



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Antiangiogenní účinky vybraných přírodních sloučenin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Marek Handl**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Lucie Rárová, Ph. D.**
Termín odevzdání práce: 2013

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucí své bakalářské práce Mgr. Lucii Rárové, Ph. D. za její odbornou pomoc, cenné rady a trpělivost. Dále bych rád poděkoval vedení i pracovníkům z Laboratoře růstových regulátorů za vytvoření vhodných pracovních podmínek při vypracovávání praktické části této práce. Dále také prof. Jitce Ulrichové za poskytnutí endotelových buněk. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za jejich neutuchající podporu.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně a za použití citované literatury.

V Olomouci dne 24. 7. 2013

Podpis.....

OBSAH

OBSAH.....	4
Bibliografická identifikace.....	6
Bibliographical identification.....	7
Cíle práce.....	8
1. ANGIOGENEZE.....	9
1.1 Vaskulogeneze.....	10
1.2 Angiogeneze pučením.....	10
1.3 Angiogeneze vchlipováním.....	11
1.4 Úloha pericytů v angiogenezi.....	12
1.5 Angiogenní faktory.....	12
1.5.1 Vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF).....	13
1.5.2 Růstový faktor krevních destiček (PDGF).....	15
1.5.3 Angiopoetiny a další angiogenní faktory.....	15
1.6 Antiangiogenní faktory.....	16
2. NÁDOROVÁ ANGIOGENEZE JAKO CÍL PROTIRAKOVINOVÉ LÉČBY.....	17
2.1 Hypoxie a nádorová angiogeneze.....	18
2.1.1 Úloha faktoru vyvolávajícího hypoxii 1 (HIF-1).....	18
2.2 Mechanismy inhibice nádorové angiogeneze.....	19
2.2.1 Inhibice signální dráhy VEGF/VEGFR.....	19
2.2.2 Další mechanismy inhibice.....	20
2.2.3 Steroidní sloučeniny v antiangiogenní terapii.....	21
3. BRASSINOSTEROIDY.....	23
3.1 Úloha brassinosteroidů v rostlinách.....	23
3.2 Signalizace brassinosteroidů v rostlinných buňkách.....	23
3.2.1 BRI1 kinázy a BAK1 kinázy.....	24
3.2.2 BRL proteiny.....	25
3.2.3 Aktivace receptorů brassinosteroidů.....	25
3.3 Signalizace brassinosteroidů v živočišných buňkách.....	26
3.4 Brassinosteroidy v protinádorové terapii.....	26
3.4.1 Antiangiogenní vlastnosti brassinosteroidů.....	27
4. MATERIÁL A METODY.....	28

4.1	Přístrojové a softwarové vybavení.....	28
4.2	Použité chemikálie.....	29
4.3	Biologický materiál.....	29
4.4	<i>In vitro</i> rýhový test (Scratch assay).....	29
4.4.1	Princip testu.....	29
4.4.2	Barvení buněk pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250.....	30
4.4.3	Barvení buněk pomocí Crystal Violet a Ponceau S.....	30
4.4.4	Vyhodnocení pomocí "in house" softwaru.....	31
4.5	Test kapilární formace <i>in vitro</i> (Tube formation assay).....	31
4.5.1	Princip testu.....	31
4.5.2	Vyhodnocení testu.....	32
5.	VÝSLEDKY.....	33
5.1	<i>In vitro</i> rýhový test.....	33
5.1.1	Vyhodnocení účinku testovaných látek.....	33
5.1.2	Optimalizace vyhodnocovacího procesu.....	35
5.2	Vyhodnocení testu kapilární formace <i>in vitro</i>	38
6.	DISKUZE.....	41
7.	ZÁVĚR.....	44
	SEZNAM ZKRATEK.....	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	47

Bibliografická identifikace

Autor	Marek Handl
Název práce	Antiangiogenní účinky vybraných přírodních sloučenin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Rárová, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Angiogeneze je proces tvorby krevních kapilár, který hraje důležitou úlohu při růstu solidních nádorů. Z tohoto důvodu je angiogeneze již desítky let předmětem intenzivního výzkumu za účelem nalezení vhodných inhibitorů pro aplikaci v protinádorové terapii. Nedávno byly pozorovány antiangiogenní vlastnosti rostlinných hormonů brassinosteroidů. Teoretická část této práce je věnována dosaženým poznatkům v oblasti angiogeneze a jejich využití v nádorových terapiích se zaměřením na inhibiční efekt brassinosteroidů. Experimentální část se zabývá vyhodnocením vybraných testů <i>in vitro</i> angiogeneze s cílem nalézt potenciálně vhodné sloučeniny s antiangiogenním účinkem z řad přírodních brassinosteroidů a jejich derivátů a dále také optimalizací samotného procesu vyhodnocování.</p>
Klíčová slova	Angiogeneze, růstové faktory, protinádorová terapie, brassinosteroidy
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author	Marek Handl
Title of thesis	Antiangiogenic effects of chosen natural compounds
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Lucie Rárová, Ph. D.
The year of presentation	2013
Abstract	Angiogenesis is a process of blood capillaries formation which plays an important role in a development of solid tumours. Therefore the angiogenesis has been a scope of an intensive research to find suitable inhibitors for use in anticancer therapy for decades. Recently, the antiangiogenic properties of plant hormones brassinosteroids have been observed. The theoretic part deals with known findings in the field of angiogenesis and their use in anticancer therapy especially the exploitation and suppressive effect of brassinosteroids. The experimental part is focused on the evaluation of selected angiogenesis <i>in vitro</i> aimed to find potentially suitable compounds of the natural brassinosteroids and their derivates with antiangiogenic effect. An essential part of the thesis is dedicated to the description of the evaluating process.
Keywords	Angiogenesis, growth factors, anticancer therapy, brassinosteroids
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

CÍLE PRÁCE

Vypracování literární rešerše týkající se zejména dosažených poznatků v oblasti angiogeneze a jejich využití v protinádorových terapiích.

Pomocí vyhodnocení příslušných testů *in vitro* angiogeneze nalézt potenciálně vhodné inhibitory migrace endotelových buněk a kapilární *in vitro* formace.

Optimalizace barvení fixovaných endotelových buněk na mikrotitračním panelu.

Optimalizace procesu vyhodnocení pomocí speciálního "in house" softwaru.

1. ANGIOGENEZE

Fyziologicky hraje angiogeneze významnou úlohu zejména v raných fázích života jedince. Jedná se o komplexní proces tvorby a růstu krevní cév z již předem existujících (Carmeliet 2000; Folkman 1975; Folkman 1985; Risku 1997). Během angiogeneze se uplatňuje řada genetických a vnějších vlivů. V dospělosti se angiogeneze uplatňuje zřídka a dochází k ní například při hojení ran nebo při ovulaci. Bylo také dokázáno, že je angiogeneze stimulována svalovými kontrakcemi v důsledku vzniku oxidu dusnatého při vasodilataci cév. (Prior *et al.* 2004).

Již v roce 1661 bylo italským lékařem Marcellem Malpighim objeveno, že kapiláry propojují tepny a žíly. Hrají tedy klíčovou roli při přenosu kyslíku do tkání. Zároveň jsou důležité pro přísun ostatních živin a pro odvod oxidu uhličitého a odpadních produktů metabolismu. Jedná se o cévy nejmenší s průměrem 5 - 20 μm a složené pouze z jedné vrstvy endotelových buněk. Tyto buňky jsou v těsné blízkosti s minimem mezibuněčného prostoru a jsou spojeny pevnými buněčnými spoji. Společně jsou endotelové buňky přisedlé na bazální membránu. Jedná se o tenkou dvojrstvu mezibuněčné hmoty (Paulsson 1992) obsahující například kolagen IV. typu, proteoglykany a laminin, který jak bylo zjištěno, urychluje diferenciaci endotelových buněk při tvorbě kapilár (Kubota *et al.* 1988). Membrána tvoří především mechanickou bariéru a uplatňuje se také při regeneraci. Velmi častým modelem pro sledování mechanismů angiogeneze je dvoukřídlý hmyz *Drosophila melanogaster* Meigen s podobnou organizací tracheálních cév jako u cév savčích.

Kromě významné role angiogeneze během života se tento mechanismus uplatňuje v řadě patofyziologických procesů jako je diabetes mellitus 2. typu, při kterém se tvoří abnormální cévy vyživující sítnici, což může mít za následek poruchy zraku až úplnou slepotu. Tvorbou vadných cév během tohoto onemocnění mohou být postiženy i ledviny a plod (Martin *et al.* 2003). Poruchy tvorby cév se podílejí také na rozvoji revmatoidní artritidy (Koch 2003) nebo řady kardiovaskulárně ischemických chorob (Cao *et al.* 2005). Zejména pak nekontrolovaný růst cév hraje významnou roli během růstu solidních nádorů (Conway *et al.* 2001).

1.1 Vaskulogeneze

Již v raném embryonálním vývoji dochází ke tvorbě prvních krevních cév, které jsou nezbytné jak pro výživu embrya, tak také pro přenos signálů důležitých při rozvoji orgánů. Samotnému procesu angiogeneze předchází v zárodku zvaný vaskulogeneze, při které cévy vznikají *de novo* z prekurzorových buněk. Vaskulogeneze tedy není závislá na přítomnosti existujících cév jako je tomu v případě angiogeneze. Na vaskulogenezi se podílejí zejména progenitory endotelových buněk. Tyto buňky patří mezi buněčný typ pocházející z kostní dřeně. Progenitory nejprve migrují, dělí se a nakonec se diferencují v samotné endotelové buňky. V závěru se buňky zformují do jednoduché cévní sítě (Goldie *et al.* 2008). Novější poznatky však naznačují, že se tyto progenitory podílejí na vzniku nových cév i v dospělém jedinci (Rafii *et al.* 2002). V experimentu kdy byly izolovány progenitory endotelových buněk z lidské krve, u kterých docházelo k *in vitro* diferenciaci v endotelové buňky, se tyto buňky následně podílely na tvorbě nových cév (Asahara *et al.* 1997).

1.2 Angiogeneze pučením

Nejčastějším mechanismem tvorby nových kapilár je angiogeneze pučením (Sprouting angiogenesis). Celý proces je zahájen navázáním příslušných signálních molekul na receptory endotelových buněk. Jedná se zejména o navázání vaskulárního růstového faktoru (Vascular endothelial growth factor - VEGF), který zde způsobuje zvýšení permeability bazální membrány. Tímto mechanismem je umožněn únik fibrinogenu a plasminogenu z kapiláry a přeměna na fibrin a plasmin. Síť vláken tvořená těmito dvěma bílkovinami tvoří základ pro vznik nové cévy. Dále dochází k rozkladu bazální membrány, který je zapříčiněn působením enzymů matrixmetaloproteáz. Ty jsou v endotelových buňkách produkovány jako odpověď na signál a jsou zodpovědné za degradaci buněčných spojů a okolní extracelulární matrix. Tyto proteázy v buňkách

spadají pod přísnou regulaci. Negativně jsou regulovány delta like ligandem (DLL4), který aktivuje receptory notch1 a notch4 (Huang *et al.* 2010).

Receptory notch patří mezi transmembránové proteiny složené z velké extracelulární domény, která je zodpovědná za vazbu s příslušným ligandem, zatímco intracelulární za přenos samotného signálu (Brou *et al.* 2000). Ligandy receptorů notch jsou zpravidla jiné transmembránové proteiny. Z tohoto důvodu je tento typ signalizace možný pouze mezi sousedícími buňkami. Při kontaktu extracelulární části receptoru s ligandem se extracelulární část receptoru odštěpí a je pohlcena do buňky exprimující ligand. Posléze je odštěpena i intracelulární doména receptoru za pomoci γ -sekretázy a je transportována do jádra, kde po vazbě s transkripčními faktory ovlivňuje expresi řady genů (Kopan 2002).

Notch receptory jsou součástí Notch signální dráhy, která se podílí na regulaci mnoha buněčných procesů. Kromě řízení migrace prostřednictvím matrixmetaloproteáz při tvorbě cév, má tato signální dráha vliv také na proliferaci a diferenciaci buněk během embryonálního vývoje (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1999). DLL4 a receptory notch se podílejí i na zrání nově vytvořených kapilár tím, že napomáhají migraci pericytů, popřípadě při tvorbě cév jiných než kapilár, také migraci buněk hladké svaloviny (Steward *et al.* 2011). Endotelové buňky se poté v důsledku působení matrixmetaloproteáz oddělí od původní kapiláry, dělí se a migrují v extracelulární matrix ve směru gradientu růstových faktorů, přičemž se vytváří pupen. Následně se migrující endotelové buňky zachycují v síti fibrinových vláken (Karkkainen, Petrova 2000) a nakonec se zformují v lumen cévy (Colville-Nash a Willoughby 1997). Nevýhodou u tohoto typu angiogeneze je potřeba spojená s buněčným dělením (Burri *et al.* 2004).

1.3 Angiogeneze vchlipováním

Tento typ angiogeneze (Splitting angiogenesis) je procesem probíhajícím zejména v hustě vaskularizovaných tkáních jakou je cévnatka oka nebo trávicí trakt a týká se zejména tvorby žil a tepen. Výhodou tohoto typu angiogeneze je, že zde není primární potřeba buněčného dělení, což činí tento proces rychlejší.

Proto se tento proces hojně uplatňuje v embryonálním vývoji, kde jsou nároky na proliferaci celkově zvýšené (Burri *et al.* 2004).

Fakticky zde dochází k rozdělení původní cévy na dvě. V první fázi se k sobě přiblíží dvě protější stěny cévy. V místě styku stěn dochází k perforaci, která umožňuje průnik růstových faktorů do dutiny cévy. Perforace je následně vyplňována zejména buňkami hladké svaloviny. Nakonec dojde k obalení vnější stěny pericyty, stabilizaci kolagenními vlákny produkovaným buňkami hladké svaloviny a k samotnému rozdělení cévy.

1.4 Úloha pericytů v angiogenezi

Ve zralých cévách jsou buňky endotelu obklopeny pericyty. Jedná se o buněčný typ mezenchymatického původu, známý i pod názvem Rougetova buňka, který je zodpovědný za stabilitu a funkci endotelových buněk (Sims 1986). Typický pericyt má velké jádro, obsah cytoplasmy a množství výběžků, kterými je přichycen k vnější stěně kapiláry. Ve své cytoplazmě bílkoviny jako například aktin a myosin. Hrají tedy roli i při v regulaci toku krve nebo při formaci nových cév (Hirschi a D'Amore 1996). S endotelovými buňkami jsou pericyty spojeny pomocí konexonů. Jedná se speciální spoje spojující cytoplasmy dvou sousedních buněk, které umožňují prostup různým molekulám a iontům (Lampe *et al.* 2004). Tyto spoje umožňují parakrinní signalizaci mezi buňkami endotelu a pericyty.

1.5 Angiogenní faktory

Jedná se obecně o chemické a mechanické faktory, jejichž působení podporuje proces angiogeneze. Jsou to zejména různé růstové faktory, cytokiny, integriny, adhezivní molekuly (Bergers a Benjamin 2003), které se účastní angiogenní kaskády. Výsledkem jejich působení může být například buněčná migrace nebo proliferace. Mechanického může k angiogenezi docházet i vlivem zánětu a zejména pak tkáňovým nedostatkem kyslíku (hypoxie). Vzhledem k poměrně

širokému spektru faktorů vyvolávajících angiogenezi, bude v této kapitole uvedeno pouze několik vybraných.

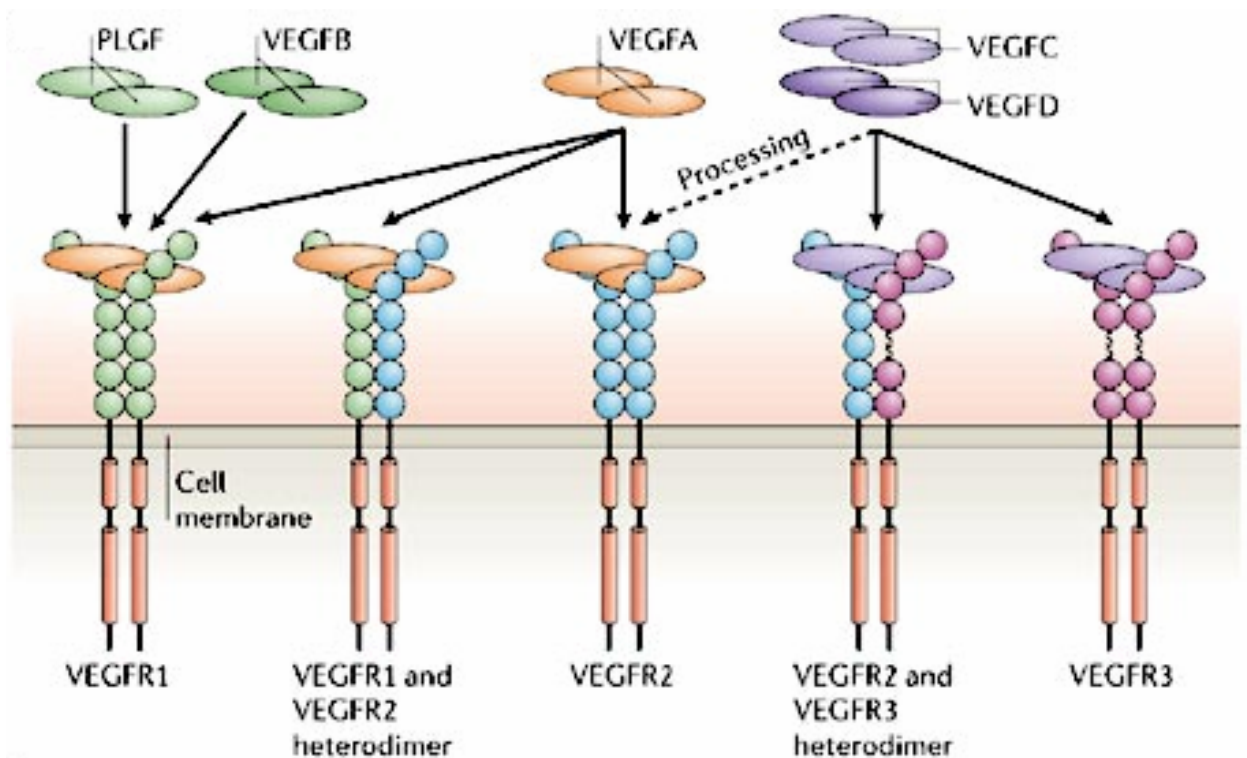
1.5.1 Vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF)

VEGF je skupina signálních bílkovin (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PLGF), které mají majoritní význam pro zahájení a průběh angiogeneze. Hlavní cílovou buňkou pro VEGF jsou buňky endotelu, které na svůj povrch exprimují příslušné receptory. Za fyziologických podmínek je VEGF produkován například monocyty (Connolly *et al.* 1989) nebo pericyty (Darland *et al.* 2003). Nejvýznamnější z této skupiny a zároveň nejlépe prozkoumanou je forma VEGF-A (Ferrara 2002) rozpoznávaný dvěma tyrosin kinázovými receptory: VEGFR-1 a VEGFR-2 (Ferrara 2004). Velmi důležitým pozitivním regulátorem exprese VEGF-A je hypoxie (Safran a Kaelin 2003). Signální kaskáda zprostředkovaná vazbou na VEGFR-1 je zodpovědná například za vybuzení exprese matrixmetaloproteáz v endotelových buňkách (Hiratsuka *et al.* 2002) a hraje tedy důležitou roli při buněčné migraci. Dále se podílí na uvolňování některých růstových faktorů produkováných v buňkách endotelu. Za některých okolností může tento receptor VEGFR-1 fungovat i jako tzv. „decoy“ receptor, který odvádí VEGF-A a zabraňuje tak interakci s VEGFR-2 (Ferrara 2004). Novější poznatky poukazují, že role tohoto receptoru má i významnou úlohu při hematopoéze nebo při stimulaci buněk pocházejících z kostní dřeně (Hattori *et al.* 2003). Vazba VEGF-A na receptor VEGFR-2 vede k proliferaci endotelových buněk. Podílí se také na zvyšování permeability nově vzniklých cév (Dvorak *et al.* 1995) aktivací endotelové syntázy oxidu dusnatého a jeho následnou produkcí.

Faktor VEGF-B je specifický na receptory VEGFR-1 (Olofson *et al.* 1998) a neuropilin-1 (NP-1) (Makinen *et al.* 1999). Vzhledem k podobnostem v uspořádání sekvencí a způsobu vazby na receptory jako u VEGF-A (Li a Ericsson 2001), byl VEGF-B léta považován za důležitý angiogenní faktor. Některé provedené studie tuto teorii potvrdily (Silvestre *et al.* 2003; Wright, 2002; Mould *et al.* 2005), naopak existuje i řada těch, které VEGF-B za faktor vyvolávající angiogenezi nepovažují (Aase *et al.* 2001; Reichelt *et al.* 2003).

Jak však bylo zjištěno, je VEGF-B nezbytný nejen pro přežití endotelových buněk, ale také pericytů a buněk hladké svaloviny a to tak, že se podílí na regulaci exprese genů důležitých pro jejich přežití prostřednictvím obou příslušných receptorů (Zhang *et al.* 2009).

Na receptor VEGFR-1 se s vysokou afinitou váže i placentární růstový faktor (Placenta growth factor - PLGF), specifický i na pomocné receptory NP-1 a NP-2. Tento faktor významně napomáhá růstu a migraci buněk endotelu. Za fyziologických podmínek je produkován buňkami stromatu a jeho tvorba a uvolňování je stimulováno zejména hypoxií. Navázání PLGF na VEGFR-1 může mimo jiné působit i ve prospěch interakce VEGF-A/VEGFR-2 tak, že PLGF zablokuje vazebné místo pro VEGF-A. Mimo účinku PLGF na buňky endotelu, působí tento faktor i na makrofágy nebo buňky pocházející z kostní dřeně, které na svůj povrch také exprimují VEGFR-1. Faktory VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E se podílejí především na novotvorbě lymfatických cév v zárodečném vývoji, kde se váží na receptor VEGFR-3.



Obrázek 1 Rodina růstových faktorů VEGF a receptory VEGFR (převzato z Olsson *et al.* 2006).

1.5.2 Růstový faktor krevních destiček (PDGF)

Faktory ze skupiny PDGF (Platelet-derived growth factor) jsou dalšími důležitými molekulami uplatňující se v procesu tvorby kapilár, které se vyskytují ve formě homo- nebo heterodimerů (Fredriksson *et al.* 2004). Za normálních podmínek jsou produkovány buňkami endotelu, hladké svaloviny, makrofágy a samozřejmě i krevními destičkami. Jedním ze skupiny je forma PDGF-B, která je specifická na receptor PDGFR- β (Lindhal *et al.* 1997). Jedná se o receptor typu tyrosin kináza, exprimovaný progenitorovými buňkami pericytů, které se vlivem interakce s PDGF-B diferencují a dozrávají v dospělé pericyty (Song *et al.* 2005). PDGF-B je zpravidla produkován a secernován v endotelových buňkách ve formě homodimeru PDGF-BB. Jak PDGF-B, tak i jeho receptor PDGFR- β , jsou oba produkovány zejména v nově vznikajících cévách (Hellstrom *et al.* 1999), kde stimulací již dospělých pericytů, dochází ke stabilizaci a následnému dozrávání nové cévy (Lindhal *et al.* 1997). Dle novějších studií však interakce PDGF-B s PDGFR- β dokáže navodit i buněčné dělení a migraci u progenitorů endotelových buněk (Sufen *et al.* 2011).

Faktory PDGF-A a PDGF-C mají vysokou afinitu k receptoru PDGFR- α , kterým disponují zejména buňky stromatu. Po vazbě na receptor jsou schopny indukovat angiogenezi a to zejména zvýšením produkce a vylučováním VEGF-A buňkami stromatu (Li *et al.* 2000). Tento mechanismus je hojně využíván nádorovými buňkami.

1.5.3 Angiopoetiny a další angiogenní faktory

Angiopoetiny 1 a 2 (ANG1; ANG2) mají zdánlivě protichůdné účinky a obvykle působí jako pozitivní regulátory kaskády VEGF/VEGFR (Huang *et al.* 2010). Mají výraznou chemotaxi k endotelovým buňkám a jejich angiogenní vlastnosti jsou umožněny vazbou na tyrosin kinázový receptor TIE-2 (Scharpfenecker *et al.* 2005) ANG1, který je produkován především buňkami pocházejícími z kostní dřeně. Odpovědí je destabilizace endotelových buněk při zahájení tvorby nové kapiláry, zatímco ANG2, produkováný v těchto buňkách,

se podílí na přestavbě a maturaci nově vytvořené cévy. Kaskáda ANG1/TIE-2 je také schopna navozovat apoptózu buněk endotelu.

Jako důležitý mitogenní faktor byl klasifikován fibroblastický růstový faktor (Fibroblast growth factor - FGF), vyskytující se ve dvou formách a to jako kyselý aFGF (acidic FGF) a zásaditý bFGF (basic FGF). Tyto formy jsou za fyziologických podmínek uvolňovány aktivovanými T-lymfocyty a makrofágy. Kromě pozitivního účinku na buněčné dělení, zabraňuje tento faktor apoptóze endotelových buněk (Folkman a Klagsburn 1987).

Nepřímo se v angiogenezi uplatňují také transformující růstový faktor (TGF- α) a epidermální růstový faktor (EGF), které podněcují secernaci VEGF a FGF. Významná úloha připadá též integrinům, což jsou transmembránové bílkoviny, produkované endotelovými buňkami, které modulují migraci a přilnavost k nově vznikající kapiláře. Na závěr zmiňme skupinu signálních molekul interleukinů, které mohou zvyšovat expresi receptorů v buňkách endotelu pro další signální molekuly a podílejí se i na stimulaci jejich buněčného dělení a migraci.

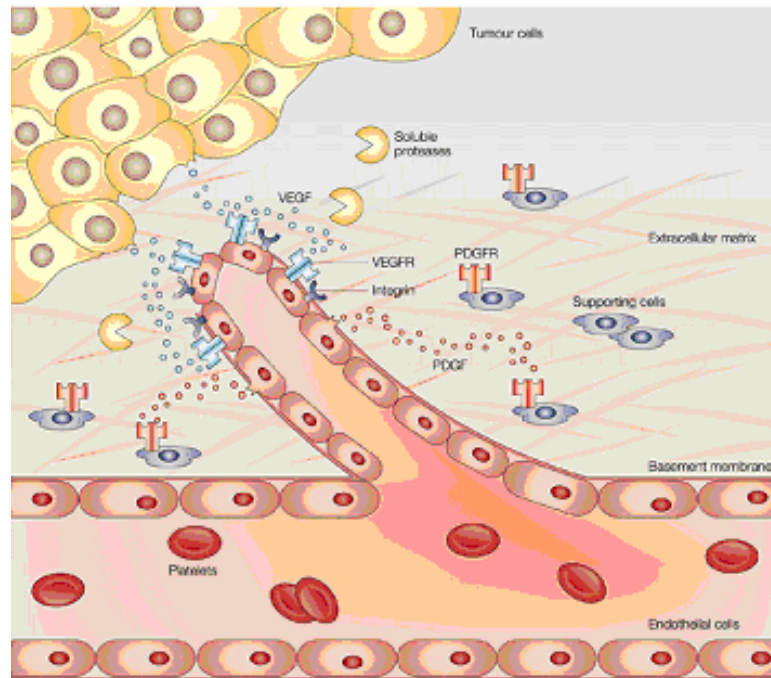
1.6 Antiangiogenní faktory

Nejdéle známým přirozeným antiangiogenním faktorem je trombospondin (Bornstein 2009). Jedná se o glykoprotein, který je regulátorem adheze, dělení a přežití endotelových buněk, u kterých je schopen navozovat buněčnou smrt (Rusk *et al.* 2006) Mezi negativní regulátory angiogeneze patří i vazohibin, exprimovaný v endotelu vlivem aktivace kaskády VEGF-A/VEGF-2 (Hosaka *et al.* 2009), který mechanismem zpětné vazby inhibuje transkripci VEGFR (Watanabe *et al.* 2004). Faktory vazostatin a angiostatin jsou štěpné produkty plasminogenu, které blokují migraci a dělení endotelových buněk a navozují jejich buněčnou smrt.

2. ANGIOGENEZE JAKO CÍL PROTINÁDOROVÉ TERAPIE

Již od začátku 70. let je znám zásadní význam angiogeneze pro růst a metastazování nádorů (Folkman 1971). Z těchto důvodů se angiogeneze stala předmětem intenzivního výzkumu a také slibnou léčebnou strategií při léčbě nádorových onemocnění. Mechanismy nádorové angiogeneze se nijak zásadně neliší od angiogeneze probíhající za fyziologického stavu avšak nádorové cévy jsou dobře rozpoznatelné, jelikož na rozdíl od cév normálních jsou nevyzrálé, s poškozenou strukturou, bez souvislé bazální membrány a s výrazným úbytkem stabilizačních buněk jakými jsou pericyty. Důsledkem je špatný průtok krve nádorem, který vede k hypoxii a tím k dalšímu procesu tvorby defektních cév. Tento jev také významně ovlivňuje průnik různých typů léčiv k nádoru. Nádorové cévy můžeme na první pohled rozeznat podle nahodilého a chaotického směru jejich růstu (Baish a Jain 2000).

V procesu nádorové angiogeneze jsou nádorové buňky zdrojem řady angiogenních faktorů, které jsou jimi zejména vlivem hypoxie v hojné míře uvolňovány. Mimo hypoxie mají na uvolňování angiogenních faktorů vliv i některé růstové faktory (VEGF-A; angiopoetiny, PDGF-A a C), cytokiny a produkty onkogenů. V důsledku tohoto stavu dochází k deregulaci celého procesu ve prospěch tvorby nových cév, které k nádoru přivádějí kyslík a živiny. V průběhu růstu nádoru postupně vzrůstá tolerance k nádorovým buňkám různých nemaligních buněčných typů, jako jsou například buňky endotelu, stromatu nebo makrofágy. Postupně se tímto způsobem vytvářejí stále příznivější podmínky pro další růst nádoru a jeho šíření (Witz 2009).



Obrázek 2 Schématické znázornění pučení cévy v důsledku růstových faktorů produkovaných nádorovými buňkami (převzato z Cristofanilli *et al.* 2002)

2.1 Hypoxie a nádorová angiogeneze

Hypoxie je klíčovým spouštěcím faktorem nejen fyziologické, ale i nádorové tvorby cév. V případě, že nádorové ložisko přesáhne velikost přibližně 1-2 mm³, není schopno dále přijímat kyslík z okolní tkáně prostou difuzí a není tedy schopno dalšího růstu (Folkman 1971). V tomto bodě dochází k angiogennímu přepnutí (Folberg *et al.* 2000), které vede k potlačení přirozených antiangiogenních faktorů ke zvýšené tvorbě faktorů angiogenních.

2.1.1 Úloha faktoru vyvolávajícího hypoxii 1 (HIF-1)

Procesu, který byl naznačen v předcházející kapitole, je za normálních podmínek zabráněno vlivem působení proteinu VHL. Tento protein je produktem exprese von Hippel-Lindauova (VHL) genu, který je léta znám jako důležitý nádorový supresor. Úlohou tohoto proteinu je ubiquitinace HIF-1, která je nezbytná pro jeho degradaci v proteazomu (Safran a Kaelin 2003). Vlivem

získané či vrozené mutace VHL genu však není jeho produkt schopen této funkce. Schopnost nádorových buněk přežít za stavu hypoxie je závislá na zvýšeném přepisu genů anaerobního metabolismu.

Jedná se o heterodimer, který se skládá z podjednotek HIF-1 α a HIF-1 β (Wang a Semenza 1995). Aktivita HIF-1 je určována stabilitou HIF-1 α proteinu. Za normoxických podmínek jsou obě podjednotky HIF-1 exprimovány, HIF-1 α je však v buňce degradován. V hypoxických podmínkách je ubiquitinace proteinu blokována a jeho intracelulární koncentrace stoupá. Koncentrace HIF-1 β není na množství kyslíku závislá (Huang *et al.* 1996). Vysoká exprese tohoto faktoru je spojena s vyšší agresivitou nemoci, rychlejší proliferací a zvýšenou expresí VEGF (Bos *et al.* 2001). Většina genů aktivovaných hypoxií může být zjištěna jen v hypoxických nádorech a v normálních tkáních jsou nedetekovatelné (Lee *et al.* 2008).

2.2 Mechanismy inhibice nádorové angiogeneze

Při léčbě solidních nádorů se uplatňuje řada mechanismů, které s různou účinností vedou k potlačení tvorby nových cév. Z tohoto hlediska můžeme rozlišovat dva základní přístupy. Prvním z nich je aplikace antiangiogenních faktorů, která byla léta součástí léčby nádorových onemocnění. V této souvislosti byla připravena řada derivátů přirozených inhibitorů angiogeneze. Největší pozornost byla věnována přípravku ABT-510. Jedná se o nonapeptid, který vykazuje vlastnosti přirozeného trombospondinu. I přes skutečnost, že je tento mechanismus méně účinný, uplatňuje se v klinické praxi a neustále se pracuje se na jeho vylepšení. Větší pozornost se naopak upírá k léčebným strategiím založených na potlačení faktorů angiogenních. V této kapitole bude uvedeno několik nejvýznamnějších.

2.2.1 Inhibice signální dráhy VEGF/VEGFR

Jedná se o neprostudovanější a pravděpodobně nejúčinnější způsob inhibice nádorové angiogeneze, který je umožněn dvěma základními

mechanismy. Prvním z nich je užití antagonistů VEGF. Nečastěji se jedná o monoklonální protilátky, jejichž výhodou je vysoká specifita a nízká toxicita. Tyto protilátky rozpoznávají a vážou se na konkrétní sekvence aminokyselin na molekulách VEGF. Tímto způsobem je zabráněno vazbě VEGF na receptor a příslušné odpovědi na signál (Bergsland 2004). Klasickým příkladem takovéto protilátky může být humanizovaná látka bevacizumab, známá též pod komerčním názvem Avastin[®]. Jedná se o rekombinantní monoklonální protilátku sloužící k inhibici všech lidských forem VEGF (Zondor 2004). Kromě monoklonálních protilátek může být inhibičního efektu dosaženo také za použití aptamerů. Obecně se nejčastěji se jedná o bílkoviny, které jsou, stejně jako monoklonální protilátky, sestaveny tak, že se specificky váží na určité místo na cílové molekule. Nejznámějším zástupcem z této skupiny je látka pegatinib (Macugen[®]), která se užívá pro inhibici VEGF-A (Gragoudas *et al.* 2004).

Druhým přístupem při blokování této signální kaskády je zabránění správné funkce VEGFR (Tille *et al.* 2001). Tohoto cíle může být dosaženo blokadou vnitrobuněčné tyrosinkinásové domény receptoru, zpravidla použitím malých molekul inhibitorů tyrosin kináz nebo aplikací monoklonálních protilátek specifických na VEGFR a zabraňující tak vazbě příslušných ligandů (Bergsland 2004). V praxi se k tomuto účelu běžně aplikuje látka axitinib (Inlyta[®]) (Ebos a Kerbel 2011). Mimo jejich inhibičních účinků na VEGFR se axitinib úspěšně využívá i pro inhibici signální dráhy PDGF/PDGFR. Stejně účinky jako u axitinibu byly objeveny také u řady dalších sloučenin jako například sorafenib (Nexavar[®]) nebo sunitinib (Sutent[®]).

2.2.2 Další mechanismy inhibice

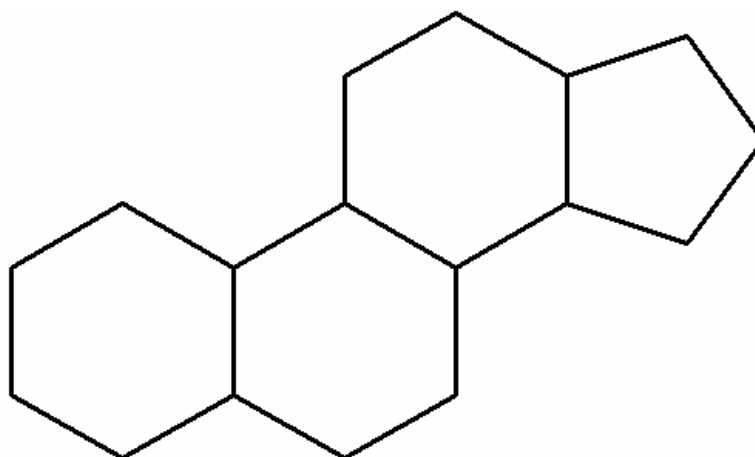
Principy, které se uplatňují při blokování signální dráhy VEGF/VEGFR nacházejí využití také při inhibici PDGF/PDGFR. Bylo zjištěno, že zvýšená exprese PDGF v solidních nádorech urychluje jejich růst (Ostman 2004). Při zablokování PDGFR- β dochází ke snížené aktivaci pericytů, k vazodilataci cév v nádoru a ke snížení tlaku v intersticiální kapalině, které usnadňuje transport léčiv v nádoru. V praxi se často uplatňuje aplikace léčiv se schopností blokovat

kaskádu PDGF/PDGFR v kombinaci s inhibicí VEGF/VEGFR, případně i dalších signálních drah zprostředkovaných faktory jako jsou FGF nebo EGF.

Jiným přístupem vedoucím k potlačení cévního systému v nádorech může být také využití látek, které narušují stěnu cév. Jedná se o obecně o sloučeniny, které vykazují cytotoxický účinek vůči již vzniklým nádorovým cévám (Gridelli *et al.* 2009). Mezi takové patří například kombrestatiny (Zweifel *et al.* 2011). Jedná se skupinu látek izolovaných z rostliny *Combretum caffrum* Kuntze, které vyvolávají apoptózu endotelových buněk a destabilizují mikrotubuly, což má za následek nekrózu cév nádoru (Horsman a Siemann 2006). Podobné účinky jako kombrestatiny vykazují také flavonoidy, které rostliny produkují jako své sekundární metabolity (Majewska-Wierzbicka a Czczot 2012). Za zmínku stojí protinádorová chemoterapeutika a některá jiná léčiva mající výrazný antiangiogenní efekt. Jedná se zejména o cytostatika jako například taxany, antracyklinová antibiotika nebo inhibitory topoizomerázy I.

2.2.3 Steroidní sloučeniny v antiangiogenní terapii

Mezi první molekuly, u kterých byl zjištěn antiangiogenní účinek, patřily steroidní sloučeniny. Základem jejich struktury je cyklopentano-perhydrofenantren neboli steran, který se skládá ze tří šestiuhlíkatých cyklů a jednoho pětiuhlíkatého. Tyto látky vykazují rozličné účinky na nádorový cévní systém, mezi které se řadí zpomalování proliferace a navození buněčné smrti v buňkách endotelu nebo inhibice produkce aktivátoru plasminogenu, potažmo buněčné migrace. Mezi látky s nejsilnějšími antiangiogenními vlastnostmi patří z této skupiny 11- α -hydrokortison a tetrahydrokortisol (Teicher *et al.* 1998).



Obrázek 3 Strukturní vzorec steranu

Řada steroidních sloučenin s antiangiogenní aktivitou vykazovala lepší účinek v modelových organismech v přítomnosti heparinu nebo látek jemu podobných (Folkman *et al.* 1983). Z těchto steroidů se však do fáze klinických testů dostal pouze medroxyprogesteron, který byl podáván pacientům s již dříve léčenou rakovinou prsu (Jakobsen *et al.* 1986). Výsledky studie však poukázaly, že tato látka vykazuje pouze zanedbatelnou inhibiční aktivitu a do praxe uveden nebyl.

Ve fázi klinických testů se v současné době nachází 2-methoxyestradiol. Jedná se o metabolit ženského pohlavního hormonu estradiolu, který v *in vitro* podmínkách potlačuje migraci a proliferaci buněk endotelu. Mimo to je schopen v těchto buňkách navozovat apoptózu a to bez interakce s klasickými receptory pro steroidní hormony (LaVallee *et al.* 2002). U 2-methoxyestradiolu byl pozorován i antiangiogenní efekt v podmínkách *in vivo* (Mooberry 2003). Mechanismus jeho působení není zcela objasněn. Výzkumy však naznačují, že se jedná o inhibitor HIF-1 α (Ricker *et al.* 2004), který je navíc zodpovědný za depolymerizaci mikrotubulů v buňkách endotelu (Mabjeesh *et al.* 2003). Na závěr zmiňme směs přírodních steroidů s názvem squalamin, která byla poprvé izolována z tkáně žraloka *Squalus acanthias* L. a která stejně jako 2-methoxyestradiol inhibuje proliferaci a migraci endotelových buněk (Teicher *et al.* 1998).

3. BRASSINOSTEROIDY

Brassinosteroidy patří do skupiny steroidních rostlinných hormonů. Obecně jsou rostlinné hormony neboli fytohormony popisovány jako endogenní signální molekuly zodpovědné za komunikaci mezi pletivý a jednotlivými orgány rostlin. Objev brassinosteroidů je datován do roku 1970, kdy bylo zjištěno, že pylový extrakt získaný z rostliny *Brassica napus* L. má pozitivní vliv na proliferaci rostlinných buněk a na dlouhivý růst stonku (Mitchell *et al.* 1970). O 9 let později byl poté izolován první brassinosteroid, kterým byl brassinolid (Grove *et al.* 1979).

3.1 Úloha brassinosteroidů v rostlinách

Úloha brassinosteroidů v rostlinách spočívá především ve stimulaci růstu, ale také ve schopnosti ovlivňovat jejich adaptaci na biotický či abiotický stres (Müssig *et al.* 2001). Takovými faktory mohou být například nedostatek živin, vody, přítomnost herbicidů, chlad, případně i napadení rostliny škůdcem. Brassinosteroidy v rostlinách ovlivňují také tvorbu biomasy, diferenciaci orgánů a regulují také počet a velikost semen i plodů. Jejich důležitou funkcí je i oddalování stárnutí rostliny (Clouse 2002). Aktivita těchto hormonů je v rostlinách spojena zejména se změnami poměru hladin hormonů auxinů a cytokininů.

3.2 Signalizace brassinosteroidů v rostlinných buňkách

Brassinosteroidy u rostlin působí prostřednictvím přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. Některé studie (Müssig a Altmann 2001) předpokládají nutnost vazby samotného steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakci vzniklého komplexu s membránovým receptorem. Novější poznatky však poukaz na přímou vazbu steroidu na membránový receptor

(Kinoshita *et al.* 2005). Odpovědí na navázání signální molekuly je změna genové exprese.

3.2.1 BRI1(Brassinosteroid-insensitive 1) kinázy a BAK1 (BRI1-associated kinase 1) kinázy

BRI1 kinázy jsou vazebné proteiny brassinosteroidů, které se řadí do skupiny LRR-RLK kináz (Leucine-rich repeats receptor-like kinases) (Morillo a Tax 2006) a jsou tvořeny extracelulární a intracelulární částí, které jsou vzájemně propojeny transmembránovou doménou. Struktura jednotlivých částí BRI1 kináz se liší v závislosti na rostlině, ve které se nacházejí.

Gen pro tuto skupinu kináz byl poprvé objeven v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* Heynh., podle které dostal i své označení AtBRI1 (Li a Chory 1997). Záhy byly různé verze tohoto genu identifikovány i v dalších rostlinách jako je na příklad rýže (*Oryza sativa* L.) (Yamamuro *et al.* 2000), rajče (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Montoya *et al.*, 2002) nebo bavlník (*Gossypium hirsutum* L.) (Sun *et al.* 2004).

V případě AtBRI1 je extracelulární doména výsledného proteinu obsahuje 25 tandemově uspořádaných sekvencí leucinů (Friedrichsen *et al.* 2000), které jsou na začátku i na konci ohraničeny dvěma cysteinovými páry. Dále je zde přítomen signální peptid a motiv leucinového zipu (Clouse 2002). Intracelulární část AtBRI1 je tvořena serin threonin kinázovou doménou a CTE (Carboxy-terminal extension) oblastí (Vert *et al.* 2005). Podobná struktura jako u AtBRI1 proteinu, byla objevena i u OsBRI1, tedy receptoru nacházejícího se v již výše zmiňované rýži.

Mimo BRI1 se na přenosu signálu podílejí i BAK1 kinázy, které se výrazně neliší od zmiňovaných BRI1. Liší se však ve struktuře jejich vnitrobuněčné domény, která obsahuje mimo jiné pouze 5 tandemových sekvencí leucinů a oproti BRI1 i doménu bohatou na prolin (Nam a Li 2002).

3.2.2 BRL (BRI1-like proteins) proteiny

Jedná se o homologa BRI1, která se podobně jako BRI1 strukturně liší v závislosti na dané rostlině. Předpokládá se, že BRL po stimulaci receptoru brassinosteroidů přenáší signál zodpovědný za diferenciaci cévních buněk. Oproti BRI1, které se exprimují pouze v určitých orgánech (Yamamuro *et al.* 2000), se tyto proteiny exprimují převážně v cévních svazcích (Caño-Delgado *et al.* 2004). Jako příklad uveďme protein AtBRL1, exprimovaný převážně v kořenech, stoncích a cévních tkáních, AtBRL2 a AtBRL3, produkovaný zejména v cévních pletivech. Všechny tyto proteiny byly identifikovány v *Arabidopsis thaliana* Heynh. (Caño-Delgado *et al.* 2004) a jejich obdoby také u *Oryza sativa* L. (Yamamuro *et al.* 2000).

3.2.3 Aktivace receptorů brassinosteroidů

Pro přenos signálu je obecně zapotřebí nejprve aktivace příslušného receptoru způsobená navázáním molekuly ligandu. Jak BRI1, tak i BAK jsou v neaktivní formě ve formě homodimeru. U rostlin jsou tyto receptory lokalizovány v plazmatické membráně (Belkhadir *et al.* 2006). Dosud nebyl zcela objasněn mechanismus aktivace, ale výzkumy naznačují dva možné způsoby. Prvním z nich je navázání brassinosteroidu na extracelulární doménu BRI1, která vede k tvorbě heterodimeru s BAK a k jejich vzájemné fosforylaci (Nam a Li 2002). Podle druhého modelu dochází po navázání brassinosteroidu na BRI1 ke změně jeho konformace a teprve potom k fosforylaci BAK (Wang *et al.* 2005).

Konečným výsledkem aktivace steroidního receptoru je zejména indukce transkripce genů. Těch, jejichž přepis je indukován brassinosteroidy, je však k dnešnímu dni identifikováno poměrně málo. Jako příklad uveďme gen BRU1, poprvé izolovaný ze sóji (*Glycine max* L.), u kterého bylo zjištěno kódování enzymu xyloglukan endotransferázy (Zurek a Clouse 1994), která se svojí aktivitou podílí na přestavbách buněčných stěn (Fry *et al.* 1993). Brassinosteroidy jsou také schopny regulovat buněčný cyklus, například indukci

exprese cyklin dependentní kinázy CDC2b ve tmě (Yoshizumi *et al.* 1999) nebo cyklin kódujícího genu CycD3 (Hu *et al.* 2000).

3.3 Signalizace brassinosteroidů v živočišných buňkách

Vzhledem ke strukturním podobnostem brassinosteroidů s živočišnými steroidními hormony, jsou tyto původem rostlinné sloučeniny schopny aktivovat i živočišné steroidní receptory. Díky lipofilní povaze většiny steroidů je umožněn jejich samovolný prostup plazmatickou membránou a vazba na receptory, které jsou na rozdíl od těch rostlinných uloženy zejména v cytosolu nebo v jádře. Ty obvykle obsahují DNA-vazebnou a ligand-vazebnou doménu, signální sekvence pro lokalizaci v jádře a řadu aktivátorů transkripce.

Podobně jako u rostlin vede navázání brassinosteroidů ke konformační změně a k tvorbě di- nebo oligomeru s jiným steroidním receptorem, což ve výsledku umožňuje navázání komplexu ligand/receptor na DNA. Vazba tohoto komplexu pomocí DNA-vazebné domény receptoru přímo ovlivňuje expresi řady genů v řádu hodin až dní (Losel a Wehling 2003). Všechny neobsazené steroidní receptory jsou zpravidla asociovány s molekulárními chaperony. Jsou to komplexy bílkovin, které obecně napomáhají udržování správné konformace proteinů, nezbytné pro správnou aktivitu, například dojde-li k jejich vratnému poškození. V této souvislosti chaperony, zejména proteiny Hsp90 a Hsp56, napomáhají udržovat receptory v neaktivní formě, ale přístupné pro vazbu ligandu (Pratt 1993).

3.4 Brassinosteroidy v protinádorové terapii

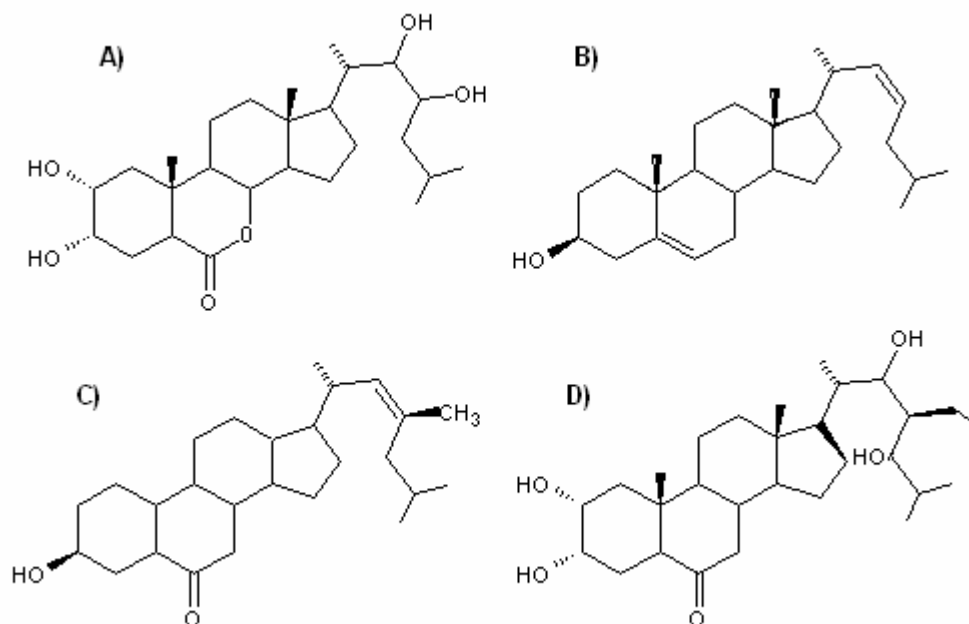
Působení brassinosteroidů na živočišné buňky jsou k dnešnímu poměrně neprozkoumanou oblastí. Nicméně byly u brassinosteroidů pozorovány některé vlastnosti, které by v budoucnu mohly být využity k terapeutickým účelům, zejména v protinádorové terapii.

Na toto téma bylo publikováno několik prací, které poukazují na jejich antiproliferativní vlastnosti. Na příklad byl zjištěn cytotoxický efekt některých přírodních brassinosteroidů, konkrétně 24-epibrassinolidu a 28-homokastasteronu na několik nádorových buněčných linií, mezi které patří linie CEM (buňky odvozené od T-lymfoblastické leukémie), MCF-7 (buňky odvozené od karcinomu prsu), A549 (buňky odvozené od karcinomu plic), HeLa (buňky odvozené od karcinomu děložního čípku) nebo HOS (buňky odvozené od osteosarkomu) (Malikova *et al.* 2008). U 24-epibrassinolidu a 28-homokastasteronu byla pozorována i schopnost zástavy buněčného cyklu v G₁ fázi, doprovázenou úbytkem buněk v S-fázi. Tento jev byl pozorován u linií karcinomu prsu a prostaty (Malikova *et al.* 2008). V případě karcinomu prsu byla pozorována i schopnost brassinosteroidů indukovat apoptózu (Steigerová *et al.* 2010).

3.4.1 Antiangiogenní vlastnosti brassinosteroidů

Jak již bylo uvedeno výše (viz. kapitola 2.2.3) vykazují některé steroidní látky antiangiogenní účinek. Vzhledem ke struktuře brassinosteroidů byl tento efekt pozorován i zde. Ve studii z roku 2012 bylo testováno několik přírodních brassinosteroidů, společně s jejich deriváty. Jedním z cílů studie bylo pozorování schopnosti těchto látek potlačovat migraci a kapilární *in vitro* formaci endotelových buněk. Bylo prokázáno, že brassinosteroidy i jejich deriváty jsou s různou účinností schopny potlačovat proces angiogeneze (Rárová *et al.* 2012).

Ve stejné studii byly také sledovány interakce lidských estrogenových receptorů α a β s vybranými přírodními brassinosteroidy a jejich deriváty v souvislosti s antiangiogenními vlastnostmi těchto sloučenin. Dle výsledků je schopnost vazby brassinosteroidů k estrogenovým receptorům velmi omezená a předpokládá se tedy, že antiangiogenní efekt brassinosteroidů je uskutečňován jiným mechanismem.



Obrázek 4 Strukturní vzorce vybraných brassinosteroidů: A) 24-epibrassinolid B) brassikasterol C) 6-oxokampestanol D) 28-homokastasteron

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Přístrojové a softwarové vybavení

Při experimentech bylo použito následující přístrojové a softwarové vybavení: inverzní mikroskop IX51(Olympus Optical, Tokyo, Japonsko); digitální kamera DP71 (Olympus Optical, Tokyo, Japonsko); programy DP Controller a DP Manager (Olympus Optical, Tokyo, Japonsko); ruční vakuová odsávačka; laboratorní třepačka; "in house" software pro vyhodnocení *in vitro* rýhového testu; "in house" software pro vyhodnocení testu *in vitro* kapilární formace; program Microsoft Excel.

4.2 Použité chemikálie

Pro provedení experimentů byly použity tyto chemikálie: barvicí roztok Coomasie Brilliant Blue G-250 (450 ml metanolu; 450 ml vody; 100 ml kyseliny octové; 1 g Coomasie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)); 0,2% (w/v) barvicí roztok Ponceau S (AppliChem GmbH, Darmstadt, Německo) v kyselině octové; 0,01% (w/v) barvicí roztok Crystal Violet (AppliChem GmbH, Darmstadt, Německo) v ethanolu; odbarvovací roztok (100 ml methanolu; 100 ml kyseliny octové; 800 ml vody). Dále byly použity standardy: 2-methoxyestradiol (10 μM ; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); axitinib (0,03 μM ; (Pfizer, New York City, New York, USA)).

4.3 Biologický materiál

Byly použity buňky Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) izolované z pupečnickové žíly metodou kolagenázové digesce (McGregor *et al.*, 1994) na Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci. Buňky byly po provedení testů *in vitro* kapilární formace a *in vitro* rýhového testu inkubovány při 37°C s 5% obsahem CO₂ v atmosféře a při 100% vzdušné vlhkosti.

4.4 *In vitro* rýhový test (Scratch assay)

4.4.1 Princip testu

In vitro rýhový test (Scratch assay) slouží ke sledování schopnosti testovaných látek potlačovat migraci buněk *in vitro*. K provedení testu se využívá 24-jamkových mikrotitračních panelů. Nejprve se buňky adherují na dno každé jamky. Po 24 hodinách, kdy je dno jamek pokryto jednou vrstvou buněk, se na dno každé z nich provede rýha za pomoci špičky automatické pipety. Pro vyhodnocení je důležité, aby byly rýhy provedeny stejnoměrně doprostřed

každé jamky. Následně je aplikována testovaná látka, která je rozpuštěna v endotelovém růstovém médiu s obsahem růstových a faktorů a fetálního séra. Pro negativní kontrolu je buňkám podáváno médium M199, které růstové faktory neobsahuje a buňky v něm nemohou migrovat. Pro pozitivní kontrolu je na buňky nanášeno pouze endotelové růstové médium. Test byl proveden vedoucím práce ve sterilních podmínkách, který provedl i 24-hodinovou fixaci 4% roztokem formaldehydu a jeho následné odsání. Buňky jsem následně obarvil a test vyhodnotil s využitím "in house" softwaru.

4.4.2 Barvení buněk pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250

Z 24-jamkových mikrotitračních panelů zafixovaných 4% formaldehydem byl odsát formaldehyd a poté jsem přidal 500 μ l barviva Coomassie Brilliant Blue G-250. Panely jsem poté ponechal 60 minut na třepačce. Po třepání jsem barvivo odstranil a do jamek pipetoval 500 μ l odbarvovacího roztoku. Panely jsem opětovně ponechal na třepačce po dobu 30 minut s následným odsáním odbarvovacího roztoku a bez víka nechal vyschnout po dobu minimálně 24 hodin.

4.4.3 Barvení buněk pomocí Crystal Violet a Ponceau S

Z 24-jamkových mikrotitračních panelů zafixovaných 4% formaldehydem byl odsát formaldehyd a poté jsem přidal 250 μ l barviva Crystal Violet (Ponceau S). Po 10 minutách jsem barvivo odsál, jamky intenzivně několikrát promyl destilovanou vodou a poté vyklepal na papírové utěrky pro lepší odstranění barviva. Panely bez víka jsem ponechal vyschnout po dobu minimálně 24 hodin.

4.4.4 Vyhodnocení pomocí "in house" softwaru

Jamky jsem vyfotografoval za pomoci kamery zabudované v inverzním mikroskopu napojeného na PC. Za pomoci programů DP Controller a DP Manager jsem upravil kontrast, nastavil černobílý režim a rýhu provedenou v jamce jsem manipulací s kamerou vhodně vycentroval. Jamky jsem fotografoval při 40x násobném zvětšení mikroskopu. Následně jsem fotografie jednotlivých panelů nahrál do speciálního "in house" softwaru (Fürst a Rárová, 2011). Software bylo nejprve třeba zkalibrovat za použití referenční fotografie negativní kontroly. Kalibraci jsem provedl označením části plochy pokryté a plochy nepokryté buňkami. Na základě kontrastu byl poté v sérii fotografií automaticky vyhodnocen obsah nepokryté plochy. Každý panel, tj. jedna série fotografií jsem takto vyhodnotil celkem ve třech opakováních. Při každém opakování jsem opětovně kalibroval pomocí stejné fotografie, ale s odlišným tvarem a velikostí označených ploch. Výsledky byly poté softwarem automaticky exportovány do textového souboru. Data jsem zanesl do tabulky v programu Microsoft Excel. Z hodnot ze všech tří opakování jsem vypočítal průměr, stejně jako z hodnot jednotlivých koncentrací v triplicátu. Účinek jednotlivých testovaných látek jsem vyjádřil jako relativní účinek (%) k průměru provedeného ze všech použitých negativních kontrol, který představoval 100 %.

4.5 Test kapilární formace *in vitro* (Tube formation assay)

4.5.1 Princip testu

V testu *in vitro* kapilární formace (Tube formation assay) bylo využito speciálních Ibidi® sklíček (Ibidi GmbH, Mnichov, Německo). Tato sklíčka jsou tvořena dvojrstevným plastem s vnitřním a vnějším kruhem. Vnitřní kruh je vyplněn Matrigelem® (Schubert & Weiss-OMNILAB Co. KG, Mnichov,

Německo). Jedná se o směs proteinů bazální membrány a růstových faktorů umožňujících migraci endotelových buněk (např. PDGF nebo EGF). Vnější kruh Ibidi® sklíček slouží pro nanášení suspenze buněk v endotelovém růstovém médiu s rozpuštěnou testovanou látkou. Buňky v přítomnosti růstových faktorů migrují na povrchu Matrigelu® a formují se zde v kapiláry. Každá látka byla aplikována ve třech koncentracích a každá koncentrace byla nanášena v triplicátu. Pro kontrolu byly buňky nanášeny pouze v přítomnosti endotelového růstového média. Test byl proveden vedoucím práce ve sterilních podmínkách. Následně byla provedena 24-hodinová inkubace.

4.5.2 Vyhodnocení testu

Po 24-hodinové inkubaci byla jednotlivá Ibidi® sklíčka, na kterých byl test proveden vyfotografována. Test jsem poté vyhodnotil za pomoci speciálního "in house" softwaru vytvořeného pro tento typ testu (Fürst a Kryštof, 2011). Software po označení všech vytvořených kapilár kurzorem myši vyhodnotil na jednotlivých fotografiích řadu parametrů, které byly exportovány do textového souboru. Pro vyhodnocení byly vybrány dva parametry. Jedním z nich byl celkový počet kapilár na fotografii, druhým pak celkový počet spojů mezi vzniklými kapilárami. U každé koncentrace jednotlivých testovaných látek jsem spočetl průměr a směrodatnou odchylku, stejně tak i v případě standardů a kontrol. Zjištěná experimentální data jsem vnesl do grafů a tabulek za použití programu Microsoft Excel.

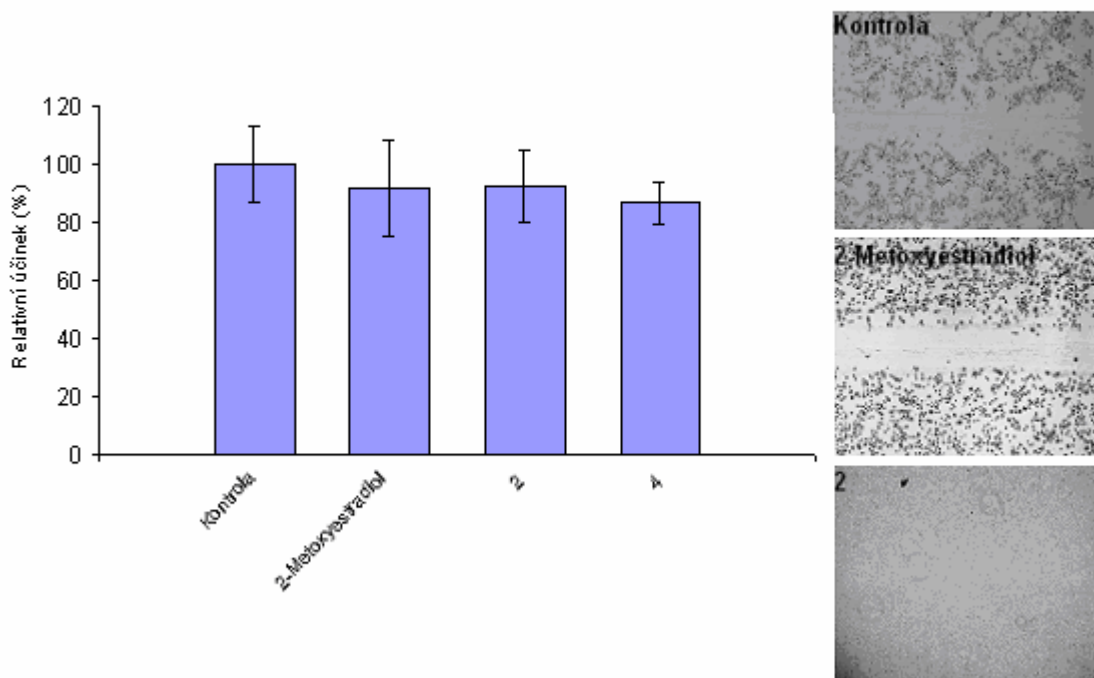
5. VÝSLEDKY

5.1 *In vitro* rýhový test

5.1.1 Vyhodnocení účinku testovaných látek

Účelem testu bylo zjištění schopnosti testovaných brassinosteroidů a jejich derivátů potlačovat migraci buněk HUVEC *in vitro*. Vyhodnocení jsem provedl za pomoci "in house" softwaru. Všechny látky byly testovány minimálně ve třech různých koncentracích v triplicátu. Účinek jednotlivých testovaných látek jsem vyjádřil jako relativní k průměru provedeného ze všech negativních kontrol, který představoval 100 %.

Ze všech testovaných látek nejlépe potlačovala migraci buněk sloučenina **2** a to o 92,1 % v koncentraci 30 μM ve srovnání s pozitivní kontrolou 2-methoxyestradiolem (91,4 %) v koncentraci 20 μM . S vysokou účinností inhiboval migraci také derivát **4** (86,8 %). Účinek výše zmíněných látek jsem zanesl do grafu 1. Aktivita zbývajících látek byla méně významná nebo žádná. V některých případech jsem naměřil i vysoké směrodatné odchylky způsobené zejména špatnou kvalitou fotografií při vyhodnocování spojenou s barvením buněk nebo způsobem označení ploch v softwaru. Všechny naměřené hodnoty a hodnoty směrodatných odchylek jsou zobrazeny v tabulce 1.



Graf 1 Účinek 30 μ M roztoku látky **2**, 20 μ M 2-methoxyestradiolu a 20 μ M roztoku látky **4** na migraci buněk HUVEC v *in vitro* rýhovém testu. Pro negativní kontrolu byly buňky HUVEC kultivovány v médiu M199. Hodnoty jsou procentuálně vyjádřeny ke 100 % představovaných průměrem z negativních kontrol. Uvedeny jsou i hodnoty směrodatných odchylek z triplicátů, které byly softwarem vyhodnoceny ve třech opakováních.. Buňky s 20 μ M 2-methoxyestradiolem, 30 μ M **2** a buňky negativní kontroly jsou zobrazeny na fotografiích.

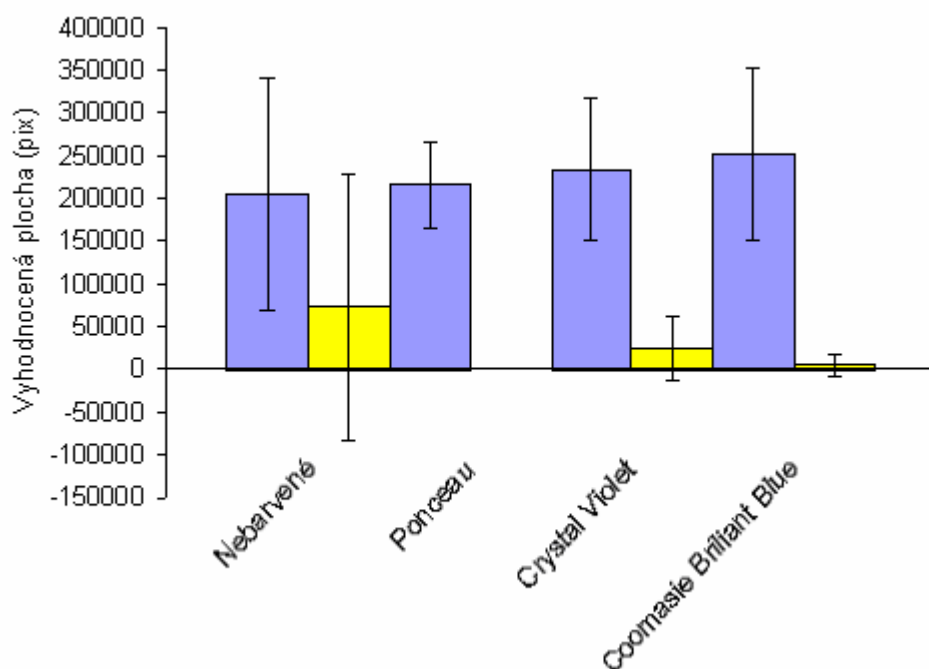
Koncentrace (µM)	1	5	10	15	20	25	30	40	50
24-Epibrassinolid	-	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-	-
28-Homokastasteron	-	-	0±0	-	0±0	-	0,3±0,5	-	-
2-Methoxyestradiol	3,6±4,1	-	65,9±10,1	-	91,4±18,1	-	-	-	-
5α-Cholestan	-	0±0	-	-	-	0±0	-	-	0,6±1
6-Deoxokastasteron	-	-	0,2±0,2	-	14±12,3	-	52±29,7	-	-
6-Oxokampestanol	-	-	9,7±9,2	-	3,4±2,8	-	8,6±14,9	-	-
D3-Brassinolid	-	-	6,6±5,1	-	2,7±3,4	-	1,2±1,1	-	-
D3-Kastasteron	-	-	0,6±0,2	-	6,9±0,2	-	20,3±22,9	-	-
Dolicholid	-	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-	-
Estradiol	-	3,4±3,6	-	-	-	18,2±7,7	-	-	40,9±12,8
Estron	-	3,7±1,9	-	-	-	12,9±7,9	-	-	40,2±12,5
Kampestanol	-	-	21,9±12,2	-	3,5±5,3	-	13,1±11	-	-
Kastasteron	-	-	1±1,7	-	7,8±13	-	11±11,7	-	-
S,S-24-Epikastasteron	-	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-	-
Teasteron	-	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-	-
Tyfaosterol	-	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-	-
1	-	5,3±6,3	8±7,4	2,2±1,8	-	40,8±18,9	-	-	306,2±186
2	-	4,8±1,7	1,4±0,7	-	26,8±18,6	35,5±12,7	92,1±13,4	-	114±33,2
3	-	178,8±21,6	-	-	-	115,9±77	-	-	103,2±28,4
4	-	-	23,2±38,2	-	86,8±8,3	-	110,9±63,1	-	-
5	-	6,1±3,8	-	-	-	6,7±2,2	-	-	88,6±96,6
6	-	0±0	-	-	0±0	-	-	-	0±0,1
7	-	4,6±4	0±0	-	0±0	62,8±13,1	-	-	299±75,9
8	-	-	75±103,3	-	63,5±40,7	-	76,5±19,2	67,8±65,9	-
9	-	76,1±62,7	-	-	-	169,1±7	-	-	2,3±1
10	-	3,7±2,3	-	1±1,6	-	5,9±6,3	20,4±15,3	-	30,7±20,7
11	-	2,4±2,5	-	-	-	0,6±1	-	-	13,9±17,1
12	-	6,1±2,2	-	-	-	13,5±11,3	-	-	30,9±19,6
13	-	-	0,5±0,8	-	0±0	-	0±0	-	-
14	-	3±4,7	-	-	-	1,1±1,2	-	-	30,7±10,8
15	-	0±0	-	-	-	1,8±2,8	-	-	144,8±41,1
16	-	-	0±0	-	0±0	-	2,5±4,3	-	-
17	-	0±0	-	-	-	134,6±53,9	-	-	236±73,9
18	-	4,9±5,9	-	-	-	11,9±3,9	-	-	24,1±15,2
19	-	5±5,4	-	-	-	66,5±52,4	-	-	0,4±0,3
20	-	2,2±2,2	-	-	-	14,7±9,3	-	-	60,5±10,2
21	-	2,7±2,7	-	-	-	2,3±2,7	-	-	12,6±15
22	-	-	1,7±2,8	-	23,5±8	-	24,1±3,9	-	-
23	-	-	18,6±3,4	-	39,6±17,8	-	79,7±35,8	-	-
24	-	39,2±19,2	-	-	-	26±20,8	-	-	25,2±7,8
25	-	10,4±3,6	-	-	-	0,8±0,7	-	-	80±122,9
26	-	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-	-
27	-	0,1±0,1	-	-	-	18,4±18,6	-	-	27,9±17,1
28	-	1±0,8	-	-	-	7,9±7,5	-	-	15,8±20,4

Tabulka 1 Naměřené hodnoty z *in vitro* rýhového testu pro testované brassinosteroidy a jejich deriváty, které byly aplikovány v několika různých koncentracích. Hodnoty jsou relativní (%) vzhledem k průměru, který byl proveden ze všech použitých negativních kontrol, a který představuje 100 %. V tabulce jsou uvedeny také hodnoty směrodatných odchylek z triplikátů, které byly softwarem vyhodnoceny ve třech opakováních.

5.1.2 Optimalizace vyhodnocovacího procesu

Pro optimalizaci vyhodnocení testu byly buňky barveny roztoky barviv Ponceau S, Crystal Violet a Coomasie Brilliant Blue G-250 za účelem dosažení nevhodnější kvality a kontrastu pro vyhodnocení v "in house" softwaru. Pro

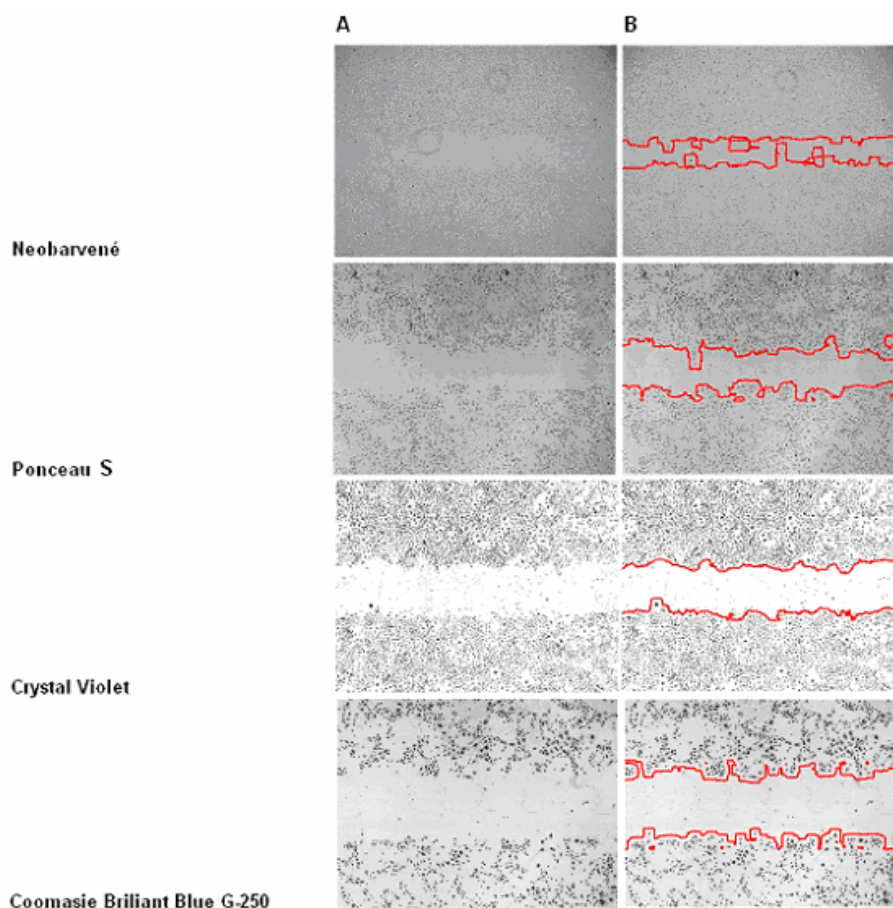
srovnání barviv jsem použil průměry naměřených hodnot z negativních a pozitivních kontrol s kontrolami neobarvenými. Hodnoty uvedené v tabulce 2 vyjadřují plochu vyhodnocenou softwarem, do kterého byla zadána jako nepokrytá buňkami. Uvedeny jsou i směrodatné odchylky. Naměřené hodnoty jsou uvedeny také v grafu 2. Největší plochu negativních kontrol jsem vyhodnotil u barviva Coomasie. Nejnižší naopak u neobarvených buněk, u kterých jsem však naměřil nejvyšší hodnotu pozitivních kontrol. Výrazně nižší hodnotu pozitivních kontrol jsem naměřil u barviva Crystal Violet a zanedbatelnou i u barviva Coomasie. Ukázky vyhodnocených a nevyhodnocených fotografií negativních a pozitivních kontrol pro různé způsoby barvení, jsou vyobrazeny na obrázcích 4 a 5. V tabulce 3 jsou procentuálně vyjádřeny hodnoty k průměru z negativních kontrol a pozitivních kontrol neobarvených buněk, který představuje 100 %.



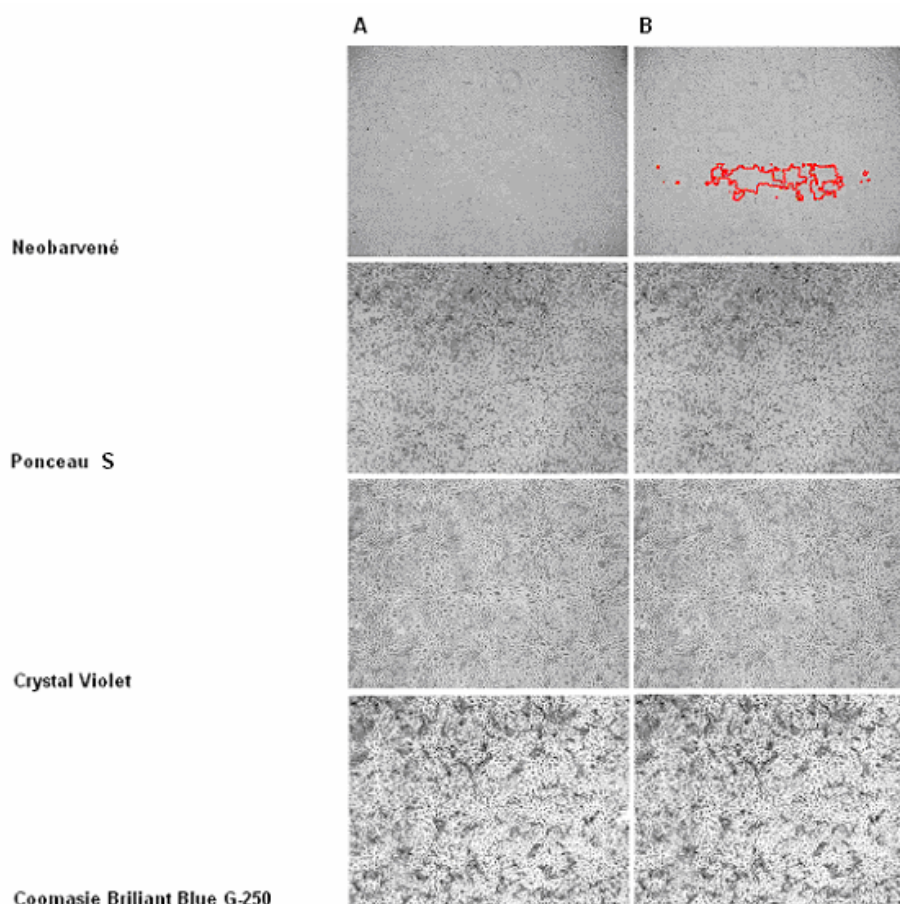
Graf 2 Srovnání vyhodnocených ploch fotografií *in vitro* rýhového testu z negativních kontrol (modře) a pozitivních kontrol (žlutě) pro jednotlivá barviva. Pro srovnání jsou uvedeny i hodnoty z fotografií buněk, které obarveny nebyly. Hodnoty jsou uvedeny v pixelech. Zobrazeny jsou i směrodatné odchylky.

	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola
Neobarvené	100±66,51	100±211,93
Ponceau S	105,42±23,89	0,17±284,29
Crystal Violet	114,01±35,94	33,65±152,04
Coomasie Brilliant Blue G-250	122,98±40,43	6,99±230,03

Tabulka 2 Naměřené hodnoty vyhodnocených ploch fotografií z negativních a pozitivních kontrol *in vitro* rýhového testu pro jednotlivá barviva. Hodnoty v levém sloupci jsou vyjádřeny k průměru z negativních kontrol neobarvených buněk, který představuje 100 %. Hodnoty v pravém sloupci jsou vyjádřeny k průměru z pozitivních kontrol neobarvených buněk, který představuje 100 %. V tabulce jsou uvedeny také hodnoty směrodatných odchylek z triplikátů, které byly softwarem vyhodnoceny ve třech opakováních.



Obrázek 5 Vybrané fotografie negativních kontrol *in vitro* rýhového testu. Ve sloupci A jsou zobrazeny nevyhodnocené fotografie pro použitá barviva. Stejně vyhodnocené fotografie jsou zobrazeny ve sloupci B. Pro srovnání jsou uvedeny také fotografie neobarvených buněk.

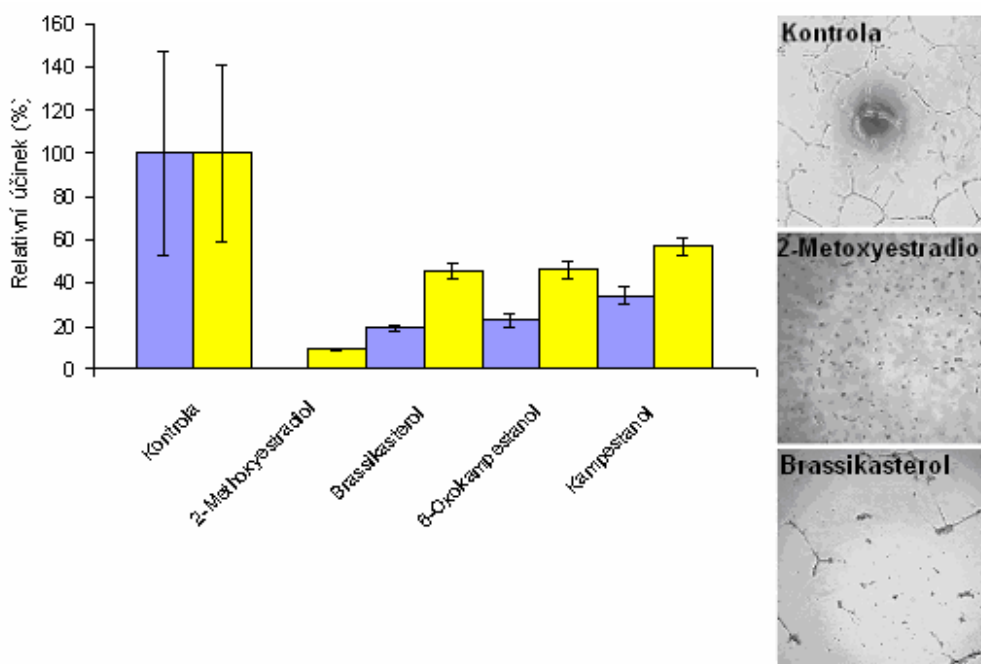


Obrázek 6 Vybrané fotografie pozitivních kontrol *in vitro* rýhového testu. Ve sloupci A jsou zobrazeny nevyhodnocené fotografie pro použitá barviva. Stejně vyhodnocené fotografie jsou zobrazeny ve sloupci B. Pro srovnání jsou uvedeny fotografie neobarvených buněk.

5.2 Vyhodnocení testu kapilární formace *in vitro*

Cílem tohoto experimentu bylo studium inhibice angiogeneze *in vitro*. Na buňkách HUVEC byly testovány přirozené brassinosteroidy a jejich deriváty, které byly aplikovány v koncentracích 10, 20 a 30 μM . Standard 2-methoxyestradiol byl použit v koncentraci 10 μM , axitinib v koncentraci 0,3 μM . K vyhodnocení jsem použil speciální "in house" software. Inhibiční účinek jsem vyjádřil procentuálně k průměru, který jsem vypočítal ze všech kontrolních Ibidi® sklíček. Tento průměr představuje 100 %, která znamenají nulový účinek. Naměřené hodnoty s jejich směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v tabulce 3. Účinek tří testovaných látek, které nejlépe inhibovaly oba sledované parametry, je procentuálně zobrazen v grafu 3, ve kterém je zanesena i hodnota standardu

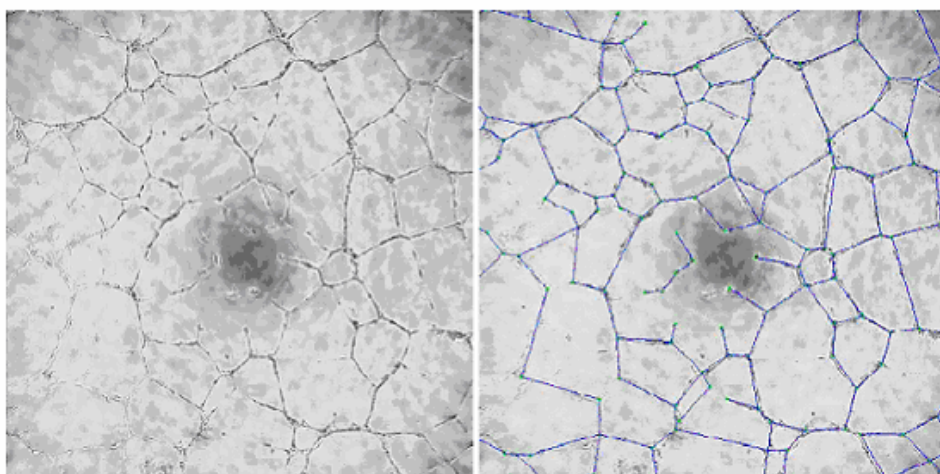
2-methoxyestradiolu. Z testovaných látek byl nejvíce účinný brassikasterol, který inhiboval tvorbu kapilár (45,3 %) i tvorbu spojů (18,8 %). Velmi podobný výsledek jsem naměřil i pro 6-oxokampestanol a kampestanol. Uvedené hodnoty se vztahují ke koncentraci 30 μ M. Ve srovnání s použitými standardy byla však jejich inhibiční aktivita nedostačující. Zbývající testované sloučeniny byly z hlediska antiangiogenního účinku méně významné nebo jejich hodnoty převyšovaly 100 %. V některých případech jsem naměřil i příliš vysoké směrodatné odchylky, které značně zkreslují výsledek. Tyto odchylky jsou způsobeny zejména tím, že jsem zde prováděl softwarové vyhodnocení pouze jedenkrát pro každou látku testovanou v triplicátu, tudíž zde byly vzhledem k lišícím se stavům buněk v jednotlivých Ibidi® sklíčkách pozorovatelné rozdíly. Důvodem, proč bylo vyhodnocení provedeno pouze jedenkrát je jeho vysoká časová náročnost. Na obrázku 6 je zobrazena nevyhodnocená a vyhodnocená fotografie kontroly.



Graf 3 Účinek 30 μ M brassikasterolu, 6-oxokampestanolu a kampestanolu na *in vitro* kapilární formaci buněk HUVEC ve srovnání s kontrolním 10 μ M 2-methoxyestradiolem. Kontrolním buňkám nebyla podávána žádná testovaná látka. Buňky s testovaným 30 μ M brassikasterolem, 10 μ M 2-methoxyestradiolem a buňky kontrolní jsou zobrazeny na fotografiích. Hodnoty jsou vyjádřeny jako relativní účinek (%) ke 100 % představovaných průměrem z kontrol a vyjadřujících nulový účinek.

Konzentrace (μM)	Spoje				Kapiláry			
	0,3	10	20	30	0,3	10	20	30
Axitinib	0±0	-	-	-	0±0	-	-	-
2-Metoxyestradiol	-	1,1±2	-	-	-	8,9±5,5	-	-
24-Epibrassinolid	-	124,2±34,3	52,7±26,7	118,5±53,9	-	127,2±21,6	69,2±27,6	129,8±36,3
24-Epikastasteron	-	39,5±20,4	39,5±14,9	56,5±50,2	-	56,1±20,6	59±29,8	83,3±32,8
28-Homokastasteron	-	132,7±24,2	162,8±52,2	131,7±17,5	-	130,7±18,5	139,2±25,8	122,7±17,7
6-Deoxokastasteron	-	131,7±53,4	131,7±18,1	103,5±62,9	-	125,3±37,6	134,3±24,7	113,9±25,4
6-Oxokampestandl	-	43,3±32,1	30,1±8,6	22,6±29,3	-	59±18,7	42,5±9	45,9±8,8
Brassikasterol	-	56,5±5,6	35,8±11,8	18,8±7,8	-	74,3±9,4	56,7±19,7	45,3±8
Brassinolid	-	75,6±37	96±66,6	54,6±14,2	-	77,7±23,8	94,7±48,9	77,7±3,9
Dolicholid	-	205,1±47	190,1±71,9	214,5±44,8	-	162,1±21,4	148,5±34,7	165±23,6
Dolichosteron	-	186,3±31,4	201,3±28,4	173,1±64,2	-	147,4±11,6	153±18	146,2±34
Homobrassinolid	-	50,8±44,1	67,7±20,4	73,4±48,9	-	82,2±20,1	87,9±21	98,1±24,8
Homodolicholid	-	208,9±28,2	301,1±81,1	261,6±6,5	-	157,6±26,1	217,7±28	195±11,9
Homodolichosteron	-	210,8±29	237,1±40,7	235,2±6,5	-	163,8±14,7	172,9±21,1	176,3±9,4
Kampestandl	-	67,7±22,6	67,7±14,9	33,9±11,3	-	77,1±16,5	74,8±11,9	56,7±7,1
Kastasteron	-	109,1±19,8	88,4±37,6	141,1±73,4	-	115,6±7,8	103,2±27,3	120,7±46,2
Kastasteron	-	111±13	101,6±53,9	165,6±62,9	-	109,4±16,3	112,8±30	150,2±30,7
S-24-Epibrassinolid	-	201,3±22,8	197,6±86,9	129,8±40,7	-	166,1±18,7	154,2±39,3	125,8±28,1
S-24-Epikastasteron	-	111±29	173,1±74,5	163,7±25,9	-	106,6±19,6	144±44,8	152,5±26,6
S-28-Homokastasteron	-	163,7±92,4	210,8±34	248,4±20,4	-	143,4±30,9	166,1±13,7	200,7±13,6
S-Homobrassinolid	-	41,4±22,8	77,2±3,3	64±23,5	-	65,2±23,2	87,3±21	87,9±13
Teasteron	-	261,6±46	276,6±58,9	287,9±11,3	-	205,2±21,6	204,1±31,2	221,6±15,2
Tyasterol	-	205,1±51,2	248,4±98,9	276,6±88,2	-	169,5±40,3	185,9±55,5	219,9±48,9

Tabulka 3 Naměřené hodnoty počtu spojů a kapilár v testu *in vitro* kapilární formace všech aplikovaných brassinosteroidů a jejich derivátů ve třech různých koncentracích. Hodnoty jsou zde vyjádřeny relativně (%) k průměru hodnot z kontrolních Ibidi® sklíček představujícího 100 %, která znamenají nulový účinek. Uvedeny jsou i hodnoty standardů axitinibu a 2-metoxyestradiolu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty směrodatných odchylek získané z triplikátů.



Obrázek 7 Libovolně zvolená vyhodnocená a nevyhodnocená fotografie kontroly z testu kapilární formace *in vitro*.

6. DISKUZE

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo vyhodnocení testů *in vitro* angiogeneze za účelem vybrat potenciálně vhodné inhibitory migrace endotelových buněk a kapilární formace z řad testovaných brassinosteroidů a jejich derivátů. Látky byly testovány na endotelových lidských buňkách HUVEC. Dále byla provedena optimalizace barvení fixovaných buněk na mikrotitračním panelu s cílem dosáhnout vhodných podmínek pro vyhodnocení *in vitro* rýhového testu.

Prvním úkolem bylo nalézt potenciálně vhodné inhibitory migrace endotelových buněk vyhodnocením *in vitro* rýhového testu za pomoci speciálního "in house" softwaru. Pouze u několika testovaných látek jsem pozoroval významnou inhibici. Nejúčinnější byl derivát **2** o koncentraci 30 μM , jejíž účinek jsem vyhodnotil jako 92,1%. Systematický název této sloučeniny je 3 β -hydroxy-7 α -homocholest-5-en-7 α -on. U tohoto derivátu brassinosteroidů byl již v minulosti zjištěn silný cytotoxický efekt na některé nádorové buněčné linie (Kohout *et al.* 1969). Ve studii z roku 2010 bylo navíc zjištěno, že je tato látka schopna úspěšně navozovat apoptózu v nádorových liniích MCF-7 a MDA-MB-468 a zvyšovat zde i expresi tumorového supresoru p53 (Steigerová *et al.* 2010).

Druhou nejvyšší hodnotu jsem naměřil u pozitivní kontroly 2-methoxyestradiolu, který potlačoval migraci na 91,4 % při koncentraci 20 μM . Jak již bylo uvedeno výše (viz. kapitola 2.2.3), je dnes 2-methoxyestradiol intenzivně studován jako potenciální protinádorové léčivo a naše výsledky pouze potvrzují dříve publikované práce na toto téma (Mooberry 2003; Machalo-Linde *et al.* 2012; Quezada *et al.* 2013). Vzhledem k nejistému výsledku sloučeniny **2**, považuji za nejúčinnější 2-methoxyestradiol, který byl barven barvivem Coomassie. Důvodem, proč tato látka jeví jako nejúčinnější je také fakt, že vykazovala druhou nejvyšší inhibici pouze v 20 μM koncentraci. Významný výsledek jsem pozoroval i u derivátu **4** o koncentraci 20 μM , jehož struktura nebyla doposud publikována. Naopak testované přirozené brassinosteroidy měly pouze zanedbatelnou schopnost inhibice, jak již bylo publikováno v minulosti (Rárová *et al.* 2012), nebo vzhledem k nepřesnostem

ve vyhodnocovacím procesu vykazovaly hodnoty, které převyšovaly kontrolu nebo vysoké směrodatné odchyly. Podobné výsledky jsem naměřil i u ženských pohlavních hormonů estronu a estradiolu a dalších derivátů brassinosteroidů.

Dílní částí této práce byla optimalizace barvení fixovaných buněk na mikrotitračním panelu s cílem dosáhnout vhodné kvality fotografií z jamek pro vyhodnocení *in vitro* rýhového testu za použití "in house" softwaru. Za tímto účelem jsem na fixované buňky aplikoval barviva Coomasie Brilliant Blue G-250, Crystal Violet a Ponceau S. Pro srovnání jsme použili fotografie neobarvených buněk, které byly dle očekávání pro vyhodnocení účinku nejméně vhodné. Porovnáním kvality obarvených buněk jsme po konzultaci s vedoucím práce zvolili pro zbytek experimentu modré barvivo Coomasie Brilliant Blue G-250, které vykazovalo nejvyšší hodnotu nepokrytých vyhodnocených ploch negativních kontrol. Srovnatelný kontrast jsem naměřil i u Crystal Violet. Oproti Coomasie Brilliant Blue G-250 je však Crystal Violet barvivo toxické a přibližně třikrát dražší. Coomasie je trifenyl metanové barvivo, které vzhledem ke svému náboji prochází pouze membránou fixovaných buněk, ve kterých vytváří komplexy s proteiny. Stejně tak je tomu i v případě Crystal Violet, které řadíme mezi barviva triaryl metanová. U tohoto barviva jsem oproti očekávání naměřil také nízkou hodnotu vyhodnocené plochy u pozitivních kontrol, což bylo způsobeno stavem použitých buněk, které nepokryly celou plochu jamky. Stejný parametr byl zanedbatelný i u barviva Coomassie. Naopak předvídatelně byla tato hodnota nejvyšší u neobarvených buněk. Posledním z testovaných barviv bylo barvivo Ponceau S, které patří mezi azobarviva a vratnou vazbou na bílkoviny vyrovnává jejich záporný náboj. Navíc je Ponceau S schopno procházet i nativní membránou. Nejmenší kontrast, s výjimkou fotografií neobarvených buněk, byl pozorován právě u fotografií buněk barvených Ponceau S. Důvodem je zřejmě snadné vymytí tohoto barviva vodou. Pro dosažení optimální kvality snímků je důležitá nejen volba vhodného barviva, ale i dostatečná míra kontrastu při pořizování fotografií, které lze dosáhnout správným nastavením ostrosti a expozice.

Je třeba zmínit, že výsledky *in vitro* rýhového testu jsou do určité míry ovlivněny právě procesem barvení a vyhodnocením v softwaru, které je závislé na plochách označených vyhodnocující osobou a je tedy do značné míry

subjektivní. Z tohoto důvodu je nezbytné provádět tento proces v sérii několika opakování. V ideálním případě pak porovnat se stejnými fotografiemi, které byly vyhodnoceny jinou osobou. Výsledky mohou být ovlivněny také stavem buněk při provádění testu. V případě lidských endotelových buněk HUVEC je doporučeno nepoužívat tyto buňky více jak do desáté pasáže. Vzhledem k faktu, že jsem proces optimalizace prováděl na panelech použitých k vyhodnocení inhibice, se domnívám, že výsledky mohou být zkreslující a to zejména v případě neobarvených buněk.

Posledním úkolem bylo zjišťování schopnosti potlačovat kapilární formaci *in vitro*. Pro vyhodnocení testu jsem použil speciální "in house" software. V tomto testu jsem se zaměřil na dva parametry. Jedním z nich byl celkový počet vytvořených kapilár, druhým potom počet spojů mezi nimi. Na rozdíl od předešlého testu zde byly přirozené brassinosteroidy znatelně účinnější. Konkrétně se jednalo o brassikasterol, který ze všech testovaných sloučenin nejlépe potlačoval tvorbu spojů (18,8 %) vzhledem ke kontrole, avšak na tvorbu kapilár působil o něco méně než 6-oxokampestanol (22,6 %). Ve srovnání se zmíněnou studií (Rárová *et al.* 2012) jsme zde potvrdili jednoznačnou inhibici tvorby kapilár v *in vitro* podmínkách brassinolidem, podobně jako je tomu i v případě 6-oxokampestanolu. Srovnatelné výsledky jsem mohl pozorovat i v případě kastasteronu. Účinky derivátů brassinosteroidů na oba studované parametry byly statisticky méně významné nebo zde vlivem nepřesného vyhodnocení vykazovaly některé z nich vysoké hodnoty směrodatných odchylek. Podobně jako je tomu v případě předešlého testu, zde hraje velkou roli subjektivní dojem vyhodnocující osoby. Proto je efektivnější vyhodnocení provádět opakovaně a porovnat s hodnotami naměřenými jinou osobou.

7. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabýval zejména vyhodnocováním *in vitro* rýhového testu a optimalizací tohoto procesu barvením buněk, které bylo důležité pro softwarové vyhodnocení. Jako optimální jsem na základě výsledků zvolil barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250, které ve srovnání se zbývajícími použitými barvivy vykazovalo nejvhodnější požadované vlastnosti. Výsledky získané vyhodnocením v "in house" softwaru jsem použil pro zhodnocení schopnosti testovaných brassinosteroidů a jejich derivátů potlačovat migraci lidských endotelových buněk HUVEC *in vitro*. Za nejúčinnější z testovaných látek, považuji derivát **2**, který však nebyl účinnější než 2-methoxyestradiol použitý jako pozitivní kontrola. Dle výsledků jsou přirozené brassinosteroidy málo účinné pro potlačení migrace endotelových buněk.

Část této práce jsem věnoval vyhodnocení testu *in vitro* kapilární formace za použití speciálního "in house" softwaru. Sledovanými parametry byla tvorba kapilár a spojů *in vitro*. Nejlépe tento proces inhiboval přirozený brassinosteroid brassikasterol. Statisticky méně významné výsledky jsem naměřil i v případě dalších přirozeně se vyskytujících brassinosteroidů. V budoucnu je plánováno testování účinnějších derivátů těchto rostlinných hormonů.

SEZNAM ZKRATEK

ANG - Angiopoetin

AtBRI1 gene - *Arabidopsis thaliana* Heynh. brassinosteroid-insensitive gene
(Gen pro kinázu necitlivou na brassinosteroidy v *Arabidopsis thaliana* Heynh. 1)

AtBRL - *Arabidopsis thaliana* Heynh. BRI1-like proteins

BAK1 - BRI1-associated kinase 1 (BRI1-asociované kinázy 1)

BRI1 kinase - Brassinosteroid-insensitive (Kináza necitlivá na brassinosteroidy)

BRL - BRI1-like proteins (Proteiny homologní s BRI1)

BRU1 gene - Brassinosteroid upregulated gene 1 (Gen regulovaný brassinosteroidy 1)

CDC2b - Cell cycle-dependent kinase-related homolog 2b (Homolog 2b spřízněný s cyklin dependentními kinázou)

CTE - Carboxy-terminal extension (Karboxylová terminální extenze)

CycD3 - D-type cyclin 3 (Cyklin 3 typu D)

DLL4 - Delta like ligand 4

EGF - Epidermal growth factor (Epidermální růstový faktor)

FGF - Fibroblast growth factor (Fibroblastický růstový faktor)

aFGF - acidic FGF (Kyselý fibroblastický růstový faktor)

bFGF - basic FGF (Zásaditý fibroblastický růstový faktor)

HIF - Hypoxia-inducible factor (Hypoxii vyvolávající faktor)

Hsp - Heat Shock protein (Protein tepelného šoku)

LRR-RLK - Leucine-rich repeats receptor-like kinases (Kinázy bohaté na sekvence leucinů)

NP - Neuropilin

OsBRI1 gene - *Oryza sativa* L. brassinosteroid-insensitive gene 1 (Gen pro kinázu necitlivou na brassinosteroidy v *Oryza sativa* L. 1)

PDGF - Platelet-derived growth factor (Růstový faktor krevních destiček)

PDGFR - Platelet-derived growth factor receptor (Receptor pro růstový faktor krevních destiček)

PLGF - Placenta growth factor (Placentální růstový faktor)

TGF - Transforming growth factor (Transformující růstový faktor)

VEGF - Vascular endothelial growth factor (Vaskulární endotelový růstový faktor)

VEGFR - Vascular endothelial growth factor receptor (Receptro pro vaskulární endotelový růstový faktor)

VHL - von Hippel-Lindau

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aase K., von Euler G., Li X., Pontén A., Thorén P., Cao R., Cao Y., Olofsson B., Gebre-Medhin S., Pekny M., Alitalo K., Betsholtz C., Eriksson U. Vascular Endothelial Growth Factor-B–Deficient Mice Display an Atrial Conduction Defekt (2001) *Circulation*, 104: 358–364.

Artavanis-Tsakonas S., Rand M. D., Lake R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development (1999) *Science*, 284: 770–776.

Baish J. W., Jain, R. K. Fractals and cancer (2000) *Cancer Res.* 15;60(14): 3683-8.

Belkhadir Y., Chory J. Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface (2006) *Science*, 314: 1410-1.

Bergers G., Benjamin L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch (2003) *Nature Rev.*, 3: 401–409.

Bergsland EK. Vascular endothelial growth factor as a therapeutic target in cancer. (2004) *Am J Health Syst Pharm.Review*, 61: 4-11.

Bornstein P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis (2009) *J Cell Commun Signal*, 3: 189-200.

Bos R., Zhong H., Hanrahan C. F., Mommers E.C., Semenza G. L., Pinedo H. M., Abeloff M.D., Sommons J.W., van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis (2001) *J Natl Cancer Inst* 93: 309-314.

Brou C., Logeat F., Gupta N., Bessia C., LeBail O., Doedens JR., Cumano A., Roux P., Black R.A., Israël A. A novel proteolytic cleavage involved in notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE (2000) *Mol. Cell* 5, 2: 207–16.

Burri P. H., Hlushchuk R. & Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance (2004) *Developmental Dynamics*, 231: 474 - 488.

Cao Y., Hong A., Schulte H., Post M. J. Update on therapeutic neovascularization (2005) *Cardiovascular Research*, 65: 639–648.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis (2000) *Nat. Med.*, 6: 389–395.

Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.C., Nam K.H., Li J., Chory J. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis* (2004) *Development*, 131 (21):5341-51.

Clouse S.D. Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression (2002) *Mol Cell*, 10: 973-82.

ColvilleNash P. R., Willoughby D. A. Growth factors in angiogenesis Current interest and therapeutic potential (1997) *Mol Med Today*, 3(1):14-23.

Connolly D.T., Heuvelman D. M., Nelson R. , Olander J. V., Eppley B.L., Delfino J.J., Siegel N.R., Leimgruber R.M., Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis (1989) *J Clin Invest*, 84: 1470–1478.

Cristofanilli M. , Charnsangavej C., Hortobagyi G.N. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches (2002) *Nature Reviews Drug Discovery*, 1: 415-426.

Darland D. C. , Massingham L. J. , Smith S. R., Piek E., Saint-Geniez M., D'Amore P.A. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial surfactant (2003) *Dev Biol*, 264:275–88.

Dvorak H., Brown L., Detmar M., Dvorak A. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis (1995) *Am J Pathol.*, 146(5):1029-39.

Ebos J.M., Kerbel R.S. Antiangiogenic therapy: impact invasion, disease progression and metastasis (2011). *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 8: 210-21.

Folberg R., Hendrix M. U., Maniotis A.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis (2000) *Am J Pathol.*, 156(2): 361-81.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors (2002) *Nat Rev Cancor* (10):795-803.

Ferrara N., Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress (2004) *Endocr Rev.*, 25(4): 581-611.

Folkman J. Tumour angiogenesis therapeutic implications (1971) *N Engl J Med*, 258: 1182-1186.

Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth (1975) *Ann. Intern. Med.*, 82: 96–100.

Folkman J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? (1983) *Lab. Invest.*, 51: 601–604.

Folkman J. Tumor angiogenesis (1985) *Adv. Cancer Res.*, 43: 175–203.

Folkman J. , Langer R. , Linhardt R. J., Haudenschild C., Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of kortisone (1983) *Science*, 221: 719–25.

Folkman J., Klagsburn M. Angiogenic factors (1987) *Science* 235: 442–47.

Fredriksson L., Li H., Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms (2004) *Cytokine Growth Factor Rev.*, 15(4):197–204.

Friedrichsen D. M., Joazeiro C. A., Li J., Hunter T., Chory J. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase (2000) *Plant Physiol.*, 123(4):1247-56.

Fry S. C. , Smith R. C., Renwick K. F., Martin D. J., Hodge S. K., Matthews K. J. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants (1992) *Biochem. J.*, 282: 821–8. 1992.

Fürst T., Kryštof V. Software for Quantitative Analysis of Endothelial Cell Tube Formation (2011)

Fürst T., Rárová L. Software for Endothelial Cell Migration Analysis and Quantification (2011)

Goldie L. C., Nix M. K., Hirschi K. K. Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification (2008) *Organogenesis*, 4: 257-263.

Gragoudas E. S., Adamis A. P., Cunningham E. T., Feinsod M. Guyer D. R. Pegaptanib for neovascular age-related masclar degeneration (2004) *N. Engl. J. Med.*, 351: 2805-2816 (2004).

Gridelli C.M., Rossi A., Maione P. et. al. Vascular disrupting agents: a novel mechanism of action in the battle against non-small cell lung cancer (2009) *Oncologist*, 14: 612–620.

Grove M. D., Spenser G.F., Rohwedder W.K., Mandava N., Worley J.F., Warthen J.D., Stevens G. L., Flippen-Anderson J.L., Cook J.C. Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen (1979) *Nature*, 225: 1065–66.

Hattori K., Hattori K., Heissig B., Wu Y., Dias S., Tejada R., Ferris B., Hicklin D.J., Zhu Z., Bohlen P., Witte L., Hendrikx J., Hackett N.R., Crystal R.G., Moore M.A., Werb Z., Lyden D., Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1 (+) stem cells from bone-marrow microenvironment 2002) *Nature Med.* 8: 841–849 (2002).

Hellstrom M., Kalén M., Lindahl P., Abramsson A., Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse (1999) *Development.*, 126(14): 3047–3055.

Hiratsuka S., Nakamura K., Iwai S., Murakami M., Itoh T., Kijima H., Shipley J.M., Senior R.M., Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis (2002) *Cancer Cell* 2, 289–300.

Hirschi K.K., D'Amore P.A. Pericytes in the microvasculature (1966) *Cardiovasc Res.*, 32:687–98.

Hoffmannová L., Steigerová J., Oklešťková J. Cholestane derivatives as antiproliferative and antiangiogenic pharmaceuticals and pharmaceutical preparations containing these compounds (2009) CZ patent application CZ PV, 2009-725.

Hosaka T., Kimura H., Heishi T., Suzuki Y., Miyashita H., Ohta H., Sonoda H., Moriya T., Suzuki S., Kondo T., Sato Y. Vasohibin-1 expression in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis (2009) *Am J Pathol.*, 175(1):430-9.

Horsman M.R., Siemann D.W. Pathophysiologic effects of vascular-targeting agents and the implications for combination with conventional therapies (2006) *Cancer Res.*, 66 (24):11520-11539.

Huang H., Bhat A., Woodutt G., Lappe R. Targeting the ANG-PT-TIE2 pathway in malignancy (2010) *Nature Rev Cancor*, 10: 575 - 585.

Huang L.E., Arany Z., Livingston D.M , Bunn H.F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redoxsensitive stabilization of its alpha subunit (1996) *J Biol Chem.* 271, (50): 32253-32259.

Hu Y.X., Bao F., Li J.Y. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis* (2000) *Plant J.* 24, 693–701.

Jakobsen A., Frederiksen P.L., Moller K.A., Medroxyprogesterone acetate and prednisone in advanced breast cancer (1986)A randomized trial. *Eur J Cancer Clin Oncol.*, 22:1067–72.

Ricker J.L., Chen Z., Yang X.P., Pribluda V.S , Swartz G.M., Van Waes C. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 α , tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma (2004) *Clin Cancer Res.* 15, 10(24): 8665-73.

Karkkainen M.J., Petrova T.V. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis (2000) *Oncogene*, 19(49): 5598-605.

Stewart K.S., Zhou Z., Zweidler-McKay P., Kleinerman E.S. Delta-like ligand 4-Notch signaling regulates bone marrow-derived pericyte/vascular smooth muscle cell formation (2010) *Blood.* 2011 Jan 13, 117(2): 719-26.

Kinoshita T., Caño-Delgado A., Seto H., Hiranuma S., Fujioka S., Yoshida S., Chory J. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1 (2005) *Nature.*, 433(7022): 167-71.

Kohout L., Fajkoš J., Šorm F. On Steroids CXXI. B-Homosteroids II. Conformation of the Ring B in B-Homosteroid Alcohols and Epoxides (1969) Coll Czech Chem Commun, 34: 601.

Koch A. E. Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases (2003) Ann Rheum Dis.; 62-7.

Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. (2002) J Cell Sci., 115: 1095-1097.

Kubota Y., Kleinman H.K., Martin G.R., Lawley T.J. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures (1988) J. Cell Biol. 107, 4: 1589–98.

Lampe P.D., Lau A. F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication (2004) The international journal of biochemistry & cell biology 36, (7): 1171–86.

Lee W.Y., Huang S.C., Hsu K.F., Tzeng C.C., Shen W.L. Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: Somatic evolution during hypoxia-glycolysis-acidosis sequence (2008) Gynecol Oncol. 108,2: 377-384.

Lindhal P., Johansson B. E., Leveen P., Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysmformation in PDGF-B-deficient mice (1997) Science, 277: 242–245.

Li X., Eriksson U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D (2001) Int J Biochem Cell Biol., 33: 421–426.

Li X., Ponten A., Aase K., Karlsson L., Abramsson A. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF α -receptor (2000). Nat Cell Biol 2: 302–309.

Li J., Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction (1997) Cell.,5: 929-38.

Losel R., Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 46-56.

Machado-Linde F., Pelegrin P., Sanchez-Ferrer M.L., Leon J., Cascales P., Parrilla J.J. 2-methoxyestradiol in the pathophysiology of endometriosis: focus on angiogenesis and therapeutic potential (2012) *Reprod Sci.*, 19(10): 1018-29.

Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, Eriksson U, Alitalo K. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1 (1999) *J Biol Chem.* 274, 30: 21217-22.

Malikova J., Swaczynova J., Kolar Z., Strnad M. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids (2008) *Phyto chem*, 69: 418-26.

Martin A., Komada M. R., Sane, D. C. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus (2003) *Medicinal Research Reviews*, 23: 117–145.

McGregor P.E., Agrawal D.K., Edwards J.D. Technique for assessment of leukocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayer (1944) *J Pharmacol Toxicol Methods*, 32(2):73-7.

Mitchell J.W., Mandava N., Worley J.F., Plimmer J.R., Smith M.V. Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen (1970) *Nature*, 225(5237): 1065-6.

Morillo S.A., Tax F.E. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots (2006) *Curr Opin Plant Biol.*, 9(5): 460-9.

Mould A.W., Greco S.A., Cahill M.M., Tonks I.D., Bellomo D., Patterson C., Zournazi A., Nash A., Scotney P., Hayward N.K., Kay G.F. Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth *in vivo* and *in vitro* (2005) *Circ Res.*, 97(6): 60-70.

Mooberry S.L. Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments (2003) *Drug Resist Updates.*; 6:355–61.

Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T., Bishop G.J. Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling (2002) *Plant Cell.*, 14(12): 3163-76.

Müssig C., Altman T. Brassinosteroid signaling in plants (2001) *Trends Endocrinol Metab*, 12: 398-402.

Nakamura A., Fujioka A., Fujioka S., Sunohara H., Kamiya N., Hong Z., Inukai Y., Miura K., Takatsuto S., Yoshida S., Ueguchi-Tanaka M., Hasegawa Y., Kitano H., Matsuoka M. The role of OsBRI1 and its homologous genes, OsBRL1 and OsBRL3, in rice (2006) *Plant Physiol.*, 140(2): 580-90.

Nam K.H., Li J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling (2002) *Cell.*, 110(2): 203-12.

Mabjeesh N.J., Escuin D., LaVallee T.M., Pribluda V.S., Swartz G.M., Johnson M.S., Willard M.T., Zhong H., Simons J.W., Giannakakou P. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF (2003) *Cancer Cell.*, 3(4):363-75.

Olofsson B., Korpelainen E., Pepper M.S., Mandriota S.J., Aase K., Kumar V., Gunji Y., Jeltsch M.M., Shibuya M., Alitalo K., Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(20): 11709-14.

Olsson K.A., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling in control of vascular function (2006) *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 359-371 .

Ostman A. PDGF receptors - mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma (2004) *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 275-286.

Paulsson M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions (1992) *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 27(1-2): 93-127.

Pratt W.B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor (1993) *J Biol Chem.*, 268: 21455-8.

Prior B.M., Yang H.T., Terjung R.L. What makes vessels grow with exercise training? (2004) *J Appl Physiol.* 2004, 97(3): 1119-28.

Quezada M., Alvarez M., Peña O.A., Henríquez S., d' Alençon C.A., Lange S., Oliva B., Owen G.I., Allende M.L. Antiangiogenic, antimigratory and antiinflammatory effects of 2-methoxyestradiol in zebrafish larvae (2013). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, 157(2): 141-9.

Rafii S., Lyden D., Benezra R., Hattori K., Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for antiangiogenesis therapy? (2002) *Nat Rev Cancor*, 2: 826–835.

Rárová L., Zahler S., Liebl J., Kryštof V., Sedlák D., Bartůněk P., Kohout L., Strnad M. Brassinosteroids inhibit *in vitro* angiogenesis in human endothelial cells (2012) *Steroids*, 77(13): 1502-9.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis (1997) *Nature*, 386(6626): 671-4.

Reichelt M., Shi S., Hayes M, Kay G., Batch J., Gole G.A., Browning J. Vascular endothelial growth factor-B and retinal vascular development in the mouse (2003) *Clin Experiment Ophthalmol.*, 31(1): 61-5.

Rusk A., McKeegan E., Haviv F., Majest S., Henkin J., Khanna C. Preclinical evaluation of antiangiogenic thrombospondin-1 peptide mimetics, ABT-526 and ABT-510, in companion dogs with naturally occurring cancers. (2006) *Clin Cancer Res.*, 12(24): 7444-55.

Safran M., Kaelin W. J. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway (2003) *J Clin Invest.*, 111(6): 779-83.

Sims D.E. The pericyte - a review (1986) *Tissue Cell.*, 18: 153-74.

Silvestre J.S., Vascular endothelial growth factor-B promotes *in vivo* angiogenesis. *Circ Res.* 2003;93:114–123.

Silvestre J.S., Tamarat R., Ebrahimian T.G., Le-Roux A., Clergue M., Emmanuel F., Duriez M., Schwartz B., Branellec D., Lévy B.I. Vascular endothelial growth factor-B promotes *in vivo* angiogenesis (2003) *Circ Res.*, 93(2): 114-23.

Scharpfenecker M., Fiedler U., Reiss Y., Augustin H.G. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism (2005) *J Cell Sci.*, 118 (4): 771-80.

Song S., Ewald A.J., Stallcup W., Werb Z., Bergers G. PDGFR β + perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival (2005) *Nat Cell Biol.* 7(9): 870-9.

Sufen G., Xianghong Y., Yongxia C., Qian P. bFGF and PDGF-BB have a synergistic effect on the proliferation, migration and VEGF release of endothelial progenitor cells (2011) *Cell Biol Int.*, 35(5): 545-51.

Sun Y., Fokar M., Asami T., Yoshida S., Allen R.D. Characterization of the brassinosteroid insensitive 1 genes of cotton (2004) *Plant Mol Biol.*, 54(2): 221-32.

Steigerová J., Okleštková J., Levková M., Rárová L., Kolář Z., Strnad M. Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells (2010) *Chem Biol Interact.*, 188(3): 487-96. **Tille J.C., Wood J., Mandriota S.J., Schnell C., Ferrari S., Mestan J., Zhu Z., Witte L., Pepper M.S.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis *in vivo* and *in vitro* (2001) *J Pharmacol Exp Ther.*, 299(3): 1073-85.

LaVallee T.M., Zhan X.H., Herbstritt C.J., Kough E.C., Green S.J., Pribluda V.S. 2-Methoxyestradiol Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis Independently of Estrogen Receptors α and β (2002) *Cancer Res*, 62: 36-91.

Teicher B.A., Williams J.I., Takeuchi H., Ara G., Herbst R.S., Buxton D. Potential of the aminosterol, squalamine in combination therapy in the rat 13,762 mammary carcinoma and the murine Lewis lung carcinoma (1998) *Anticancer Res.*, 18(4A): 2567-73.

Vert G., Nemhauser J.L., Geldner N., Hong F., Chory J. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants (2005) *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 21: 177-201.

Wang G.L., Semenza G.L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 (1995) *J Biol Chem.*, 270(3): 1230-7.

Wang X., Li X., Meisenhelder J., Hunter T, Yoshida S., Asami T., Chory J. Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1 (2005) *Dev Cell.*, 8(6): 855-65.

Watanabe K. Hasegawa Y., Yamashita H., Shimizu K., Ding Y., Abe M., Ohta H., Imagawa K., Hojo K., Maki H., Sonoda H., Sato Y. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis (2004) *J Clin Invest.*, 114(7): 898-907.

Witz I.P. The tumor microenvironment: the making of a paradigm (2009) *Cancer Microenviron.*, 1: 9-17.

Wright C.E. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF)A and VEGFB gene transfer on vascular reserve in a conscious rabbit hindlimb ischaemia model (2002) *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 29(11): 1035-9.

Wyler von Ballmoos M, Yang Z, Völzmann J, Baumgartner I, Kalka C, Di Santo S. Endothelial progenitor cells induce a phenotype shift in differentiated endothelial cells towards PDGF/PDGFR- β axis-mediated angiogenesis (2010) *PLoS One.*;5(11): 14107.

Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint (2000) *Plant Cell.*, 12(9): 1591-606.

Yoshizumi, T., Nagata, N., Shimada, H., and Matsui, M. An *Arabidopsis* cell cycle-dependent kinase-related gene, CDC2b, plays a role in regulating seedling growth in darkness (1999) *Plant Cell.*, 11: 1883–1895.

Zhang F., Tang Z., Hou X., Lennartsson J., Li Y., Koch A.W., Scotney P., Lee C., Arjunan P., Dong L., Kumar A., Rissanen T.T., Wang B., Nagai N., Fons P., Fariss R., Zhang Y, Wawrousek E., Tansey G., Raber J., Fong G.H., Ding H., Greenberg D.A., Becker K.G., Herbert J.M., Nash A., Yla-Herttuala S., Cao Y., Watts R.J., Li X. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 15: 6152-7.

Zondor S.D., Medina P.J. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies (2004) *Ann Pharmacother*, 38(7-8): 1258-64.

Zweifel M., Jayson G.C., Reed N.S., Osborne R., Hassan B., Ledermann J., Shreeves G., Poupard L. Lu S.P., Balkissoon J., Chaplin D.J., Rustin G.J. Phase II trial of combretastatin A4 phosphate, carboplatin, and paclitaxel in patients with platinum-resistant ovarian cancer (2011) *Ann Oncol.*, (9):2036-41.

Zurek D.M., Clouse S.D. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls (1994) *Plant Physiol.*, 104(1): 161-70.