Cancer Letters*. 2004, roč. 214, č. 1, s. 43–54. doi 10.1016/j.canlet.2004.04.022.
- [34] KUBOTA, Y, T SHUIN, M YAO, H INOUE a T YOSHIOKA. The enhanced P-32 labeling of CDP-diacylglycerol in c-myc gene expressed human-kidney cancer-cells. *FEBS Letters*. 1987, roč. 212, č. 1, s. 159–162. doi 10.1016/0014-5793(87)81577-6.
- [35] YOU, JingJing, Michele C MADIGAN, Alexandra ROWE, Mila SAJINOVIC, Pamela J RUSSELL a Paul JACKSON. An inverse relationship between KAI1 expression, invasive ability, and MMP-2 expression and activity in bladder cancer cell lines. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*. 2012, roč. 30, č. 4, s. 502–508. doi 10.1016/j.urolonc.2010.02.013.
- [36] KAUSHIK, Nagendra K, Yong Hee KIM, Yong Gyu HAN a Eun Ha CHOI. Effect of jet plasma on T98G human brain cancer cells. *Current Applied Physics*. 2013, roč. 13, č. 1, s. 176–180. doi 10.1016/j.cap.2012.07.002.
- [37] LAVARONE, Elisa, Cinzia PUPPIN, Nadia PASSON, Sebastiano FILETTI, Diego RUSSO a Giuseppe DAMANTE. The PARP inhibitor PJ34 modifies proliferation, NIS expression and epigenetic marks in thyroid cancer cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013, roč. 365, č. 1, s. 1–10. doi 10.1016/j.mce.2012.08.019.
- [38] KOBAYASHI, H, Y TAKEMURA a T OHNUMA. Variable expression of RFC1 in human leukemia cell lines resistant to antifolates. *Cancer Letters*. 1998, roč. 124, č. 2, s. 135–142. doi 10.1016/S0304-3835(97)00464-3.
- [39] GARDNER, M J, L M H JONES, J B CATTERALL a G A TURNER. Expression of cell-adhesion molecules on ovarian tumor-cell lines and mesothelial cells, in relation to ovarian-cancer metastasis. *Cancer Letters*. 1995, roč. 91, č. 2, s. 229–234. doi 10.1016/0304-3835(95)03743-G.
- [40] MORAVCOVÁ, Jitka. *Biologicky aktivní přírodní látky* [online]. Praha, 2006, 108 s. Interní studijní pomůcka VŠCHT. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>.
- [41] REDDY, L, B ODHAV a K D BHOOLA. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003, roč. 99, č. 1, s. 1–13. doi 10.1016/S0163-7258(03)00042-1.
- [42] STAGOS, Dimitrios, Gregorios D AMOUTZIAS, Antonios MATAKOS, Argyris SPYROU, Aristides M TSATSAKIS a Dimitrios KOURETAS. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, roč. 50, č. 6, s. 2155–2170. doi 10.1016/j.fct.2012.04.002.
- [43] FERGUSON, L R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001, roč. 475, č. 1-2, SI, s. 89–111. doi 10.1016/S0027-5107(01)00073-2.

- [44] KANG, Nam Joo, Seung Ho SHIN, Hyong Joo LEE a Ki Won LEE. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*. 2011, roč. 130, č. 3, s. 310–324. doi 10.1016/j.pharmthera.2011.02.004.
- [45] KNEKT, P, J KUMPULAINEN, R JARVINEN, H RISSANEN, M HELIOVAARA, A REUNANEN, T HAKULINEN a A AROMAA. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002, roč. 76, č. 3, s. 560–568.
- [46] ARAUJO, Joao R, Pedro GONCALVES a Fatima MARTEL. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*. 2011, roč. 31, č. 2, s. 77–87. doi 10.1016/j.nutres.2011.01.006.
- [47] RAMOS, Sonia. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007, roč. 18, č. 7, s. 427–442. doi 10.1016/j.jnutbio.2006.11.004.
- [48] ADHAMI, Vaqar Mustafa, Arshi MALIK, Najia ZAMAN, Sami SARFARAZ, Imtiaz Ahmad SIDDIQUI, Deeba Nadeem SYED, Farrukh AFAQ, Farrukh Sierre PASHA, Mohammad SALEEM a Hasan MUKHTAR. Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*. 2007, roč. 13, č. 5, s. 1611–1619. doi 10.1158/1078-0432.CCR-06-2269.
- [49] MASUDA, M, N SUZUI a I B WEINSTEIN. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research*. 2001, roč. 7, č. 12, s. 4220–4229.
- [50] MUKHOPADHYAY, A, C BUESO-RAMOS, D CHATTERJEE, P PANTAZIS a B B AGGARWAL. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene*. 2001, roč. 20, č. 52, s. 7597–7609. doi 10.1038/sj.onc.1204997.
- [51] RATAN, H L, W P STEWARD, A J GESCHER a J K MELLON. Resveratrol - A prostate cancer chemopreventive agent? *Urologic Oncology*. 2002, roč. 7, č. 6, s. 223–227. doi 10.1016/S1078-1439(02)00194-1.
- [52] EMILIA JUAN, M, Uwe WENZEL, Hannelore DANIEL a Joana M PLANAS. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, roč. 56, č. 12, s. 4813–4818. doi 10.1021/jf800175a.
- [53] VIJAYABABU, M R, A ARUNKUMAR, P KANAGARAJ, P VENKATARAMAN, G KRISHNAMOORTHY a J ARUNAKARAN. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2006, roč. 287, č. 1-2, s. 109–116. doi 10.1007/s11010-005-9085-3.
- [54] ONG, C S, E TRAN, T T T NGUYEN, C K ONG, S K LEE, J J LEE, C P NG, C LEONG a H HUYNH. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in

nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncology Reports*. 2004, roč. 11, č. 3, s. 727–733.

[55] BANERJEE, Sanjeev, Yiwei LI, Zhiwei WANG a Fazlul H SARKAR. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*. 2008, roč. 269, č. 2, SI, s. 226–242. doi 10.1016/j.canlet.2008.03.052.

[56] GONG, L J, Y W LI, A NEDELJKOVIC-KUREPA a F H SARKAR. Inactivation of NF-kappa B by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene*. 2003, roč. 22, č. 30, s. 4702–4709. doi 10.1038/sj.onc.1206583.

[57] LEE, H J, C J WANG, H C KUO, F P CHOU, L F JEAN a T H TSENG. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, roč. 203, č. 2, s. 124–131. doi 10.1016/j.taap.2004.08.004.

[58] YIN, F, A E GIULIANO, R E LAW a A J VAN HERLE. Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Research*. 2001, roč. 21, č. 1A, s. 413–420.

[59] LIJINSKY, W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1999, roč. 443, č. 1-2, s. 129–138. doi 10.1016/S1383-5742(99)00015-0.

[60] KAGAN, V E a Y Y TYURINA. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. In: M HARMAN, D AND HOLLIDAY, R AND MEYDANI, ed. *Annals of the New York Academy of Sciences*. S.l.: s.n., 1998, s. 425–434. ISBN 1-57331-108-1.

[61] OHSHIMA, H, Y YOSHIE, S AURIOL a I GILIBERT. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998, roč. 25, č. 9, s. 1057–1065. doi 10.1016/S0891-5849(98)00141-5.

[62] VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK. *Biosynthesis of Food Components*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 2008, 497 s. ISBN 978-80-86659-12-1.

[63] LUO, Xiu-Ju, Jun PENG a Yuan-Jian LI. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European journal of pharmacology* [online]. 10. 1. 2011, roč. 650, č. 1, s. 1–7. [cit. 2013-03-08]. doi 10.1016/j.ejphar.2010.09.074. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946891>.

[64] SURH, Y J a S S LEE. Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* [online]. March 1996, roč. 34, č. 3, s. 313–6. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621114>.

[65] YANG, Zhong-Hua, Xing-Huan WANG, Huai-Peng WANG, Li-Quan HU, Xin-Min ZHENG a Shi-Wen LI. Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization.

Urology [online]. March 2010, roč. 75, č. 3, s. 735–41. [cit. 2013-04-10]. doi 10.1016/j.urology.2009.03.042. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592070>.

[66] ZHANG, Jie, Makoto NAGASAKI, Yuetsu TANAKA a Shigeru MORIKAWA. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia research* [online]. March 2003, roč. 27, č. 3, s. 275–83. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12537981>.

[67] LEE, Seong-Ho, Raphael L RICHARDSON, Roderick H DASHWOOD a Seung Joon BAEK. Capsaicin represses transcriptional activity of β -catenin in human colorectal cancer cells. *The Journal of nutritional biochemistry* [online]. June 2012, roč. 23, č. 6, s. 646–55. [cit. 2013-04-09]. doi 10.1016/j.jnutbio.2011.03.009. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764279>.

[68] MALAGARIE-CAZENAVE, Sophie, Nuria OLEA-HERRERO, Diana VARA, Cecilia MORELL a Inés DÍAZ-LAVIADA. The vanilloid capsaicin induces IL-6 secretion in prostate PC-3 cancer cells. *Cytokine* [online]. June 2011, roč. 54, č. 3, s. 330–7. [cit. 2013-04-10]. doi 10.1016/j.cyto.2011.03.010. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474332>.

[69] CIAPETTI, G, E CENNI, L PRATELLI a A PIZZOFERRATO. In vitro evaluation of cell biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. 1993, roč. 14, č. 5, s. 359–364. doi 10.1016/0142-9612(93)90055-7.

[70] STOCKERT, Juan C, Alfonso BLAZQUEZ-CASTRO, Magdalena CANETE, Richard W HOROBIN a Angeles VILLANUEVA. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*. 2012, roč. 114, č. 8, s. 785–796. doi 10.1016/j.acthis.2012.01.006.

[71] CHOI, K H, S K MAHESWARAN a C S CHOI. Colorimetric assay using XTT for assessing virulence of avian pasteurilla-multocida strains. *Veterinary Microbiology*. 1995, roč. 45, č. 2-3, s. 191–200. doi 10.1016/0378-1135(94)00134-I.

[72] LU, J H, Y T CHIU, H W SUNG, B HWANG, C K CHONG, S P CHEN, S J MAO, O Z YANG a Y CHANG. XTT-colorimetric assay as a marker of viability in cryoprocessed cardiac valve. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1997, roč. 29, č. 4, s. 1189–1194. doi 10.1006/jmcc.1996.0354.

[73] KAPLAN, L A, T L BOTT a J K BIELICKI. Assessment of [3 H] thymidine incorporation into DNA as a method to determine bacterial productivity in stream bed sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, roč. 58, č. 11, s. 3614–3621.

[74] BEHL, Berthold, Magarethe KLOS, Michael SERR, Ulrich EBERT, Bodo JANSON, Karla DRESCHER, Gerhard GROSS a Hans SCHOEMAKER. An ELISA-based method for the quantification of incorporated BrdU as a measure of cell proliferation in vivo. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006, roč. 158, č. 1, s. 37–49. doi 10.1016/j.jneumeth.2006.05.011.

[75] *The xCELLigence System: New Horizons in Cellular Analysis*. 2009, s. 1–20. Penzberg: Roche Diagnostics GmbH.

[76] xCELLigence. *Roche Applied Science* [online]. [cit. 2012-12-01]. Dostupné z: <http://www.roche-applied-science.com>

[77] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: Úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 978-80-246-1880-7.

[78] Life Technologies: Fluorescence Tutorials. *Life Technologies Corporation* [online]. 2013 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

[79] CARTER, Matt a Jennifer C SHIEH. Chapter 5 - Microscopy. In: *Guide to Research Techniques in Neuroscience* [online]. New York: Academic Press, 2010. s. 119–145. ISBN 978-0-12-374849-2. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123748492000057>.

Seznam zkratek

DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
SCLC	small cell lung cancers
NSCLC	non-small cell lung cancers
TTF-1	tyroidální transkripční faktor 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
TGF- β	transformační růstový faktor β
MS275	HDAC (benzamide histone deacetylase) inhibitor
SBHA	Suberohydroxamic acid, HDAC inhibitor
p-53	nádorový supresorový protein
FAK/PTK2	focal adhesion kinase/protein tyrosine kinase 2
1A1	sulfotransferáza
PIWIL4	protein piwi-like 4
MAML	mastermind-like transcriptional co-activators
EGCG	epigallocatechin gallate
COX	cyklooxygenáza
NF- κ B	nukleární faktor κ B (kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
ROS	reaktivní formy kyslíku
NOS	reaktivní formy dusíku
MMP	metaloproteináza
EGF	epidermální růstový faktor
JNK	terminální kináza c-Jun NH2
CDK	cyklin-dependentní kináza
TRPV-1	přechodový receptor
MTT	methylnitrotetrazoliová sůl
XTT	hydrát benzensulfonové kyseliny
BrdU	5-bromo-2-deoxy-uridin
RTCA	analýza v reálném čase
CI	buněčný index
CCD	kamera (Charge-coupled device)
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FRITC	tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
PC3	prostatická nádorová buněčná linie
PNT1A	prostatická nenádorová buněčná linie
FBS	fetální bovinní sérum

Ham's F-12	kultivační médium
RPMI 1640	kultivační médium
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
PBS	fosfátový pufr s chloridem sodným
DMSO	dimethylsulfoxid
LP	lipidová peroxidace

Obsah přiloženého CD

- Elektronická verze diplomové práce.
- Program pro analýzu snímků.
- Snímky z mikroskopu.