

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2014

Jana ZWYRTKOVÁ

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Rozšířené testování protinádorové aktivity
a hledání mechanismu účinku
biologicky aktivních chelátorů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jana Zwyrtková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Soňa Purová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Soni Purové a s pomocí citované literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce Mgr. Soni Purové za odborné vedení a cenné rady při práci v laboratoři i při zpracování této práce.

Dále bych poděkovala zaměstnancům Laboratoře experimentální medicíny (Ústav molekulární a translační medicíny LF a FN Olomouc) za pomoc při práci v laboratoři, zejména pak Renatě Buriánové.

Děkuji také mému příteli Honzovi a rodině za podporu a pomoc při vzniku této práce.

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Zwyrtková
Název práce	Rozšířené testování protinádorové aktivity a hledání mechanismu účinku biologicky aktivních chelátorů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Soňa Purová
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	Tato bakalářská práce obsahuje ve své teoretické části rešerši týkající se kolorektálního karcinomu – obecné informace a náhled do terapeutických přístupů. Dále je zařazen přehled používaných metod pro testování cytotoxicity a nakonec informace o biologicky aktivních chelátorech. Práce je zaměřena na výzkum v oblasti buněk a látek na ně působících. Chelátory byly v experimentální části přímo testovány pomocí MTT testu, fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. Výsledky testů byly zpracovány.
Klíčová slova	Cytotoxicita, fluorescenční mikroskopie, chelátory, chemoterapie, kolorektální karcinom, MTT test, průtoková cytometrie.
Počet stran	71
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jana Zwyrtková
Title	Advanced testing of antitumor activity and searching of the mechanism of biologically active chelators's effect
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Mgr. Soňa Purová
The year of presentation	2014
Abstract	<p>Theoretical part of this bachelor thesis includes research of colorectal carcinoma – general information and a preview to the therapeutical approaches. Next section is a review of used methods for cytotoxicity screening and the last information is about biologically active chelators. The thesis is focused on research in field of cells and their affecting substances. In the experimental part of this thesis chelators were tested by MTT test, fluorescence microscopy and flow cytometry, respectively. The results of these tests were processed.</p>
Keywords	Colorectal carcinoma, cytotoxicity, chelators, chemotherapy, flow cytometry, fluorescence microscopy, MTT test.
Number of pages	71
Number of appendices	1
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíle práce	10
3	Teoretická část	11
3.1	Kolorektální karcinom	11
3.1.1	Epidemiologie a etiologie	11
3.1.2	Diagnóza	12
3.1.2.1	Vyšetřovací metody	12
3.1.3	Terapie karcinomu tlustého střeva	13
3.1.3.1	Chemoterapie	14
3.1.3.2	Terapie relapsu	16
3.2	Testování cytotoxicity	18
3.2.1	MTT test	18
3.2.2	SRB test	20
3.2.3	LDH test	21
3.3	Chelátory v protinádorové terapii	23
3.3.1	Chelátory železa	23
3.3.2	Chelátory mědi	25
3.3.3	Ostatní chelátory	27
4	Experimentální část	28
4.1	Materiál a metodika	28
4.1.1	Seznam a příprava použitých kultivačních médií	28
4.1.2	Seznam a příprava použitých roztoků	30
4.1.3	Testované látky	34
4.1.4	Biologický materiál	36
4.1.5	Příprava buněk pro experiment	36
4.1.5.1	Kultivace a pasážování buněk	36
4.1.6	Příprava testovaných látek	38
4.1.7	Testování cytotoxicity – MTT test	38
4.1.7.1	Příprava zásobních panelů	38
4.1.7.2	Příprava pracovních panelů	38
4.1.7.3	Ukončení MTT testu	40

4.1.7.4	Spektrofotometrie a analýza výsledků.....	40
4.1.8	Fluorescenční mikroskopie.....	41
4.1.9	Průtoková cytometrie.....	42
4.1.9.1	Fosforylace histonu H3-P.....	42
4.1.9.2	BrdU – analýza syntézy DNA.....	43
4.1.9.3	BrU – analýza syntézy RNA.....	44
5	Výsledky.....	46
5.1	Testování cytotoxicity – MTT test.....	46
5.2	Fluorescenční mikroskopie.....	49
5.3	Průtoková cytometrie.....	54
5.3.1	Fosforylace histonu H3-P.....	54
5.3.2	BrdU – analýza syntézy DNA.....	55
5.3.3	BrU – analýza syntézy RNA.....	55
6	Diskuze.....	59
7	Závěr.....	62
8	Literatura.....	63
9	Přílohy.....	71
9.1	Seznam použitých zkratk.....	71

1 Úvod

V současné době je na světě syntetizováno velké množství nových chemických látek, u kterých se, na základě dřívějších poznatků o látkách strukturně podobných, předpokládá možnost protinádorové aktivity. V případě chemoterapie se tyto látky nazývají cytostatika a jejich cytotoxický účinek je vlastně jakýmsi potenciálem či schopností zabíjet buňky. Tato schopnost je testována specifickými postupy na nádorových buněčných liniích pomocí nejrozličnějších testů cytotoxicity, kterými jsou například MTT test, SRB test, LDH test a další. Celý proces vývoje a zjišťování účinku nových aktivních látek byl vyvinut proto, že rakovina se stává pro lidstvo čím dál větší hrozbou, které je i v dnešní vyspělé době těžké čelit. Všude kolem nás se objevují faktory, které mohou ke vzniku rakoviny přispívat. Některé nežádoucí podmínky si však vytváříme sami. Špatná výživa, málo pohybu, kouření a jiné škodlivé návyky. Kolorektální karcinom, o kterém je psáno v následující kapitole, obecně patří k jednomu z nejčastějších zhoubných onemocnění. U chelátorů je předpokládána biologická protinádorová aktivita. Proto byly právě jejich deriváty vybrány pro testování v této bakalářské práci.

2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše týkající se problematiky kolorektálního karcinomu se zaměřením na terapii, zvláště chemoterapii, dále rešerše na téma testování cytotoxicity a biologicky aktivních chelátorů.

V experimentální části práce bylo mým úkolem seznámit se s chodem laboratoře tkáňových kultur, testování cytotoxicity (MTT test) a zjišťování protinádorového účinku nově syntetizovaných látek na nádorových buněčných liniích (U2OS, C6, U87MG, klony HCT116, CCRF-CEM). Nakonec probíhalo zjišťování kumulace látek v buňkách fluorescenční mikroskopií a hledání mechanismu účinku pomocí průtokové cytometrie.

3 Teoretická část

3.1 Kolorektální karcinom

Tímto dvouslovným termínem označujeme zhoubné onemocnění, které vzniká maligní transformací cylindrického epitelu tlustého střeva a rekta. Obvyklou předzvěstí kolorektálního karcinomu je vznik polypů (Adam *et* Vorlíček *et* Vaníček *et al.*, 2004). K hodnocení karcinomu se používá tzv. TNM klasifikace, kde T informuje o vlastnostech primárního nádoru, N se týká regionálních mízních uzlin a M vzdálených metastáz (Novotný *et* Vítek *et al.*, 2012). Tato klasifikace je znázorněna na Obr. 1. Pro kolorektální karcinogenezi je důležitý onkogen K-ras a protein p53, který slouží jako tumor-supresorový gen, a logicky je proto u mnoha nádorů zjištěn jako zmutovaný (Jablonská *et al.*, 2000). Kolorektální karcinom často metastázuje do jater (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010).

TNM	Stadium	Rozsah nádoru	5 let přežívá
Tis N0 M0	0	Karcinom <i>in situ</i>	100 %
T1 N0 M0	I	Invaze submukózy	93,2 %
T2 N0 M0	I	Invaze muscularis propria	90 %
T3 N0 M0	IIA	Invaze do subserózy nebo perikolické tkáně	84,7 %
T4 N0 M0	IIB	Perforace viscerálního peritonea nebo přímá invaze do přilehlých orgánů či tkání	72,2 %
T1–2 N1 M0	IIIA	T1–2 a metastázy v 1–3 regionálních lymfatických uzlinách	83,4 %
T3–4 N1 M0	IIIB	T3–4 a metastázy v 1–3 regionálních lymfatických uzlinách	64,1 %
Jakékoliv T N2 M0	IIIC	Metastázy ve 4 nebo více regionálních lymfatických uzlinách	44,3 %
Jakékoliv T, jakékoliv N M1	IV	Vzdálené metastázy	8,1 %

Obr. 1: TNM klasifikace stadií kolorektálního karcinomu.

(Převzato a upraveno: Büchler, 2009)

3.1.1 Epidemiologie a etiologie

Toto onemocnění je celosvětově rozšířené a patří mezi více časté. Nejvíce se objevuje u lidí kolem 70 – 74 let (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). V České republice se drží na předních místech četnosti rozšíření. V posledních letech však úmrtnost na tento karcinom klesá. Důvodem je nejspíše doporučovaný pravidelný screening obyvatel určitých věkových kategorií (Novotný *et* Vítek *et al.*, 2012).

Co se týká možných příčin vzniku karcinomu, existují studie, které se zaměřily na vliv potravy. Kombinace potravy s vysokým obsahem červeného masa (Egeberg *et al.*, 2013; Chao *et al.*, 2005; McCullough *et al.*, 2013), živočišného tuku a zároveň nízkého obsahu vlákniny zvyšuje riziko tohoto onemocnění. Naopak vysoký obsah vlákniny, dostatek vápníku a selenu, vitamínu C a D (vit. D: Espié *et al.*, 2013) a aminokyseliny methioninu přispívá k ochraně před vznikem tohoto nádoru. Nutný je také tělesný pohyb (Adam *et Vorlíček et Vaníček et al.*, 2004).

Geneticky je podmíněno minimum těchto tumorů. Řadíme mezi ně ty, u kterých je diagnostikovatelná genetická abnormalita vedoucí ke vzniku tumoru. Tuto skupinu nazýváme *hereditárními karcinomy tlustého střeva* a patří sem například Lynchův syndrom (nepolypózní karcinom) či syndrom familiární polypózy tlustého střeva. Přími příbuzní nemocných mají zvýšenou pravděpodobnost výskytu onemocnění, a to 3 – 4×, i když nejde o familiární polypózu či Lynchův syndrom. Tuto skupinu nazýváme *familiární výskyt karcinomů tlustého střeva* (Adam *et Krejčí et Vorlíček et al.*, 2010; Adam *et Vorlíček et Vaníček et al.*, 2004).

3.1.2 Diagnóza

Vše závisí na přesné lokalizaci nádoru, jeho rozsahu a stadiu onemocnění (Obr. 1). Mezi hlavní symptomy patří krvácení do stolice o různé intenzitě, které je však nepravidelné u nádoru střeva. Časté jsou bolesti v břiše, slabost, únava, váhový úbytek a anemizace (Adam *et Vorlíček et Vaníček et al.*, 2004). Tyto příznaky však může zapříčínovat i benigní nádor (Novotný *et Víték et al.*, 2012). Dále se může vyskytnout perforace střeva (Adam *et Vorlíček et Vaníček et al.*, 2004). Menší nádory jsou zpravidla bezpříznakové (Novotný *et Víték et al.*, 2012).

Existuje několik hlavních metod pro diagnostikování kolorektálního karcinomu. Při jejich pozitivních výsledcích se využívají doplňující metody, zjišťující například přítomnost metastáz v těle a jejich lokalizaci.

3.1.2.1 Vyšetřovací metody

K základním vyšetřovacím metodám patří endoskopie tlustého střeva, kdy jsou odebrané vzorky následně zasílány na histologii a dále rentgenologicky vyšetřovány aplikací kontrastní látky a vzduchu, tj. metoda dvojího kontrastu. První metoda je však využívanější. Nádory rekta lze diagnostikovat pohmatem, endosonograficky

či magnetickou rezonancí pánve. Druhý způsob zjišťuje rozsah nemoci a patří k nejcitlivějším postupům vyšetření (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010).

Kolonoskopie a její varianty (endoskopické vyšetření střeva) se provádí při zjištěných symptomech. Negativní výsledek však přítomnost nádoru nevylučuje, jen oznamuje, že nádor nebyl nalezen. Při přetrvávání příznaků je nutné vyšetření s určitým časovým odstupem opakovat (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010).

Pokud je podezření na dědičný typ rakoviny, měl by se pacient podrobit genetickému vyšetření. Testování mikrosatelitové nestability by se mělo provádět u všech lidí s tímto karcinomem vzniklým do 50 let věku. Tímto přístupem mohou být odhaleny dědičné formy rakoviny, u kterých jsou vyvinuty jiné způsoby následné léčby (Novotný *et* Vítek *et al.*, 2012).

K dalším vyšetřovacím metodám patří vyšetření na okultní krvácení. Existují dva typy testů a jsou založené na odebrání vzorků stolice. Jeden z nich je založen na pseudoperoxidázové aktivitě tetrapyrolu hemu. Zde je prokazována tetracyklická struktura hemu poskytující pseudoperoxidázovou reakci, která způsobuje zbarvení. U tetrapyrolové struktury hemu však může dojít k jejímu rozštěpení a falešné negativitě testu. Tento test je rozšířený v České republice. Druhým typem testu, využívaným hlavně v zahraničí, je imunotest založený na reakci globinu a protilátky (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010).

Další možností je monitorování nádorových markerů. U nemocných se hlídá hladina karcinoembryonálního antigenu (CEA), která je při onemocnění kolorektálním karcinomem zvýšená. Vyšetření tohoto markeru se využívá k monitorování pacientů po operaci. Když koncentrace CEA roste, značí to buď metastáze anebo recidivu nádoru (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010; Adam *et* Vorlíček *et* Vaníček *et al.*, 2004).

Při nálezů polypů v tlustém střevě je automatické jej označit za potenciálně maligní, následně jej endoskopicky odstranit a předat na histologii. Většina kolorektálních karcinomů totiž vzniká z adenomových polypů v průběhu až 15 let. Jen málo karcinomů vzniká kancerogeneticky *de novo* (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010; Adam *et* Vorlíček *et* Vaníček *et al.*, 2004).

3.1.3 Terapie karcinomu tlustého střeva

K terapiím kolorektálního karcinomu patří chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie. Vhodná terapie se volí dle různých klasifikací nádorů a stadia

onemocnění. Prognózy jsou zde pouze orientační a individuální. Udává se až pětileté přežití po terapeutickém zásahu. Doba se liší dle stadia onemocnění a platí, že čím vyšší stadium nemoci, tím méně lidí na pětiletou hranici dosáhne (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). Detailnější procentuální rozpis je uveden v Obr. 1.

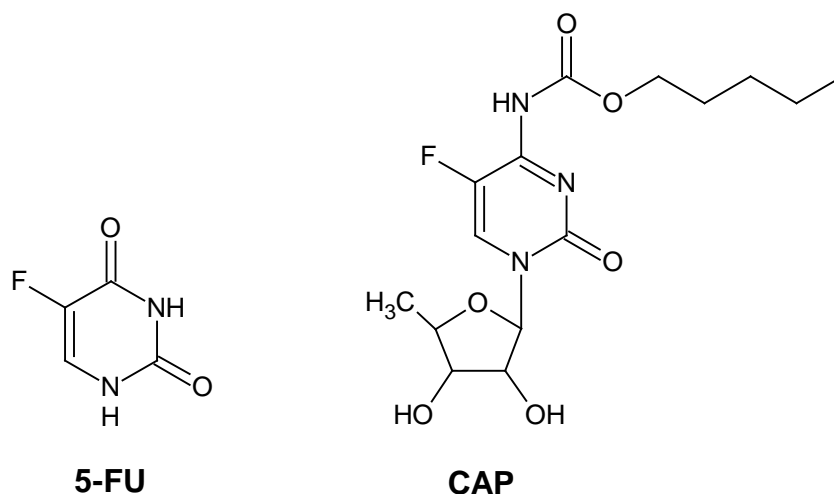
Chirurgická léčba se dělí na kurativní a paliativní léčbu. U první z nich, kurativní léčby, se klade důraz na dokonalé odstranění nádoru. Provádí se i místní odstranění uzlin z důvodu předcházení metastázím a také z důvodu histologického, kdy se vyšetřením těchto uzlin stanoví stadium nemoci a může se zvolit odpovídající terapie. Druhý typ – paliativní léčba by měla vést ke zlepšení efektu následné terapie, například chemoterapeutické. Tento typ léčby se dělí na onemocnění lokalizované a metastatické (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010; Adam *et* Vorlíček *et* Vaníček *et al.*, 2004).

Radioterapie je u kolorektálního karcinomu prováděna jen výjimečně, a to v oblasti rekta. Využívána je v kombinaci s chemoterapií – konkomitantní chemoradioterapie (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). Při předoperačním ozařování se aplikují nižší dávky a účelem je cytoredukce. V případě ozařování neoperovatelného nádoru je mimo jiné účelem dosažení jeho operability (Novotný *et* Vítek *et al.*, 2012).

3.1.3.1 Chemoterapie

Chemoterapie má v této práci svou důležitost, proto je jí věnována vlastní podkapitola. Existuje více typů chemoterapeutických přístupů. Prvním z nich je chemoterapie adjuvantní (pooperační), jejímž cílem je ničit mikrometastázy po chirurgické kurativní terapii. Standardně je zde doporučováno cytostatikum 5-fluorouracil (5-FU; struktura na Obr. 2) v modulaci leukovorinem, tzv. FUFA (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). 5-fluorouracil působí na buňky v S-fázi buněčného cyklu (Jablonská *et al.*, 2000; Martínková *et al.*, 2011). Tato chemoterapie je prováděna optimálně po dobu šesti měsíců a její výsledky se odrážejí v prodlouženém přežití nemocných (pozn.: přesnější výsledky závisí na konkrétním stadiu onemocnění; Obr. 1). Místo standardně používaných látek jsou i jiné, například kapecitabin (CAP, struktura na Obr. 2), který metabolizuje na 5-fluorouracil a účinností je srovnatelný s FUFA. Má však mírnější nežádoucí účinky a je lépe přijímán pacienty díky tomu, že se podává *per os*, tj. ústy. K dalším látkám, které byly zkoušeny v adjuvantní chemoterapii, patří tzv. cytostatika nové generace, jako je irinotecan a oxaliplatina, kombinované s FUFA

(Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). Irinotecan se ale kvůli převaze nežádoucích účinků v adjuvantní chemoterapii již nepoužívá (Novotný *et* Vítek *et al.*, 2012). Oxaliplatina způsobila snížení relapsů onemocnění o 26 % (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). Její kombinování s 5-fluorouracilem je tedy účinnější formou než čistě fluoropyrimidinové režimy. Adjuvantní chemoterapie nevykazuje závislost na věku pacienta, prospěch z léčby i toxicita je u mladších a starších lidí srovnatelná (Novotný *et* Vítek *et al.*, 2012).



Obr. 2: Chemická struktura 5-fluorouracilu (5-FU) a kapecitabinu (CAP).
(Převzato a upraveno: Wisniewska-Jarosinska *et al.*, 2011)

Dalším typem je chemoterapie paliativní (pro inoperabilní nádory). Je předepisována při zjištění recidivy (Adam *et* Vorlíček *et* Vaníček *et al.*, 2004). Hojně je také využíván 5-fluorouracil a to již od roku 1957. Je relativně dobře snášen. Škála nežádoucích účinků se liší dle způsobu aplikace – bolusová a kontinuální, a s různým mechanismem účinku. Bolusová aplikace způsobuje nežádoucí účinky týkající se především krve. U kontinuální aplikace je pozorována kožní a slizniční toxicita (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). Mezi další využívané látky patří, stejně jako v chemoterapii adjuvantní, irinotecan, oxaliplatina, kapecitabin, dále gemcitabin a raltitrexed (Adam *et* Vorlíček *et* Vaníček *et al.*, 2004).

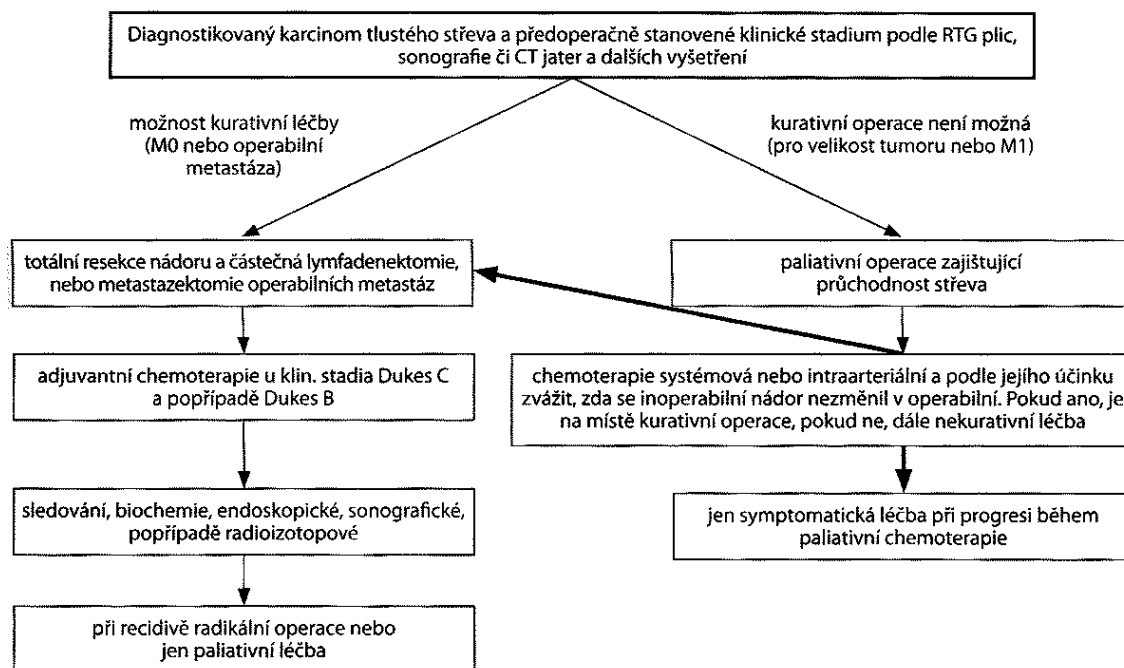
Své místo zde mají i monoklonální protilátky. U metastázujícího kolorektálního karcinomu (mCRC) je standardní chemoterapií kombinace irinotecanu (eventuálně oxaliplatiny) a bevacizumabu. Poslední zmíněný je právě tou monoklonální protilátkou proti některým variantám růstového faktoru (vaskulární endoteliální, VEGF-A), který

má svůj význam v regulaci angiogeneze. Toto cílení na konkrétní receptory růstových faktorů lze označit jako cílená, biologická léčba (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). Bevacizumab v kombinaci s 5-fluorouracilem zvýšil procento přežití pacientů s mCRC (Hurwitz *et al.*, 2004). Další monoklonální protilátkou může být cetuximab, který inhibuje receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), jehož nadprodukce je při onemocnění kolorektálním karcinomem velice často zjištěna. Cetuximab ve výsledku indukuje apoptózu. K nejčastějším nežádoucím účinkům a zároveň faktorem léčebné odpovědi cetuximabu patří kožní toxicita. Čím větší intenzita kožní toxicity, tím lepší účinnost terapie. Predikátorem odolnosti na terapii touto monoklonální protilátkou je přítomnost mutace K-ras (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010). Proti EGFR působí i monoklonální protilátka panitumumab. Cetuximab i panitumumab jsou v klinické praxi využívány pro léčbu mCRC (Novotný *et* Vítek *et al.*, 2012). Obchodní název protilátky bevacizumabu je Avastin, protilátky cetuximabu Erbitux a u panitumumabu je to Vectibix (Klener *et* Klener, 2010).

Účinnost chemoterapie se razantně zvyšuje právě při kombinaci s biologickou, cílenou léčbou (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010; Martinez-Cardús *et al.*, 2009). Avšak vzájemné kombinování protilátek anti-VEGF a anti-EGFR zhoršuje výsledky terapie mCRC. Důvodem je vysoká toxicita (Novotný *et* Vítek *et al.*, 2012). Intravenózně lze cytostatika použít pro paliativní terapii neoperovatelného nádoru (Adam *et* Vorlíček *et* Vaníček *et al.*, 2004). Pokroková je v tomto oboru kineticky řízená chemoterapie, založená na sledování farmakokinetiky 5-fluorouracilu. Jejím cílem je individuální dávkování cytostatika. Důkaz účinnosti spočívající v nižší toxicitě a zároveň vyšším účinku vychází z rozsáhlých studií (Gamelin *et al.*, 2008; Gamelin *et al.*, 1996). Svou důležitost mají v chemoterapii kolorektálního karcinomu také chelátory, o nichž je psáno v jedné z následujících kapitol a které byly testovány v rámci této práce.

3.1.3.2 Terapie relapsu

Terapie návratu onemocnění je závislá na jeho rozsahu. Vhodné je operační řešení, chemoterapie jen u pacientů v dobrém stavu. Pro relaps v játrech je používána intraarteriální či intravenózní chemoterapie. U pacientů v horší kondici je léčba pouze symptomatická, jejímž cílem je tlumení bolesti (Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010; Adam *et* Vorlíček *et* Vaníček *et al.*, 2004). Léčebný algoritmus je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3: Léčebný algoritmus karcinomu tlustého střeva.

(Převzato a upraveno: Adam *et* Krejčí *et* Vorlíček *et al.*, 2010)

3.2 Testování cytotoxicity

Stále více nových látek, ať už nově syntetizovaných či izolovaných z přírodnin, je testováno na *in vitro* cytotoxicitu. Výsledky těchto testů jsou poté využívány ve zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu. Látky jsou často testovány na nádorových buněčných liniích, protože tyto buňky rychle proliferují a z tohoto důvodu jsou pro testy cytotoxicity vhodné. Na následujících stranách jsou uvedeny nejrozšířenější testy.

Hlavním problémem velké většiny protinádorových léčiv je skutečnost, že nedovedou rozlišovat mezi nádorovými a normálními, zdravými buňkami, což vede k mnoha nežádoucím vedlejším účinkům. Proto je podávaná dávka léčiv, resp. chemoterapeutik, hlídána. Problémem může být i vzniklá rezistence na tato léčiva (Wang *et al.*, 2013).

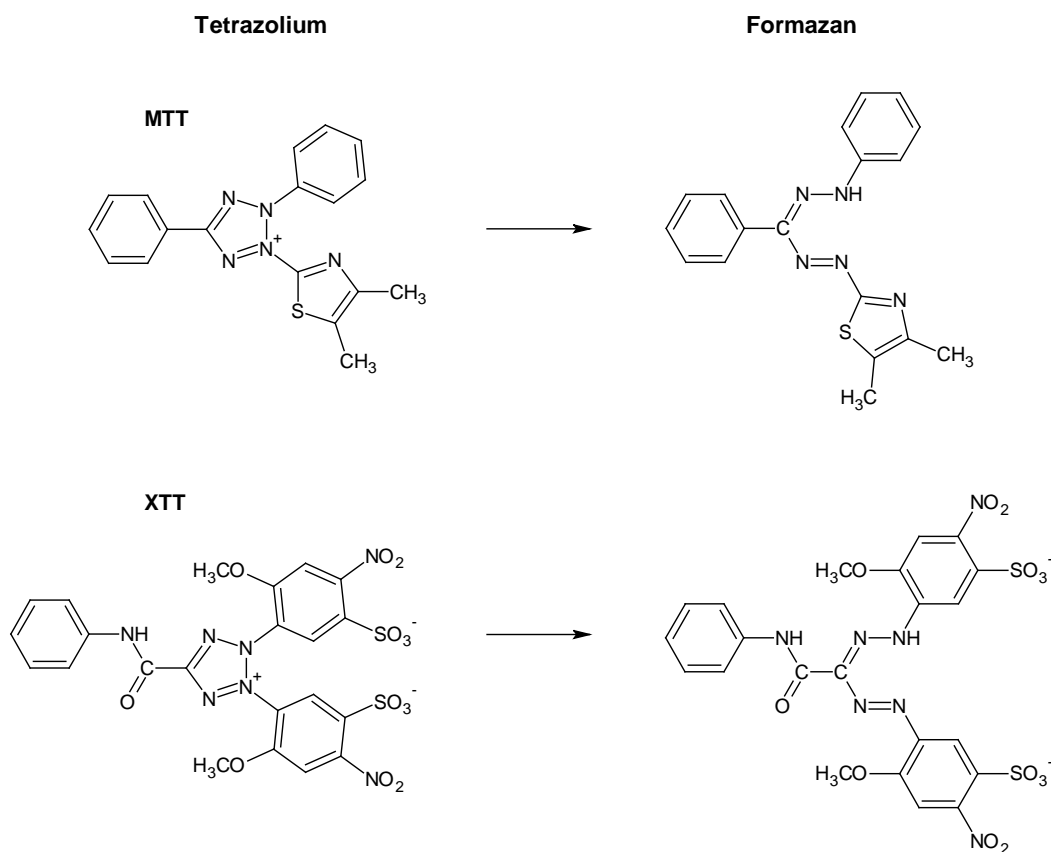
Při vyhodnocování testů cytotoxicity se obvykle pracuje s hodnotou IC₅₀, což je hodnota poloviční maximální inhibiční koncentrace látky, která snižuje buněčné přežití na 50 % (Shafiee *et al.*, 2012). Ve farmacii se tato hodnota využívá pro zjištění účinnosti *in vitro* léčiva.

3.2.1 MTT test

Jedná se o kolorimetrickou metodu, ve které je hlavním principem selektivní redukce žlutého rozpustného MTT neboli 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromidu na nerozpustný formazan (redukce na Obr. 4). Formazan tvoří krystaly modré barvy a hvězdicovitého tvaru. Celý tento proces redukce způsobují enzymy dýchacího řetězce mitochondriální membrány živých buněk. Krystaly formazanu se poté rozpustí v prostředí detergentu, jakým je například dodecylsírán sodný (SDS). K tomuto kroku lze využít i dimethylsulfoxid (DMSO). Vzniklé zbarvení (Obr. 5) se následně vyhodnocuje pomocí spektrofotometru při vlnové délce 540 nm (zelená viditelná oblast). Výsledná naměřená hodnota absorpance roztoku je lineárně úměrná množství buněk, které v roztoku přežily. Pro kontrolu lze daný vzorek zhodnotit i pouhým pohledem – čím je roztok tmavší, tím je naměřena vyšší absorpance a tím více je v něm živých buněk (Berridge *et al.*, 1993; Scudiero *et al.*, 1988; Shafiee *et al.*, 2012). MTT test je díky závislosti na aktivitě mitochondrií velice vhodnou metodou pro rozlišení živých a mrtvých buněk (Ho *et al.*, 2012).

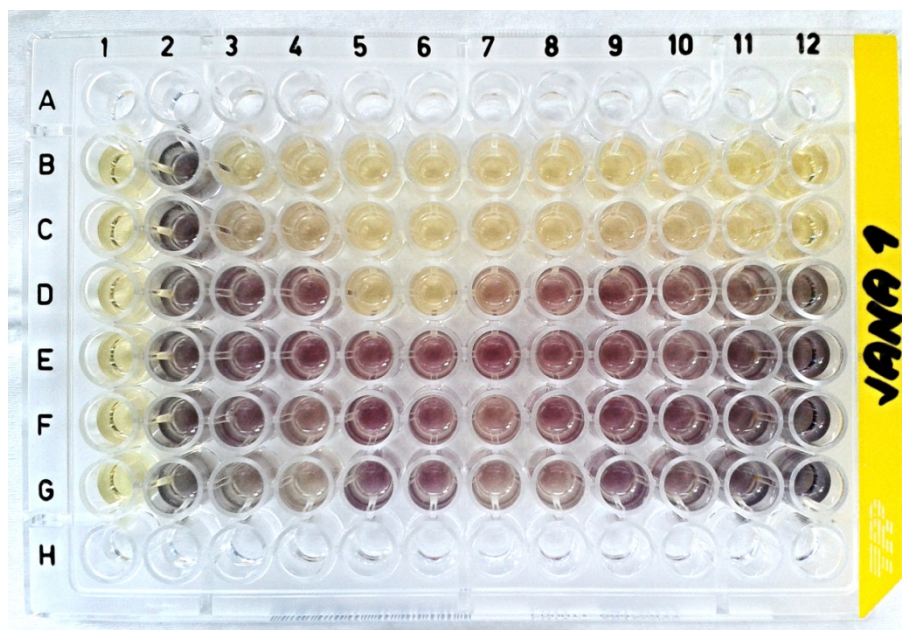
Poprvé byl celý tento princip popsán M. M. Blackem a F. D. Speerem v roce 1954. V laboratoři byla metoda využita až roku 1983 T. Mosmannem (Mosmann, 1983). MTT test je citlivá, široce rozšířená metoda, která má své hlavní využití při testování chemosenzitivity buněk k léčivům (Ho *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2007).

Variantou MTT testu je XTT test, který je svou podstatou stejný jako MTT. 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT) je tetrazoliové činidlo, jehož působením se získá barevný, netoxický a ve vodě rozpustný formazan (přeměna na Obr. 4). A právě v poslední zmíněné vlastnosti, rozpustnosti ve vodě, spočívá výhoda XTT testu nad MTT testem. Výše popsany proces je při použití XTT kratší z důvodu eliminace posledního solubilizačního kroku a jelikož není nutný detergent, jako například DMSO, je XTT testování i méně škodlivé pro zdraví laborantů. Při XTT testu proto rovnou přecházíme ke spektrofotometrickému měření absorbance. Pro zlepšení procesu redukce XTT lze přidat PMS, tzv. fenazin methosulfát (Scudiero *et al.*, 1988).



Obr. 4: Chemická struktura tetrazoliové soli a její přeměny na formazan při MTT a XTT testu.

(Převzato a upraveno: Scudiero *et al.*, 1988)



Obr. 5: 96-jamkový panel po MTT testu připravený pro měření na spektrofotometru.

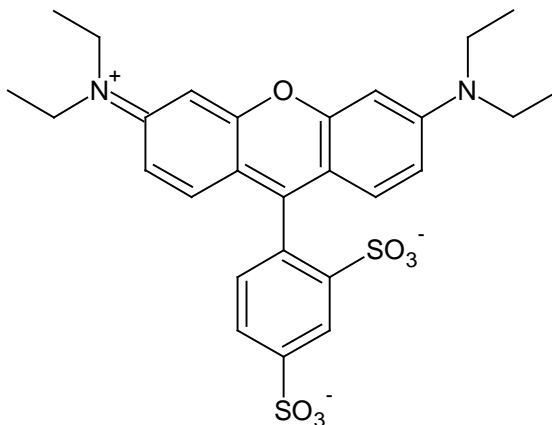
3.2.2 SRB test

Tato citlivá a rychlá metoda je založena na schopnosti sulforhodaminu B (SRB) vázat se na proteinové složky buněk, následné kvantifikaci buněčných proteinů a výsledném stanovování hustoty buněk. Sulforhodamin B (Obr. 6) je jasně růžové, aminoxanthenové barvivo se dvěma sulfonovými skupinami vázajícími se na bazické zbytky aminokyselin za slabě kyselých podmínek a disociujícími za bazických podmínek (Vichai *et* Kirtikara, 2006). Testování probíhá na adherentních i suspenzních buněčných liniích v 96-jamkových panelech. Buňky jsou nejprve fixovány na panel 10% kyselinou trichloroctovou a poté barveny 0,4% sulforhodaminem B rozpuštěným v 1% kyselině octové. Barvivo nenavázané na proteiny je odmyto opakovaným promýváním kyselinou octovou. Navázané barvivo je extrahováno pomocí nepufrovaného bazického 10mmol/l Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol). Na konci SRB testu je získán stabilní kolorimetrický bod, viditelný pouhým okem (Skehan *et al.*, 1990). Jelikož je vazba SRB na proteiny stechiometrická, je množství navázaného barviva přímo úměrné buněčné hmotě (Vichai *et* Kirtikara, 2006).

SRB test je jednou z nejvíce používaných metod pro *in vitro* testování cytotoxicity, k jejímž výhodám patří potřeba pouze jednoduchého zařízení a relativně levných činidel. Test je využíván pro testování cytotoxicity léčiv na různých nádorových, ale i nenádorových buněčných liniích. Pomocí této metody lze také určovat

citlivost rakovinných buněk na záření a studovat interakce mezi radioterapií a chemoterapií (Vichai *et* Kirtikara, 2006).

Na rozdíl od MTT testu, SRB test nevyžaduje metabolickou aktivitu buněk, proto nerozlišuje mezi životaschopnými a mrtvými buňkami. Tato skutečnost však nijak výsledky testu neovlivňuje. Obecně jsou výsledky ze SRB a MTT testu v dobré korelaci, jen u SRB bývají zjištěny mírně vyšší hodnoty IC50 (Vichai *et* Kirtikara, 2006).



Obr. 6: Chemická struktura sulforhodaminu B (SRB).

(Převzato a upraveno: Polat *et al.*, 2011)

3.2.3 LDH test

Poškození či ztráta buněčné integrity způsobuje uvolnění enzymů buňky do okolního prostředí (Sumantran, 2011). LDH neboli laktátdehydrogenázový test je způsob zjišťování cytotoxicity, který detekuje laktátdehydrogenázu uvolněnou z buněčné membrány v průběhu lýze cílových buněk. Pro LDH testování se využívají 96-jamkové panely, do kterých se napipetuje médium a testované buněčné lyzáty. Inkubace takto naplněného panelu probíhá v inkubátoru při 37 °C a v 5% atmosféře CO₂ po dobu 45 min. Dalším krokem je centrifugace a vzniklý supernatant je přenesen do nového 96-jamkového panelu. Do každé jamky je přidán tzv. *Substrate Mix*, který je v dané studii zakoupen od výrobce. Následně je panel překryt fólií pro ochranu před světlem a je inkubován po dobu 30 min při pokojové teplotě. Nakonec je přidán daný objem tzv. *Stop Solution* a po cca 1 h je měřena absorbance jednotlivých roztoků v každé jamce při vlnové délce 490 nm (Shin *et al.*, 2000). Měření je únik laktátdehydrogenázy do kultivačního média (Ho *et al.*, 2012).

Při srovnávání testu LDH s testem MTT ve studiích bylo prokázáno, že LDH testy vykazují menší citlivost (Fotakis *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013). Citlivost MTT testu roste s dobou působení a citlivost testu LDH se s dobou působení nemění (Li *et al.*, 2013). Další studie dokazuje, že buněčná smrt je závislá na koncentraci testované látky (Wang *et al.*, 2013). LDH test je často využíván pro testování cytotoxicity mikroorganismů (Shin *et al.*, 2000). Dostupné komerční kity zvyšují citlivost testu (Sumantran, 2011).

3.3 Chelátory v protinádorové terapii

Železo, měď a další kovy mají svůj význam v biologii rakoviny. Konkrétně železo je důležité při buněčném dělení a měď je významným kofaktorem angiogeneze (Yu *et al.*, 2006). U nádorových buněk je pozorována zvýšená potřeba železa, což dokazuje nárůst receptoru transferinu na povrchu buněk (Turner *et al.*, 2005). Látka desferrioxamin (DFO; Obr. 7), produkovaná bakterií *Streptomyces pilosus*, byla prokázána jako protinádorově aktivní, jelikož u ní byla objevena schopnost vychytávat železo (Blatt *et Stitely*, 1987; Donfrancesco *et al.*, 1990). Látka penicilamin, trientin a tetrathiomolybdenan (Obr. 8), chelátory určené naopak k léčbě přetížení mědí, se také jevily jako aktivní v nádorové terapii. Proto se začalo více přemýšlet nad chelátory, jako nad protinádorovými činidly (Buss *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006).

3.3.1 Chelátory železa

Železo je pro život nutností. V ribonukleotidreduktáze je důležité při konverzi ribonukleotidů do deoxyribonukleotidů. Nedostatek železa vede k zástavě přechodu mezi fázemi buněčného cyklu G1 a S a k apoptóze (Le *et Richardson*, 2002; Richardson *et Milnes*, 1997; Whitnall *et al.*, 2006). Mnoho železa vyžadují neoplastické buňky, a to právě z důvodu jejich rychlé proliferace (Yu *et al.*, 2006). Pokud je železa v těle přebytek, je pro organismus toxické (Shen *et al.*, 2005).

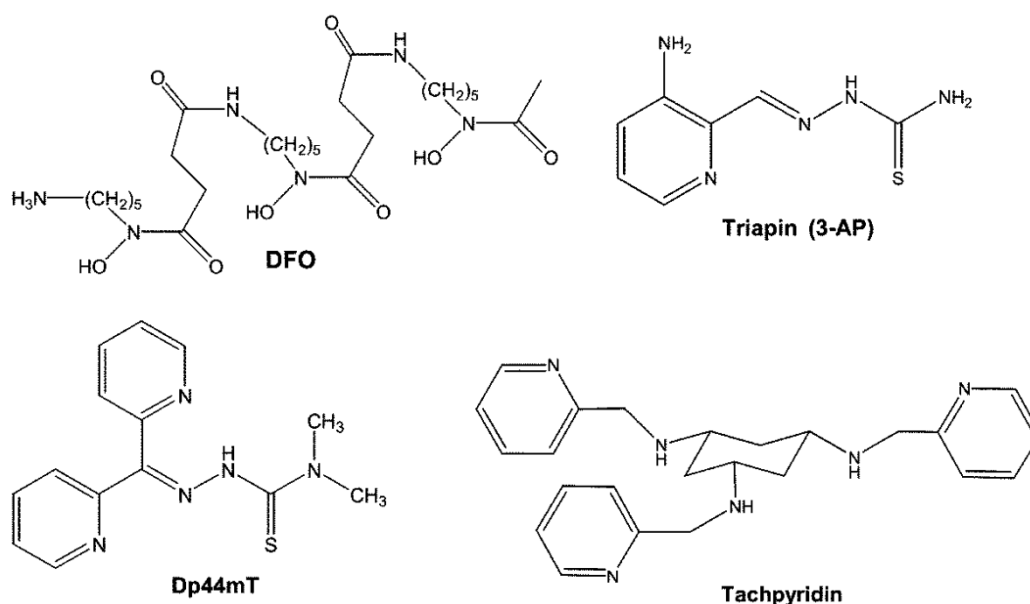
Desferrioxamin (DFO), léčivo pro přetížení organismu železem, byl první komerčně dostupný chelátor, který se dostal do spojitosti s protinádorovým účinkem. Tato látka je však vysoce hydrofilní, orálně inaktivní a její výroba je drahá (Olivieri *et Brittenham*, 1997). DFO kvůli své hydrofilní povaze špatně prostupuje membránou a tudíž nemůže vázat intracelulární železo (Lovejoy *et Richardson*, 2003). Ne ve všech testech byl však protinádorový účinek desferrioxaminu potvrzen (Blatt, 1994; Selig *et al.*, 1998). Je nutno udržovat účinnost a toxicitu alespoň v rovnováze (Olivieri *et Brittenham*, 1997).

Triapin aneb 3-aminopyridin-2-karboxaldehyd thiosemikarbazon (3-AP; Obr. 7) je chelátor železa, který inhibuje ribonukleotidreduktázu a má protileukemickou (Yee *et al.*, 2006) a protinádorovou aktivitu (Yu *et al.*, 2006). V klinických testech bylo zjištěno, že triapin zvyšuje cytotoxicitu gemcitabinu na nádorových buněčných liniích (Yen *et al.*, 2004).

K dalším chelátorům železa patří pyridoxal isonikotinoyl hydrozonové analogy, které mají výhodu orálního podání, vysokou propustnost membrány a relativně jednoduché syntézy. U těchto látek byla prokázána vyšší účinnost než u DFO (Richardson *et al.*, 1997).

Dále jsou na pomyslném seznamu di-2-pyridylketon thiosemikarbazonové série chelátorů. Jedním z nich je di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon (Dp44mT; Obr. 7), který z celé série prokázal nejvyšší aktivitu proti nádorovým buněčným liniím a zároveň selektivitu v působení proti nádorovým a normálním buňkám (Whitnall *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2004).

Látka tachpyridin (Obr. 7) zastavuje buněčné dělení v G2 fázi a k jeho lepšímu působení přispívá záření (Turner *et al.*, 2005). Neváže jen železo, ale i zinek a měď. Od výše zmíněných se liší strukturně a vlastnostmi. Jeho toxicita byla prokázána u proliferujících buněk rakoviny močového měchýře (Torti *et al.*, 1998). Tachpyridin vykazuje nižší hodnoty IC₅₀ než DFO a také je u něj zaznamenáno přednostní působení na nádorové buňky. Zastavení buněčného dělení v G2 fázi bylo prokázáno i u buněk kolorektálního karcinomu HCT116 (Turner *et al.*, 2005). V buňkách léčených tachpyridinem byla zjištěna kumulace proteinu p53 (Abeyasinghe *et al.*, 2001).



Obr. 7: Chemické struktury vybraných chelátorů železa.

(Převzato a upraveno: Yu *et al.*, 2006)

3.3.2 Chelátory mědi

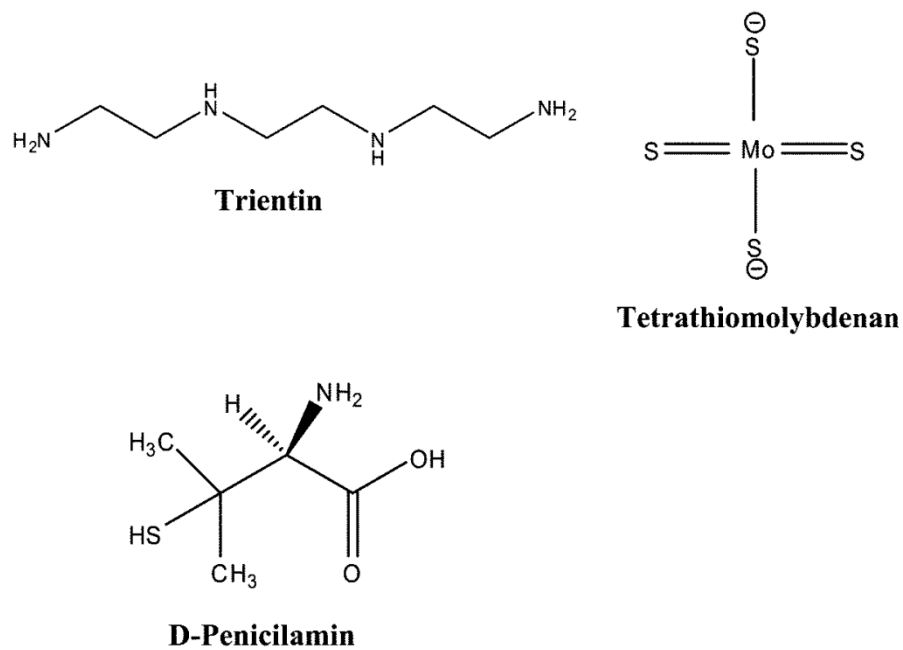
Měď je řešena pro svou důležitou roli v angiogenezi (Brewer *et al.*, 2000; Harris, 2004; Hu, 1998), která se pojí s proliferací nádorových buněk, konkrétně s nádorovými metastázemi (Pan *et al.*, 2002). Chelatace mědi potlačuje různé angiogenní přenašeče, například vaskulární endoteliální růstový faktor-1, fibroblastový růstový faktor-1, interleukiny IL-1, IL-6, IL-8 a jaderný faktor κ B (Pan *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2006).

Penicilamin je chelátor mědi využívaný při léčbě Wilsonovy choroby, při které dochází k abnormálnímu ukládání mědi v játrech. Studie srovnávající invazivitu karcinomu u králíků s normálním obsahem mědi a nedostatkem mědi v těle díky dietě chudé na měď a podávání penicilaminu zjistila, že u králíků s normálním podílem mědi byly vyvinuty velké vaskularizované karcinomy a u jedinců s nedostatkem mědi v těle naopak zjištěny malé a relativně avaskulární karcinomy (Yu *et al.*, 2006). V jiné studii bylo zjištěno, že i při výše zmiňované dietě a podávání penicilaminu pacientům s glioblastomem nebyl celkový pozitivní vliv pozorován (Brem *et al.*, 2005).

Trientin je další látkou využívanou pro léčbu Wilsonovy choroby. Existuje také studie dokládající potlačení rozvoje nádoru při podávání trientinu. Při inhibici růstu xenotransplantátu hepatocelulárního karcinomu u myší byl trientin účinnější než penicilamin. Hepatocelulární karcinomy jsou často hypervaskularizované, proto je správnou cestou léčby potlačování angiogeneze (Yoshii *et al.*, 2001). Trientin v kombinaci s methotrexátem působí pozitivně na xenotransplantáty lidského kolorektálního karcinomu u myší a vede k období zpomaleného vývoje či zastavení vývoje karcinomu (Yoshiji *et al.*, 2005). Dále bylo také dokázáno, že nízká dávka trientinu byla více léčebně úspěšná než vysoká dávka penicilaminu (Yoshii *et al.*, 2001).

Tetrathiomolybdenan je další z řady chelátorů mědi a orálně dostupná látka určená k léčbě Wilsonovy choroby. Inhibice angiogeneze a slabší růst nádoru patří i v tomto případě k nezanedbatelným účinkům. Tetrathiomolybdenan snižuje množství mědi v těle, čímž potlačuje růst a prokrvení spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (Cox *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2001) a rakoviny prsu (Pan *et al.*, 2002) na *in vivo* myších modelech. V kombinaci s doxorubicinem byly pozorovány výraznější apoptotické účinky u buněk rakoviny prsu (Pan *et al.*, 2003). Další klinické studie, zabývající se kombinací tetrathiomolybdenanu s jinými látkami, probíhají (Yu *et al.*, 2006). Pozitivní výsledky na zmírnění růstu spinocelulárního karcinomu hlavy a krku na myších

modelech jsou pozorovány i při variantě tetrathiomolybdenanu s radioterapií (Khan *et al.*, 2006). Látka je dobře snášena (Redman *et al.*, 2003).



Obr. 8: Chemické struktury vybraných chelátorů mědi.
(Převzato a upraveno: Yu *et al.*, 2006)

3.3.3 Ostatní chelátory

Existují i další látky, které mají své primární zaměření do jiných oblastí než do protinádorové terapie, avšak i zde jsou účinné. Antibiotikum kliočinol (5-chlor-7-jod-8-hydroxychinolin) je chelátor železa, mědi a zinku. Poprvé byl připraven v Německu již v počátečních letech minulého století. Jeho hlavní použití bylo jako antibiotikum využívané pro léčbu průjmu a kožních infekcí (Ding *et al.*, 2005). Kliočinol byl testován na Alzheimerovu chorobu na myších modelech. Výsledky testů byly pozitivní, proto byl lék navržen pro další testování v souvislosti s touto chorobou (Cherny *et al.*, 2001). Na zvířecím modelu byla zjištěna i účinnost na Parkinsonovu chorobu (Kaur *et al.*, 2003). Kliočinol při testech na myších modelech snižoval také růst nádoru. Bylo prokázáno, že má protinádorové účinky *in vitro* i *in vivo*, avšak tyto pravděpodobně nejsou způsobeny díky jeho chelatačním schopnostem a následné eliminaci kovu z karcinomu, pro který je daný kov důležitý. Pokud tento lék vstoupí do buňky, váže na sebe kovy, které se vlivem této vazby kumulují v intracelulárním prostoru. Následkem může být spuštění apoptotické kaskády právě z důvodu kumulace kovu v buňce a jím způsobené poškození některé důležité organely, například mitochondrie (Ding *et al.*, 2005). Tento mechanismus byl prokázán u lidských prostatických buněk. Ve studiích bylo zjištěno, že hromadění zinku v těchto buňkách indukuje mitochondriální apoptogenezi (Feng *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2000).

4 Experimentální část

4.1 Materiál a metodika

Pro testování cytotoxicity, fluorescenční mikroskopii a průtokovou cytometrii bylo využito třináct nově syntetizovaných látek. Testování probíhalo na sedmi adherentních a jedné suspenzní nádorové buněčné linii. Dané linie byly kultivovány v určených kultivačních médiích, která byla připravována dle pokynů firmy, od jaké byla zakoupena. Seznam použitých médií, roztoků a jejich příprava je uvedena na následujících stranách.

Většina experimentů, práce s buněčnými liniemi i testovanými látkami probíhala v 96-jamkových panelech od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) ve flowboxu Herasafe (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ve sterilních podmínkách.

4.1.1 Seznam a příprava použitých kultivačních médií

RPMI-1640

- RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- FCSI (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Německo)
- STM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- PNC (Biotika, Slovenská Ľupča, Slovenská republika)

Kultivační médium bylo připravováno sterilně ve flowboxu tak, že nejprve byl připraven roztok smícháním 450 ml RPMI-1640, 50 ml fetálního séra, 2,5 ml streptomycinu a 250 µl penicilinu. Tento roztok byl zfiltrován přes filtr od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) do sterilní skleněné láhve, sterilně uzavřen a uchováván v lednici.

McCOY

- McCOY (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- FCSI (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Německo)
- 200mmol/l L-glutamin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- STM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- PNC (Biotika, Slovenská Ľupča, Slovenská republika)

Kultivační médium bylo připravováno sterilně ve flowboxu tak, že nejprve byl připraven roztok smícháním 450 ml McCOY, 50 ml fetálního séra, 7,5 ml 200mmol/l L-glutaminu, 2,5 ml streptomycinu a 250 µl penicilinu. Tento roztok byl zfiltrován přes filtr od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) do sterilní skleněné láhve, sterilně uzavřen a uchováván v lednici.

MEM-Eagle (EMEM)

- MEM-Eagle s L-glutaminem (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- PYNA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- FCSI (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Německo)
- Neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- STM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- PNC (Biotika, Slovenská Ľupča, Slovenská republika)

Kultivační médium bylo připravováno sterilně ve flowboxu tak, že nejprve byl připraven roztok smícháním 450 ml MEM-Eagle, 5 ml pyruvátu sodného, 50 ml fetálního séra, 500 µl neesenciálních aminokyselin, 2,5 ml streptomycinu a 250 µl penicilinu. Tento roztok byl zfiltrován přes filtr od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) do sterilní skleněné láhve, sterilně uzavřen a uchováván v lednici.

4.1.2 Seznam a příprava použitých roztoků

10× PBS

- KH_2PO_4 (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- NaCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- KCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- destilovaná voda

V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 2 g KH_2PO_4 , 32,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 80 g NaCl a 2 g KCl. pH bylo upraveno na 7,4 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH. Roztok byl v odměrném válci doplněn do 1 l. Pufr byl poté autoklávován a uchováván při laboratorní teplotě.

1× PBS

- 10× PBS
- sterilní TK H_2O

100 ml pufru 10× PBS bylo v odměrném válci doplněno do 1 l sterilní TK H_2O . Hotový pufr byl uchováván v lednici.

1× PBS + 1% FCSI

- 1× PBS
- FCSI (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Německo)

Do 990 ml 1× PBS bylo přidáno 10 ml FCSI.

1×PBS + 0,25% Triton X-100

- 1× PBS
- Triton X-100 (Koch-Light Laboratories, Buckinghamshire, UK)

Ze 100 ml pufru 1× PBS bylo odpipetováno do odpadu 250 μl a přidáno 250 μl Tritonu X-100.

1× PBS-T (1× PBS + 0,5% Tween 20 + 0,1% BSA)

- 1× PBS
- BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

100 mg BSA bylo rozpuštěno v 0,5 ml Tween 20 a do 100 ml doplněno 1× PBS.

1× PBS + 1% glycin

- 1× PBS
- glycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

1 g glycinu byl rozpuštěn v 99 ml 1× PBS.

1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40

- 1× PBS
- BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- NP-40 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

100 mg BSA bylo rozpuštěno ve 100 µl NP-40 a do 100 ml doplněno 1× PBS.

1× PBS + 1% formaldehyd + 0,05% NP-40

- 1× PBS
- formaldehyd (Fagron, Rotterdam, Nizozemsko)
- NP-40 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

1 ml formaldehydu a 50 µl NP-40 bylo do 100 ml doplněno 1× PBS.

Sterilní TK H₂O

- destilovaná voda

Autoklávovaná destilovaná voda uchovávaná v lednici.

Roztok MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)

- MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- fyziologický roztok – 0,9% vodný roztok NaCl

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) byl ředěn do sterilního fyziologického roztoku na výslednou koncentraci 5 mg/ml. Poté byl roztok zfiltrován, rozplněn do 50ml falkon (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) a zamražen.

Roztok 10% SDS (dodecylsírán sodný)

- SDS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- destilovaná voda

50 g dodecylsíránu sodného bylo doplněno do 500 ml destilovanou vodou. pH bylo upraveno na hodnotu 5. Roztok byl uchováván ve tmavém zábrusovém skle.

1 mmol/l roztok 5-brom-2'-deoxyuridinu (BrdU)

- 99% 5-brom-2'-deoxyuridin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

0,3071 mg 99% 5-brom-2'-deoxyuridinu bylo doplněno do 1 ml médiem RPMI-1640.

100 mmol/l roztok 5-bromuridinu (BrU)

- 98% 5-bromuridin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

32,3 mg 98% 5-bromuridinu bylo doplněno do 1 ml médiem RPMI-1640.

RNáza A + PI

- RNáza A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- PI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- 1× PBS

50 mg RNázy A a 5 mg PI bylo rozpuštěno ve 100 ml 1× PBS.

RNáza A

- RNáza A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- 1× PBS
- 1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40

50 mg RNázy A bylo rozpuštěno v 5 ml 1× PBS (pro metodu BrdU); 50 mg RNázy A bylo rozpuštěno v 5 ml 1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40 (pro metodu BrU).

PI

- PI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- 1× PBS
- 1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40

250 µg PI bylo rozpuštěno v 5 ml 1× PBS (pro metodu BrdU); 250 µg PI bylo rozpuštěno v 5 ml 1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40 (pro metodu BrU).

2N HCl/0,5% Triton X-100

- 2N HCl (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

995 ml 2N HCl bylo doplněno 5 ml Tritonu X-100.

70% ethanol

- 99% ethanol (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové, Česká republika)
- TK H₂O

70 ml 99% ethanolu bylo smícháno s 29 ml TK H₂O.

0,1 mol/l roztok boraxu (tetraboritan disodný)

- Na₂B₄O₇·10H₂O (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- TK H₂O

3,82 g Na₂B₄O₇·10H₂O bylo doplněno do 100 ml TK H₂O.

4.1.3 Testované látky

Testované látky byly označeny interními kódy Laboratoře experimentální medicíny (LEM, Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc). Tyto kódy jsou: LEM 525, LEM 526, LEM 527, LEM 529, LEM 530, LEM 531, LEM 532, LEM 533, LEM 534, LEM 573, LEM 574, LEM 575 a LEM 576. Látky patří do skupiny chelátorů, o nichž je pojednáno v kapitole 3.3 *Chelátory v protinádorové terapii* v teoretické části práce. Chemická struktura testovaných látek je chráněna, proto nemůže být v této práci zveřejněna. Ředění LEM látek je uvedeno v následující Tab. I, Tab. II a Tab. III.

Tab. I: Vzor 96-jamkového panelu (ohraňováno dvojitou čarou) a sestupné ředící řady testovaných látek LEM 525, LEM 526, LEM 527, LEM 529, LEM 530. Koncentrace zde uváděná je v $\mu\text{mol/l}$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	BLANK	KONTROLA	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
C			12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
D			3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125
E			0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781
F			0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195
G			0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			<i>LEM 525</i>		<i>LEM 526</i>		<i>LEM 527</i>		<i>LEM 529</i>		<i>LEM 530</i>	

Tab. II: Vzor 96-jamkového panelu (ohraničeno dvojitou čarou) a sestupné ředící řady testovaných látek LEM 531, LEM 532, LEM 533, LEM 534. Koncentrace zde uváděná je v $\mu\text{mol/l}$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B	BLANK	KONTROLA	50	50	50	50	50	50	50	50	-	-	
C			12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	-	-
D			3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	-	-
E			0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	-	-
F			0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	-	-
G			0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			<i>LEM 531</i>		<i>LEM 532</i>		<i>LEM 533</i>		<i>LEM 534</i>				

Tab. III: Vzor 96-jamkového panelu (ohraničeno dvojitou čarou) a sestupné ředící řady testovaných látek LEM 573, LEM 574, LEM 575, LEM 576. Koncentrace zde uváděná je v $\mu\text{mol/l}$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B	BLANK	KONTROLA	50	50	50	50	50	50	50	50	-	-	
C			12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	-	-
D			3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	-	-
E			0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	-	-
F			0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	-	-
G			0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			<i>LEM 573</i>		<i>LEM 574</i>		<i>LEM 575</i>		<i>LEM 576</i>				

4.1.4 Biologický materiál

Buněčné linie, používané pro experimenty pro tuto bakalářskou práci, byly zakoupeny od různých firem. U2OS, C6, U87MG, CCRF-CEM (všechny od firmy ATCC, Manassas, Virginia, USA), HCT116 Parental, HCT116 p53 (-/-), HCT116 K-Ras (+/-) a HCT116 p53 (R248W/-). Všechny HCT linie byly zakoupeny od firmy Horizon (Cambridge, UK). Linie jsou adherentní (mimo CCRF-CEM – suspenzní linie) a většina je izolována z lidských tkání, viz rozdělení v následující tabulce (Tab. IV).

Tab. IV: Seznam použitých linií, jejich původu, typů rakoviny, ze kterých byly izolovány a jejich příslušná kultivační média.

	<i>lidský původ</i>				<i>krysí původ</i>
název linie	U2OS	U87MG	HCT116	CCRF-CEM	C6
typ rakoviny	kostní tkáň	mozková tkáň	tlusté střevo	periferní krev	mozková tkáň
kultivační médium	McCOY 10% FCSI PNC, STM L-glutamin	EMEM 10% FCSI PNC, STM L-glutamin PYNA neesenciální aminokyseliny	McCOY 10% FCSI PNC, STM L-glutamin	RPMI-1640 10% FCSI PNC, STM	RPMI-1640 10% FCSI PNC, STM

4.1.5 Příprava buněk pro experiment

Na začátku byly buněčné nádorové linie rozmrazeny. Standardně jsou uchovávány v kapalném dusíku. Po rozmražení buněk bylo dalším krokem jejich první nasazení na láhev. K tomu byly používány plastové láhve tří různých objemů – 25 ml, 50 ml a 75 ml (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko).

4.1.5.1 Kultivace a pasážování buněk

Buňky, které byly využívány k experimentům, bylo nutno pro tyto pokusy připravit. K těmto úkonům patřila kultivace a pasážování buněk. Veškerá práce s buňkami probíhala ve sterilních podmínkách – ve flowboxu Herasafe (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Kultivace byla zahájena na nejmenší plastové láhvi o objemu 25 ml. K buňkám bylo přidáno cca 5 ml média, které slouží jako jejich živný roztok, a byly vloženy

do inkubátoru Heracell™ 150i (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). V inkubátoru byla udržována teplota okolo 37 °C a 5% prostředí CO₂. Po uplynutí asi dvou dnů – po rozmnožení buněk a jejich kontrole pod mikroskopem Primo Vert (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo), bylo potřeba buňky zpasážovat. Mikroskopicky byl zhodnocen růst buněčné linie od poslední pasáže a byla vyloučena kontaminace.

Pro pasážování adherentních buněčných linií byl zvolen následující postup. Obsah láhve byl slit do odpadu, čímž je odstraněno staré, nutričně vypotřebované kultivační médium. Při tomto kroku je nutno dbát zvýšené opatrnosti a dodržovat sterilní podmínky, např. aby se hrdlo plastové láhve nedotklo odpadové nádoby. Následovalo promytí. Do láhve bylo přidáno přibližně 5 ml (objem dle potřeby a velikosti láhve) 1× PBS pufru, čímž došlo k vymytí posledních zbytků buněčné suspenze, a tekutina byla znovu slita do odpadu. Tento krok byl zopakován ještě jednou z důvodu vyšší efektivity. Dále bylo do láhve napipetováno 1 ml trypsinu nebo TrypLE™ (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Látka TrypLE™ funguje na stejném principu jako trávicí enzym trypsin a může být proto využívána jako jeho náhrada. Láhev byla uzavřena víčkem a probíhala tzv. *trypsinizace*. Zde se doba působení lišila dle jednotlivých buněčných linií, orientační doba však byla asi 8 minut. Pod mikroskopem bylo možno průběžně kontrolovat, jestli se buňky již uvolňují. Trypsin i TrypLE™ jsou standardně čiré roztoky, s obsahem uvolněných buněk došlo k jejich zakalení. Dle tohoto jevu se proto bylo možno orientovat. Poté byla trypsinizace ukončena přidáním kultivačního média. Pokud bylo pasážování součástí experimentu, trypsinizace byla zastavena asi 10 ml příslušného kultivačního média. V případech, kdy pasážování nebylo součástí experimentu, ale bylo jen rutinním krokem při množení linií, používalo se k zastavení trypsinizace kultivační médium pro danou buněčnou linii. Tekutina s buňkami byla skoro celá slita, v láhvi byla nechána jen tzv. *násada*, což je odhadnutý objem, či množství buněk, které bylo potřeba v láhvi ponechat, aby bylo možné další množení buněk. K této násadě byl přidán potřebný objem daného kultivačního média. Takto byla láhev přichystána pro další kultivaci a uchována v inkubátoru. Po cca dvou dnech, či dle potřeby a rychlosti množení buněk, se pasážování opakovalo stejným postupem. Pasážování suspenzní buněčné linie probíhalo bez promývacích kroků – pouze bylo k násadě buněk přidáno nové médium.

4.1.6 Příprava testovaných látek

Nové organické látky, které byly pro mou experimentální práci nasyntetizovány, byly zamraženy v zásobním roztoku o koncentraci 10 mmol/l v DMSO v kryozkumavkách zakoupených od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko). Od všech požadovaných látek bylo po rozmražení odebráno alikvotní množství do 1,5ml mikrozkuvek typu Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Německo). S těmito alikvoty se pracovalo po celou dobu experimentu. Zbylé objemy byly v původních kryozkumavkách opět zamraženy.

4.1.7 Testování cytotoxicity – MTT test

4.1.7.1 Příprava zásobních panelů

Zásobní panely byly nezbytnou součástí již od počátku experimentu. Jelikož třináct testovaných látek odpovídalo třem 96-jamkovým panelům, byl tento počet panelů přichystán a byly označeny jako panely zásobní.

Ze zásobníku ve flowboxu bylo nachystáno třináct 1,5ml mikrozkuvek (Eppendorf AG, Hamburg, Německo) a do všech napipetováno 487,5 μ l RPMI-1640 média. Do každé této mikrozkuvky s médiem bylo napipetováno 12,5 μ l testované LEM látky. Celý objem byl propipetován a dle rozpisu (Tab. I, II, III) přibližně rozdělen do dvou jamek 96-jamkového panelu. Dále bylo do jamek C, D, E, F, G pouze do sloupců 3, 5, 7, 9, eventuálně i 11 napipetováno po 180 μ l RPMI-1640 média. Pro vytvoření ředící řady bylo mikropipetou sestupně z horních řad přenášeno po 60 μ l z jamek B sestupně až k jamkám G, pouze ve výše uváděných lichých sloupcích. Každý objemový přenos byl v jamce propipetován, čímž došlo k promíchání roztoku. V jamce G bylo 60 μ l ponecháno. Takovým způsobem byly připraveny pro další práci všechny tři zásobní panely.

4.1.7.2 Příprava pracovních panelů

Byl nachystán potřebný počet pracovních panelů. V tomto kroku se již pracovalo s každou látkou ve trojím opakování. Panely byly popsány pro pozdější lepší orientaci a případné dohledávání. Všechny panely (v této části experimentu se pracovalo s devíti panely) byly rozděleny do tří oddílů po třech. Do každého bylo napipetováno multikanálovou mikropipetou (Eppendorf AG, Hamburg, Německo) po 100 μ l

RPMI-1640 média do sloupce 1, řady B až G → *blank* a 20 µl RPMI-1640 média do sloupce 2, řady B až G → *kontrola*. Řada A a H není v panelu zpravidla využívána, protože by v ní mohlo docházet k nechtěnému odpařování.

Do sloupců 3 až 10 (resp. 3 až 12 v případě, že byl panel zaplněn celý) bylo v dubletech přeneseno multikanálovou mikropipetou po 20 µl ředící řady látky předem připravené v zásobních panelech. Po tomto kroku již nebyly zásobní panely potřebné. V pracovních panelech byly okrajové nevyužité jamky zakapány pomocí injekční stříkačky autoklávanou destilovanou vodou, připravovanou v místě pracoviště, tzv. *TK H₂O* (sterilní voda pro účely laboratoře tkáňových kultur). Funguje jako ochrana proti odpařování z jamek nejbližších okrajům panelu. Nakonec byly pracovní panely přeskládány tak, aby v každé sérii byly zastoupeny všechny testované látky.

Pokračováním bylo pasážování buněk, které byly napěstovány na třech plastových láhvích střední velikosti – 75 ml, z důvodu trojího opakování při experimentu. Postup pasážování byl uveden v kapitole 4.1.5.1 *Kultivace a pasážování buněk*. Médium RPMI-1640 bylo využíváno pro všechny experimenty testující cytotoxicitu na 96-jamkových panelech.

Jelikož testování probíhalo v trojím opakování, byl objem každé zpasážované láhve slit do samostatné falkony (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko). Falkony byly stočeny v centrifuze Hettich Rotina 420R (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, UK) nastavené na 1 500 otáček a 5 min. Po centrifugaci byl obsah falkon slit do odpadu. Pelety buněk na dně falkon byly rozklepnuty a bylo k nim přidáno po 15 ml RPMI-1640 média. Obsah falkon byl promíchán a cca 600 µl bylo odebráno do speciální mikronádobky a vloženo do přístroje Vi-CELL XR2.03 (Beckman Coulter, Brea, Kalifornie, USA), který sloužil na počítání buněk v 1 ml buněčné suspenze a určování viability buněk. Dle výsledku z tohoto analyzáru byl přepočítán potřebný objem buněk pro experiment. Pro jeden panel bylo zapotřebí 437 500 buněk/7 ml buněčné suspenze. Na tři panely bylo proto zapotřebí $1,3125 \cdot 10^6$ buněk/21 ml buněčné suspenze. Tento výsledný počet buněk byl vydělen počtem živých buněk, které zjistil v 1 ml vzorku software Vi-CELL. Výsledek určoval objem buněčné suspenze v mililitrech, které bylo nutno odebrat z dané falkony do Petriho misky a doplnit jej čistým RPMI-1640 médiem do objemu 21 ml. Petriho miska s těmito dvěma složkami byla promíchána. Tento postup byl opakován i s dvěma zbylými falkonami.

Víka panelů byla popsána názvem buněčné linie, datem vysetí buněk a datem ukončení experimentu. Multikanálovou mikropipetou bylo napipetováno po 80 μ l připravené buněčné suspenze do sloupců 2 až 10 (resp. 2 až 12) řady B až G. Posledním krokem bylo uložení pracovních panelů do inkubátoru.

4.1.7.3 Ukončení MTT testu

Po třídenní inkubaci pracovních panelů byly tyto vyjmuty z inkubátoru. Roztok MTT neboli 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), jehož příprava je uvedena v kapitole 4.1.2 *Seznam a příprava použitých roztoků*, uchováván v -18 °C, byl rozmražen. Multikanálovou mikropipetou bylo do všech využitých jamek 96-jamkového panelu přidáno po 10 μ l tohoto MTT roztoku. Panely byly vráceny do inkubátoru a v průběhu jedné až dvou hodin byly mikroskopicky kontrolovány, zda se již tvoří v jamkách modré krystaly nerozpustného formazanu. Jakmile byla tvorba těchto krystalů dostatečná a jasně viditelná, byly panely vytaženy z inkubátoru a multikanálovou mikropipetou byly všechny využívané jamky zakapány po 100 μ l roztokem SDS neboli dodecylsíranu sodného (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Přidáním SDS došlo k rozpuštění krystalů formazanu. Takto byly panely připraveny pro měření na spektrofotometru, které se provádělo po 24 hodinách od přidání SDS.

4.1.7.4 Spektrofotometrie a analýza výsledků

Všechny pracovní panely byly proměřeny na spektrofotometru IEMS Reader MF od firmy Labsystems (Helsinki, Finsko) při vlnové délce 540 nm, nastavitelné v software Genesis v. 3.05, dodávaného ke spektrofotometru. Výsledky byly uloženy v programu MS Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) a v něm také upraveny pro použití v software CytoRezist v. 3.3.3 (L. Ličman, software pro BIOMEDREG). V tomto programu byly vytvořeny tzv. *masky* panelů, přes něž byla vyhodnocena veškerá spektrofotometrická data týkající se hlavně hodnot IC₅₀. Výsledky byly protokolovány a zpracovány do tabulek v programu MS Office Excel 2007. Byly vyhodnoceny průměry dat a směrodatné odchylky.

4.1.8 Fluorescenční mikroskopie

Pro tento úkol byla použita buněčná linie lidského osteosarkomu U2OS, z důvodu obecného doporučení této linie pro mikroskopii, a popisované testované látky s kódy LEM. Příprava vzorků pro mikroskopii probíhala ve flowboxu, ve sterilních podmínkách.

Buněčná suspenze byla naředěna médiem McCOY tak, aby bylo získáno 60 000 buněk/1 ml. Do speciálního 96-jamkového panelu ViewPlate-96 Black (PerkinElmer, Massachusetts, USA) bylo napipetováno mikropipetou po 100 μ l této buněčné suspenze, a to do jamek prvních šesti sloupců a řad A až H. Panel byl vložen přes noc do inkubátoru, aby buňky adherovaly na vnitřní plochu jamek. Do jedné sady 1,5ml mikrozkuvek bylo napipetováno po 1 μ l každé testované látky LEM o koncentraci 10 mmol/l a po 9 μ l DMSO neboli dimethylsulfoxidu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Tímto vznikly roztoky o koncentraci 1 mmol/l. Do druhé sady 1,5ml mikrozkuvek bylo napipetováno po 1 μ l každé testované látky LEM o koncentraci 10 mmol/l a po 99 μ l DMSO. Tímto vznikly roztoky o koncentraci 100 μ mol/l. Takto připravené roztoky byly do dalšího dne zamrazeny.

Následující den bylo po 1 μ l připravených roztoků pipetováno v dubletech k adherovaným buňkám v panelu, díky čemuž bylo v jamkách dosaženo koncentrací 1 a 10 μ mol/l. Poté byla pozorována fluorescence v jednotlivých jamkách panelu pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axio Observer.D1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo) s použitím zeleného, modrého a červeného filtru. Pro pořízení a editaci snímků byl použit software ZEN 2012 (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo).

4.1.9 Průtoková cytometrie

4.1.9.1 Fosforylace histonu H3-P

Nádorové buněčné linie CCRF-CEM (odvozené od akutní lymfoblastické leukémie) s testovanými látkami byly inkubovány v inkubátoru Heracell™ 150i (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) v 6-jamkových panelech (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) po dobu 24 h. Po této době byly buňky přepipetovány do 10ml zkumavek (GAMA GROUP, České Budějovice, Česká republika). Centrifuga Hettich Rotina 420R (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, UK) byla nastavena na 2000 rpm, 5 min a laboratorní teplotu (24 °C). Pro další úkony se nastavení centrifugy neměnilo. Buňky ve zkumavkách byly stočeny a následně byl odsát supernatant. K peletám bylo napipetováno po 1 ml 1× PBS + 1% FCSI. Zkumavky byly opět stočeny a supernatant byl odsát. Na vortexu Genie 2T (Scientific Industries, New York, USA) bylo do každé zkumavky přidáno po 1 ml vychlazeného 1× PBS + 0,25% Triton X-100 a vloženo na 15 min do ledu. Po této době bylo do zkumavek přidáno po 5 ml PBS + 1% FCSI, následně stočeno a odsáto. Dále bylo k peletám přidáno po 100 µl zředěné (1 : 500, ředěno v 1× PBS + 1% FCSI) primární protilátky Anti-phospho-Histone H3 (Merck Millipore, Massachusetts, USA) a promícháno pipetou. Inkubace probíhala 1 h při laboratorní teplotě. Po 30 min znovu promícháno. Po uplynutí celkové doby bylo přidáno po 5 ml 1× PBS + 1% FCSI, následně stočeno a odsáto. Dále bylo k peletám přidáno po 100 µl zředěné (1 : 500, ředěno v 1× PBS + 1% FCSI) sekundární protilátky Alexy Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA) a promícháno pipetou. Inkubace probíhala 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Bylo přidáno po 5 ml 1× PBS + 1% FCSI, následně stočeno a odsáto. Nakonec bylo přidáno 700 µl RNázy A + PI a inkubace probíhala ve vodní lázni SUB Aqua 12 Plus (Grant Instruments, Royston, UK) po dobu 30 min ve tmě při 37 °C. Konečná suspenze byla přepipetována do cytometrických zkumavek (Becton Dickinson, New Jersey, USA) a byla provedena analýza buněčného cyklu, histonu a apoptózy na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

4.1.9.2 BrdU – analýza syntézy DNA

Fixace: Nádorové buněčné linie CCRF-CEM (odvozené od akutní lymfoblastické leukémie) s testovanými látkami byly inkubovány v inkubátoru Heracell™ 150i (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) v 6-jamkových panelech (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) po dobu 23,5 h. Po uplynutí této doby bylo do jednotlivých jamek přidáno po 40 µl zásobního roztoku 5-bromo-2'-deoxyuridinu o koncentraci 1 mmol/l a inkubace probíhala dalších 30 min. Buněčná suspenze byla přepipetována do 10ml zkumavek (GAMA GROUP, České Budějovice, Česká republika) a stočena na centrifuze Hettich Rotina 420R (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, UK) při 500 g, 4 min a 4 °C. Supernatant byl odsát. Do každé zkumavky bylo přidáno po 3 ml 1× PBS, následně stočeno a odsáto. Při slabých otáčkách vortexu Genie 2T (Scientific Industries, New York, USA) bylo po kapkách přidáno po 2 ml 70% ledového ethanolu. Zkumavky byly v tomto kroku přes noc zamrazeny.

Analýza: Centrifuga byla nastavena na 500 g, 5 min a laboratorní teplotu (24 °C). Pro další úkony se nastavení centrifugy neměnilo. Po 1 ml fixovaných buněčných suspenzí bylo přepipetováno do cytometrických zkumavek (Becton Dickinson, New Jersey, USA), stočeno, odsáto. Při slabých otáčkách vortexu bylo po kapkách přidáno po 2 ml 2N HCl/Triton X-100 a inkubováno 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Zkumavky byly stočeny, supernatant odsát, do každé přidáno po 2 ml boraxu o koncentraci 0,1 mol/l a opět stočeno, odsáto. Dále bylo přidáno po 2 ml 1× PBS-T, následně stočeno, odsáto a přidáno po 200 µl zředěné (1 : 250, ředěno v 1× PBS) primární protilátky Anti-BrdU (EXBIO, Praha, Česká republika). Zkumavky byly inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Ke každé bylo připipetováno po 2 ml PBS-T, následně stočeno, odsáto a přidáno po 200 µl zředěné (1 : 250, ředěno v 1× PBS) sekundární protilátky Anti-Mouse-IgG-FITC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Zkumavky byly inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Ke každé bylo dále připipetováno po 2 ml PBS-T, stočeno, odsáto a přidáno po 100 µl RNázy A. Zkumavky byly inkubovány 15 min ve tmě při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno po 600 µl propidium jodidu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) a inkubováno 15 min ve vodní lázni SUB Aqua 12 Plus (Grant Instruments, Royston, UK) při 37 °C. Po následných 30 min v lednici

byla provedena BrdU – analýza syntézy DNA na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

4.1.9.3 BrU – analýza syntézy RNA

Fixace: Nádorové buněčné linie CCRF-CEM (odvozené od akutní lymfoblastické leukémie) s testovanými látkami byly inkubovány v inkubátoru Heracell™ 150i (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) v 6-jamkových panelech (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) po dobu 23,5 h. Po uplynutí této doby bylo do jednotlivých jamek přidáno po 40 µl zásobního roztoku 5-bromuridinu o koncentraci 100 mmol/l a inkubace probíhala dalších 30 min. Buněčná suspenze byla přepipetována do 10ml zkumavek (GAMA GROUP, České Budějovice, Česká republika) a stočena na centrifuze Hettich Rotina 420R (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, UK) při 500 g, 4 min a 4 °C. Supernatant byl odsát. Do každé zkumavky bylo přidáno po 3 ml 1× PBS, následně stočeno a odsáto. Při slabých otáčkách vortexu Genie 2T (Scientific Industries, New York, USA) bylo po kapkách přidáno po 2 ml 1× PBS + 1% formaldehyd + 0,05% NP-40. Zkumavky byly promíchávány po dobu 15 min na rotátoru Multi RS-60 (Biosan, Riga, Lotyšsko) při laboratorní teplotě.

Analýza: Centrifuga byla nastavena na 500 g, 5 min a 4 °C. Pro další úkony se nastavení centrifugy neměnilo. Zkumavky s fixovanými buňkami byly stočeny, supernatant byl odsát a ke každé zkumavce bylo přidáno po 3 ml 1× PBS + 1% glycin a znovu stočeno, odsáto. Dále bylo přidáno po 100 µl zředěné (1 : 250, ředěno v 1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40) primární protilátky Anti-BrdU (EXBIO, Praha, Česká republika). Zkumavky byly inkubovány 45 min ve tmě při laboratorní teplotě. Ke každé bylo připipetováno po 3 ml 1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40, následně stočeno, odsáto a přidáno po 100 µl zředěné (1 : 250, ředěno v 1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40) sekundární protilátky Anti-Mouse-IgG-FITC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Zkumavky byly inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Ke každé bylo připipetováno po 3 ml 1× PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40, následně stočeno, odsáto a na vortexu při nejvyšších otáčkách po kapkách přidáno po 1 ml 1× PBS + 1% formaldehyd + 0,05% NP-40. Zkumavky byly promíchávány po dobu 15 min ve tmě na rotátoru Multi RS-60 při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly inkubovány v lednici při 4 °C po dobu 1 h a následně stočeny, odsáty. Ke každé

bylo přidáno po 100 μ l RNázy A a inkubováno 15 min ve tmě při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno po 600 μ l propidium jodidu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) a inkubováno ve tmě při laboratorní teplotě dalších 15 min. Konečná suspenze byla přepipetována do cytometrických zkumavek (Becton Dickinson, New Jersey, USA) a byla provedena BrU – analýza syntézy RNA na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

5 Výsledky

5.1 Testování cytotoxicity – MTT test

Po třídenních kultivacích buněčných linií U2OS, C6, U87MG, HCT116 Parental, HCT116 p53 (-/-), HCT116 K-Ras (+/-) a HCT116 p53 (R248W/-) s testovanými látkami LEM 525, LEM 526, LEM 527, LEM 529, LEM 530, LEM 531, LEM 532, LEM 533, LEM 534, LEM 573, LEM 574, LEM 575 a LEM 576 pomocí MTT testu byla hodnocena míra cytotoxicity. Jednotlivé koncentrace byly testovány v dubletech. Čtyřnásobná ředící řada testovaných látek začínala na koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ a končila na koncentraci 0,049 $\mu\text{mol/l}$. Výsledné průměrné hodnoty IC50 a směrodatných odchylek byly sestaveny do tabulky (Tab. V).

U nádorové buněčné linie U2OS vykazovala nejnižší hodnoty IC50 látka LEM 526 a naopak nejvyšší látka LEM 574 a LEM 525. U linie U87MG byly nejnižší hodnoty zjištěny u látky LEM 534 a nejvyšší u látky LEM 574 a 576. U linie C6 byly nejnižší hodnoty u LEM 526 a nejvyšší u LEM 574. U linií HCT116 Parental a HCT116 p53 (-/-) byly nejnižší hodnoty IC50 zjištěny u látky LEM 573 a nejvyšší u LEM 576. U linie HCT116 K-Ras (+/-) byly nejnižší hodnoty u LEM 573 a nejvyšší u LEM 525. A u poslední testované linie – HCT116 p53 (R248W/-) byly zjištěny nejnižší hodnoty IC50 u látky LEM 526 a nejvyšší hodnoty u LEM 574.

Látka LEM 573 pro své omezené množství a následnou nedostupnost nemohla být testována na linii HCT116 p53 (R248W/-), ani dále testována při nižších koncentracích na liniích HCT116 Parental, HCT116 p53 (-/-) a HCT116 K-Ras (+/-).

V rámci tohoto úkolu byl u nejvýznamnějších látek z průměrů hodnot IC50 nenádorových fibroblastických buněčných linií BJ a MRC-5 (zdrojem bylo měření LEM) a z hodnot IC50 nádorových buněčných linií (vlastní měření) vypočítán terapeutický index (TI). Tento index byl stanoven jako poměr hodnot IC50 nenádorových linií k liniím nádorovým. Čím vyšší je výsledná hodnota TI, tím lepší selektivní působení na buněčné linie testovaná látka vykazuje. Všechny hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab. VI).

Tab. V: Výsledné hodnoty ze tří měření (průměr hodnot IC50 ± směrodatná odchylka) získané při vyhodnocování jednotlivých MTT testů (NA – nedostupnost testované látky). Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{mol/l}$.

LEM kód	buněčné linie						
	U2OS	U87MG	C6	HCT116 Parental	HCT116 p53 (-/-)	HCT116 K-Ras (+/-)	HCT116 p53 (R248W/-)
LEM 525	37,754 ± 3,390	16,004 ± 2,630	2,986 ± 0,322	5,373 ± 1,365	6,543 ± 0,735	7,731 ± 4,994	7,419 ± 4,755
LEM 526	0,955 ± 0,307	1,758 ± 0,322	0,527 ± 0,056	1,024 ± 0,407	0,771 ± 0,222	1,469 ± 0,877	0,607 ± 0,157
LEM 527	4,144 ± 3,087	6,110 ± 1,663	1,749 ± 0,084	2,383 ± 0,334	2,488 ± 0,331	6,375 ± 4,956	3,827 ± 0,884
LEM 529	7,822 ± 2,876	8,078 ± 1,776	1,651 ± 0,205	3,144 ± 0,377	3,501 ± 0,864	4,484 ± 1,841	3,976 ± 0,731
LEM 530	3,158 ± 2,758	3,675 ± 2,664	1,508 ± 0,123	1,820 ± 0,165	2,289 ± 0,276	1,902 ± 0,690	6,808 ± 6,767
LEM 531	1,863 ± 0,856	5,104 ± 1,113	1,821 ± 0,707	1,639 ± 0,716	2,014 ± 0,194	3,194 ± 0,728	2,173 ± 0,780
LEM 532	3,612 ± 3,360	6,305 ± 1,189	0,985 ± 0,358	6,668 ± 3,584	3,675 ± 1,510	3,317 ± 0,966	3,760 ± 0,608
LEM 533	8,523 ± 5,535	5,809 ± 2,700	2,653 ± 1,085	9,259 ± 1,390	6,565 ± 0,714	7,556 ± 4,636	7,313 ± 2,617
LEM 534	1,136 ± 0,454	1,144 ± 0,345	0,756 ± 0,508	1,877 ± 0,459	1,361 ± 0,337	0,967 ± 0,112	0,903 ± 0,134
LEM 573	1,866 ± 0,177	1,555 ± 0,389	8,790 ± 0,233	0,123 ± 0,055	0,049 ± 0	0,044 ± 0,012	NA
LEM 574	50 ± 0	50 ± 0	14,714 ± 0,600	2,411 ± 0,153	2,363 ± 0,095	3,924 ± 0,233	20 ± 0
LEM 575	1,481 ± 0,355	2,606 ± 0,258	0,745 ± 0,162	1,419 ± 0,187	0,720 ± 0,168	1,160 ± 0,236	1,152 ± 0,059
LEM 576	10,750 ± 0,982	39,958 ± 8,259	2,258 ± 0,162	10,048 ± 1,526	8,300 ± 0,953	4,889 ± 0,190	13,090 ± 2,203

Tab. VI: Vybrané průměrné hodnoty IC50 nenádorových fibroblastických buněčných linií BJ a MRC-5, nádorových buněčných linií U2OS a vypočtené hodnoty terapeutického indexu (TI). Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{mol/l}$.

	LEM 526	LEM 534	LEM 573
BJ a MRC-5 (nenádorová linie)	16,278	17,037	7,059
U2OS (nádorová l.)	0,955	-	-
<i>TI</i>	17,045	-	-
U87MG (nádorová l.)	-	1,144	-
<i>TI</i>	-	14,893	-
C6 (nádorová l.)	0,527	-	-
<i>TI</i>	30,888	-	-
HCT116 Parental (nádorová l.)	-	-	0,123
<i>TI</i>	-	-	57,390
HCT116 p53 (-/-) (nádorová l.)	-	-	0,049
<i>TI</i>	-	-	144,061
HCT116 K-Ras (+/-) (nádorová l.)	-	-	0,044
<i>TI</i>	-	-	160,432
HCT116 p53 (R248W/-) (nádorová l.)	0,607	-	-
<i>TI</i>	26,817	-	-

5.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axio Observer.D1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo) byla pozorována fluorescence testovaných látek s použitím filtrů – zeleného (520 nm), modrého (480 nm) a červeného (580 nm) na nádorové buněčné linii U2OS, a to v jednotlivých jamkách 96-jamkového panelu ViewPlate-96 Black (PerkinElmer, Massachusetts, USA), kde byly buňky adherovány. Pokud buňky vykazovaly fluorescenci v některém ze tří barevných kanálů, byl nasnímán jejich mikroskopický obraz pomocí software ZEN 2012 (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo). Snímky jsou prezentovány na následujících stranách (Obr. 9, 10). Fluorescence byla způsobena kumulací testovaných látek v buňkách.

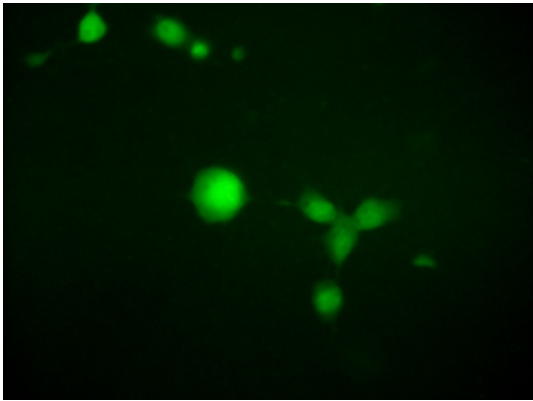
Při koncentraci látky 10 $\mu\text{mol/l}$ byla zjištěna významnější fluorescence pouze u látky LEM 576, a to při pozorování pod zeleným filtrem.

Při koncentraci látky 1 $\mu\text{mol/l}$ byla zjištěna významná fluorescence u látky LEM 574, která byla pozorována pod zeleným filtrem. O něco slabší fluorescence byla detekována u látky LEM 575, ve stejné koncentraci a s použitím stejného barevného filtru. Dále s použitím stejné koncentrace, ale červeného filtru byla pozorována fluorescence taktéž u látky LEM 574.

Ze snímků bylo zjištěno, že fluoreskuje cytoplazma buňky, ne jádro, v jehož oblasti byly viditelně tmavší místa. Tento jev je doložen na Obr. 11. Pod modrým filtrem nebyla v žádném případě pozorována zřetelná fluorescence.

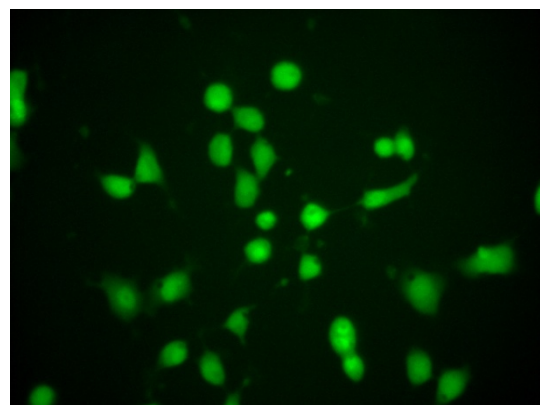
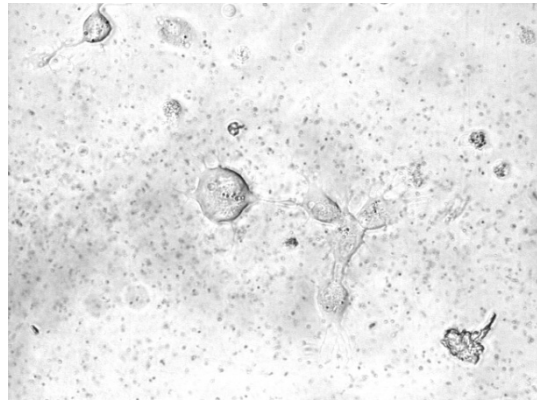
Z průměrů hodnot IC_{50} nenádorových fibroblastických buněčných linií BJ a MRC-5 (zdrojem bylo měření LEM) a z hodnot IC_{50} nádorové buněčné linie U2OS (vlastní měření) byl vypočítán terapeutický index (TI). Všechny hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab. VII).

Fluorescence

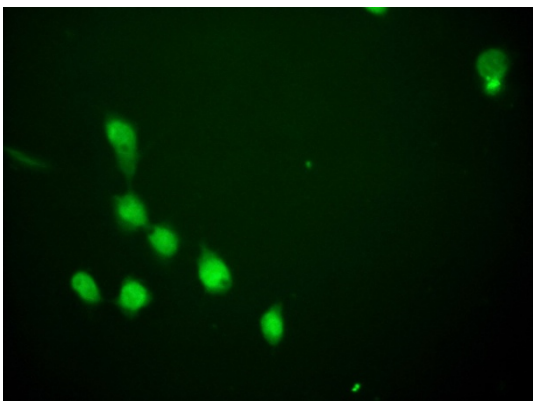


LEM 576 (10 $\mu\text{mol/l}$), zelený filtr (520 nm)

Fázový kontrast



LEM 574 (1 $\mu\text{mol/l}$), zelený filtr (520 nm)

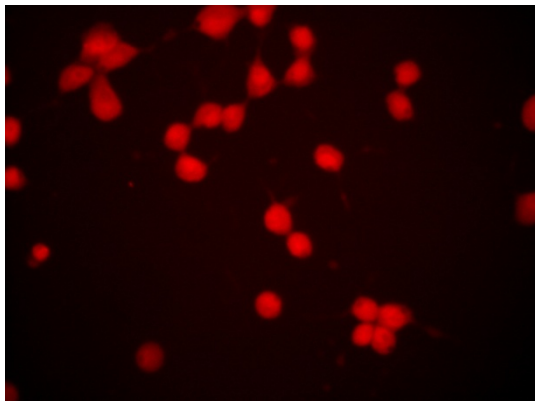


LEM 575 (1 $\mu\text{mol/l}$), zelený filtr (520 nm)



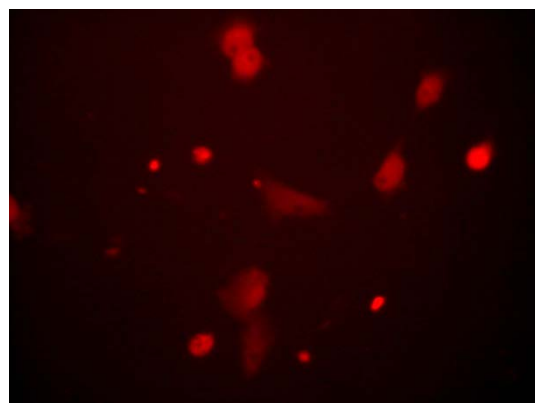
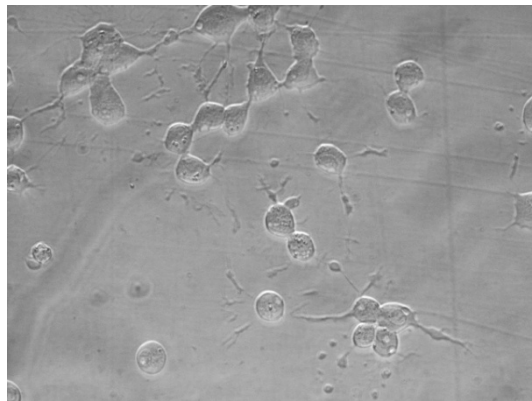
Obr. 9: Vlevo snímky fluorescence vybraných látek s uvedenou koncentrací na nádorové buněčné linii U2OS pozorované pod zeleným filtrem. Vpravo kontrolní snímky fázového kontrastu. Látky seřazeny dle koncentrace a dle použitých filtrů.

Fluorescence

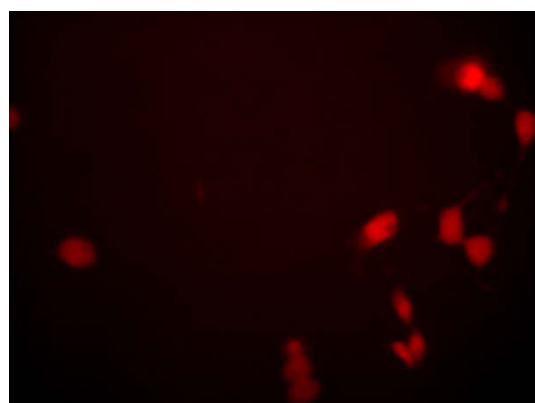


LEM 574 (1 $\mu\text{mol/l}$), červený filtr (580 nm)

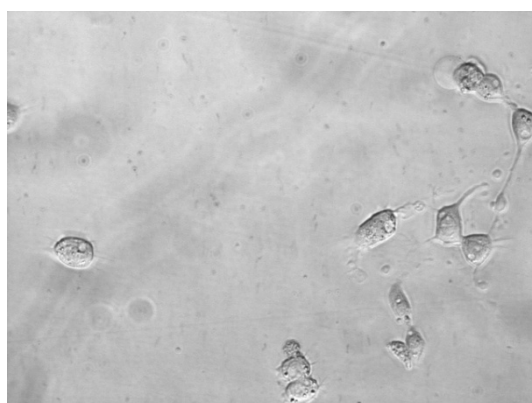
Fázový kontrast



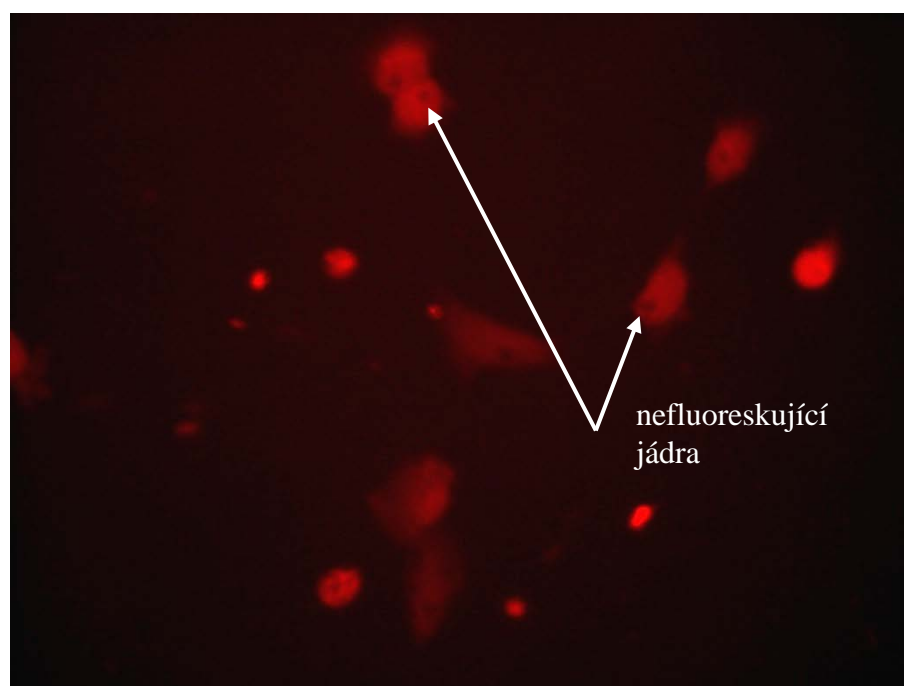
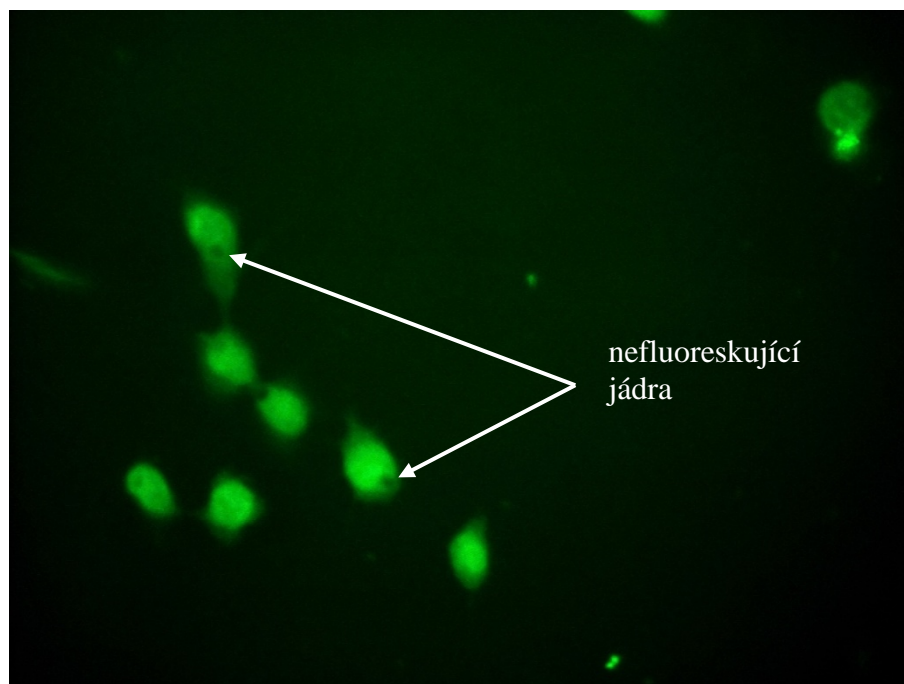
LEM 574 (1 $\mu\text{mol/l}$), červený filtr (580 nm)



LEM 574 (1 $\mu\text{mol/l}$), červený filtr (580 nm)



Obr. 10: Vlevo snímky fluorescence vybraných látek s uvedenou koncentrací na nádorové buněčné linii U2OS pozorované pod červeným filtrem. Vpravo kontrolní snímky fázového kontrastu.



Obr. 11: Vybrané snímky znázorňující nefluoreskující – tmavou oblast jádra a fluorescenci cytoplazmy. Nahoře (zelený filtr) fluorescence látky LEM 575 (1 $\mu\text{mol/l}$) a dole (červený filtr) fluorescence látky LEM 574 (1 $\mu\text{mol/l}$) testované na nádorové buněčné linii U2OS.

Tab. VII: Průměrné hodnoty IC50 nenádorových fibroblastických buněčných linií BJ a MRC-5, nádorové buněčné linie U2OS a vypočtené hodnoty terapeutického indexu (TI). Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{mol/l}$.

LEM kód	průměr IC50 linií BJ a MRC-5	IC50 linie U2OS	TI
LEM 525	32,407	37,754	0,858
LEM 526	16,278	0,955	17,045
LEM 527	14,775	4,144	3,566
LEM 529	28,919	7,822	3,697
LEM 530	29,171	3,158	9,237
LEM 531	29,531	1,863	15,854
LEM 532	17,903	3,612	4,956
LEM 533	39,138	8,523	4,592
LEM 534	17,037	1,136	15,004
LEM 573	7,059	1,866	3,783
LEM 574	20,245	50,000	0,405
LEM 575	8,963	1,481	6,052
LEM 576	90,000	10,750	8,372

5.3 Průtoková cytometrie

Pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey, USA) bylo naměřeno velké množství hodnot, které byly následně seskupeny do tabulky (Tab. VIII). Testování zahrnovalo dvě kontroly a každou testovanou látku v koncentraci $1 \times IC_{50}$ a $5 \times IC_{50}$. Při vyhodnocení buněčného cyklu byly jako významné látky určeny ty, které splňovaly tyto podmínky: G0/G1 fáze – jako *nízké* byly určeny hodnoty pod 30 % celkové buněčné populace a jako *vysoké* hodnoty nad 55 %; S fáze – hodnoty pod 30 % a nad 45 % (analogicky); G2/M fáze – hodnoty pod 10 % a nad 20 %. U histonu to byly hodnoty pod 1 % a nad 3 %.; u apoptózy hodnoty nad 20 %; u syntézy DNA a RNA hodnoty pod 40 % a nad 55 %. V Tab. VIII jsou *nízké* hodnoty značeny zeleným a *vysoké* červeným podbarvením. Z průměrů hodnot IC_{50} nenádorových fibroblastických buněčných linií BJ a MRC-5 (zdrojem bylo měření LEM) a z hodnot IC_{50} nádorové buněčné linie CCRF-CEM (vlastní měření pro tento úkol) byl vypočten terapeutický index (TI). Všechny hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab. IX).

5.3.1 Fosforylace histonu H3-P

Metoda fosforylace histonu byla využita pro následné analyzování buněčného cyklu, histonu a apoptózy.

V G0/G1 fázi buněčného cyklu byly s nízkými hodnotami vyhodnoceny látky LEM 529 (koncentrace $1 \times IC_{50}$) a LEM 525, 527, 530, 531, 533 (koncentrace $5 \times IC_{50}$). Vysoké hodnoty byly zjištěny u látek LEM 573 (koncentrace $1 \times IC_{50}$) a LEM 529, 573, 576 (koncentrace $5 \times IC_{50}$). Při porovnání s kontrolou byla LEM 527 (koncentrace $5 \times IC_{50}$) vyhodnocena jako látka s největším inhibičním účinkem na G0/G1 fázi, a to až o 23,97 %. Největší akumulaci buněk v této fázi způsobovala látka LEM 529 (koncentrace $5 \times IC_{50}$), a to až o 26,93 %. Tyto procentuální hodnoty byly zjištěny vzájemným odečtením jednotlivých naměřených hodnot s kontrolou.

V S fázi buněčného cyklu byly s nízkými hodnotami vyhodnoceny látky LEM 573 (koncentrace $1 \times IC_{50}$) a LEM 529, 573, 574 (koncentrace $5 \times IC_{50}$). Vysoké hodnoty byly zjištěny u látek LEM 529 (koncentrace $1 \times IC_{50}$) a LEM 525, 526, 527, 530, 531, 532, 533 (koncentrace $5 \times IC_{50}$). Při porovnání s kontrolou byla LEM 529 (koncentrace $5 \times IC_{50}$) vyhodnocena jako látka s největším inhibičním účinkem

na S fázi, a to až o 21,15 %. Největší akumulaci buněk v této fázi způsobovala látka LEM 527 (koncentrace 5× IC50), a to až o 25,26 %.

V G2/M fázi buněčného cyklu byla s nízkou hodnotou vyhodnocena látka LEM 576 (koncentrace 5× IC50). Vysoké hodnoty byly zjištěny u látek LEM 525, 526, 527 (koncentrace 1× IC50) a LEM 534, 575 (koncentrace 5× IC50). Při porovnání s kontrolou byla LEM 576 (koncentrace 5× IC50) vyhodnocena jako látka s největším inhibičním účinkem na G2/M fázi, a to až o 7,22 %. Největší akumulaci buněk v této fázi způsobovala látka LEM 575 (koncentrace 5× IC50), a to až o 6,96 %.

Při hodnocení fosforylace histonu byly s nízkými hodnotami vyhodnoceny látky LEM 529, 573 (koncentrace 1× IC50) a LEM 525, 527, 529, 530, 531, 533, 573, 575 (koncentrace 5× IC50). Vysoké hodnoty nebyly zjištěny u žádných látek. Při porovnání s kontrolou byla LEM 529 (koncentrace 5× IC50) vyhodnocena jako látka nejvíce snižující fosforylaci histonu, a to až o 1,71 %. Celkově většina testovaných látek fosforylaci histonu inhibovala. Žádná z látek nebyla významně stimulující.

Při hodnocení míry apoptózy nebyly s nízkými hodnotami vyhodnoceny žádné látky. Vysoké hodnoty byly zjištěny u látek LEM 529, 573, 574, 576 (koncentrace 5× IC50). Při porovnání s kontrolou byla LEM 529 (koncentrace 5× IC50) vyhodnocena jako látka s největším cytotoxickým účinkem, a to 34,62 %. V obecném srovnání koncentrací 1× IC50 a 5× IC50 byla větší míra cytotoxicity pozorována u vyšší koncentrace (5× IC50).

5.3.2 BrdU – analýza syntézy DNA

V rámci metody BrdU byly s nízkými hodnotami vyhodnoceny látky LEM 530, 573 (koncentrace 1× IC50) a LEM 529, 573, 574, 575, 576 (koncentrace 5× IC50). Vysoké hodnoty byly zjištěny u látek LEM 529 (koncentrace 1× IC50) a LEM 525, 526, 527, 530, 531 (koncentrace 5× IC50). Syntézu DNA nejvíce inhibovala látka LEM 573 (koncentrace 5× IC50), a to o 40,34 % v porovnání s kontrolou. Naopak nejvíce syntézu DNA stimulovala LEM 530 (koncentrace 5× IC50), a to o 28,57 %.

5.3.3 BrU – analýza syntézy RNA

V rámci metody BrU byly s nízkými hodnotami vyhodnoceny látky LEM 527, 530, 532, 573, 575, 576 (koncentrace 1× IC50) a LEM 527, 530, 573, 574, 575, 576 (koncentrace 5× IC50). Vysoké hodnoty byly zjištěny u látek LEM 525, 529, 531, 533,

534 (koncentrace $1 \times IC_{50}$) a LEM 525, 531, 533, 534 (koncentrace $5 \times IC_{50}$). Syntézu RNA nejvíce inhibovala látka LEM 530 (koncentrace $5 \times IC_{50}$), a to o 58,18 % v porovnání s kontrolou. Naopak nejvíce syntézu RNA stimulovala LEM 529 (koncentrace $1 \times IC_{50}$), a to o 21,52 %.

Tab. VIII: Shrnutí apoptózy (sub-G1), buněčného cyklu (G0/G1, S, G2/M), histonu (pH3^{Ser10+}), analýzy syntézy DNA (BrdU+) a RNA (BrU+).

LEM kód	% celkové buněčné populace						
	apoptóza	buněčný cyklus			histon	syntéza DNA	syntéza RNA
	sub-G1	G0/G1	S	G2/M	pH3 ^{Ser10+}	BrdU+	BrU+
kontrola	5,47	45,10	38,05	16,86	1,92	50,59	71,37
LEM 525 1×	5,36	42,50	37,19	20,31	1,78	50,78	73,91
LEM 525 5×	9,92	27,08	58,62	14,30	0,81	74,60	87,04
LEM 526 1×	5,62	45,66	33,32	21,02	2,23	46,76	47,24
LEM 526 5×	7,22	36,38	47,36	16,26	1,22	55,94	40,14
LEM 527 1×	6,96	43,99	35,53	20,48	2,25	42,66	37,68
LEM 527 5×	9,13	21,13	63,30	15,57	0,83	65,70	15,58
LEM 529 1×	5,99	28,18	57,47	14,35	0,79	57,36	92,89
LEM 529 5×	40,09	72,02	16,90	11,08	0,21	37,64	54,12
LEM 530 1×	6,24	42,19	39,66	18,16	1,91	23,28	37,12
LEM 530 5×	8,84	25,64	58,81	15,55	0,79	79,15	13,19
LEM 531 1×	6,74	40,14	43,16	16,69	1,74	50,33	85,98
LEM 531 5×	10,78	28,74	58,03	13,23	0,83	59,28	87,84
LEM 532 1×	5,22	48,04	35,02	16,94	2,03	50,87	30,04
LEM 532 5×	12,84	30,72	56,09	13,18	1,09	51,99	46,97
LEM 533 1×	6,43	42,62	38,33	19,05	2,10	46,51	71,55
LEM 533 5×	5,89	27,82	57,42	14,76	0,96	47,61	72,35
LEM 534 1×	7,49	47,85	33,69	18,47	2,47	42,55	70,80
LEM 534 5×	5,21	34,70	44,46	20,84	1,41	48,58	81,01
LEM 573 1×	19,90	59,66	28,91	11,43	0,87	15,79	18,66
LEM 573 5×	30,53	59,91	24,65	15,44	0,82	10,25	26,70
LEM 574 1×	11,45	46,33	39,08	14,59	1,17	47,68	40,09
LEM 574 5×	22,64	53,23	29,39	17,38	1,55	16,56	24,95
LEM 575 1×	8,22	43,53	43,47	12,99	1,37	48,10	28,37
LEM 575 5×	9,49	37,42	38,75	23,82	0,54	38,56	23,72
LEM 576 1×	9,17	46,71	37,90	15,39	1,75	46,40	21,83
LEM 576 5×	21,30	57,42	32,94	9,64	1,12	18,79	34,91

Tab. IX: Vybrané průměrné hodnoty IC50 nenádorových fibroblastických buněčných linií BJ a MRC-5, nádorových buněčných linií CCRF-CEM a vypočtené hodnoty terapeutického indexu (TI). Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{mol/l}$.

LEM kód	průměr IC50 linií BJ a MRC-5	IC50 linie CCRF-CEM	TI
LEM 525	32,407	0,691	46,899
LEM 526	16,278	0,113	144,049
LEM 527	14,775	0,430	34,360
LEM 529	28,919	1,181	24,487
LEM 530	29,171	0,282	103,442
LEM 531	29,531	0,450	65,624
LEM 532	17,903	0,283	63,260
LEM 533	39,138	1,477	26,499
LEM 534	17,037	0,098	173,844
LEM 573	7,059	0,115	61,386
LEM 574	20,245	1,514	13,372
LEM 575	8,963	0,501	17,891
LEM 576	90,000	6,230	14,446

6 Diskuze

Výsledky experimentální části této bakalářské práce nemohou být optimálně porovnány s dříve publikovanými, protože použité testované látky (skupina chelátorů) byly nově syntetizovány pro Ústav molekulární a translační medicíny Olomouc a jejich struktura je po dobu výzkumu chráněna. V žádných publikacích je proto nelze nalézt, neboť na jiných pracovištích nebyly testovány. V této práci byly podrobeny MTT testu, zkoumány pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. U většiny z nich byl stanoven terapeutický index (TI), udávající selektivitu působení testovaných látek na nádorové a nenádorové buněčné linie.

Testování cytotoxicity pomocí MTT testu zahrnovalo látky s kódy LEM a nádorové buněčné linie odvozené od různých typů karcinomů. Do diskuze byly vybrány látky, u kterých byly naměřeny nejnižší hodnoty IC₅₀, tudíž ty, které by byly pro další výzkum nejpřínosnější. Látka LEM 526 vykazovala tyto hodnoty IC₅₀ u linie U2OS, což je linie odvozená od lidského osteosarkomu. Terapeutický index byl stanoven na 17,045, což je, v porovnání s ostatními hodnotami TI, spíše nižší hodnota. Látka LEM 526 vykazovala nízkou hodnotu IC₅₀ u dalších dvou nádorových buněčných linií. První z nich byla linie C6 odvozená od krysího karcinomu mozkové tkáně. Terapeutický index byl vypočten na hodnotu 30,888, což je jedna ze středních hodnot. Druhou byla linie odvozená od kolorektálního karcinomu, HCT116 p53 (R248W/-). V tomto případě byla nízká hodnota IC₅₀ doplněna terapeutickým indexem 26,817. Tento údaj také spadá do pomyslné kategorie středních až nižších hodnot. Látka LEM 526 proto vykazuje největší selektivní působení na nádorovou buněčnou linii C6. U látky LEM 534 byla zjištěna nejnižší hodnota IC₅₀ na nádorové buněčné linii odvozené od lidské mozkové tkáně – U87MG. Terapeutický index byl stanoven na 14,893, což je hodnota relativně nízká a ze všech ostatních vypočtených TI pro tento úkol zároveň i hodnotou nejnižší. LEM 534 tedy vykazuje nízkou selektivitu při působení na nádorové a nenádorové – zdravé buňky. U látky LEM 573 byly zjištěny velmi nízké hodnoty IC₅₀ u linií odvozených od kolorektálního karcinomu, konkrétně u linie HCT116 Parental, HCT116 p53 (-/-) a HCT116 K-Ras (+/-). Zda by látka

úspěšně působila i na čtvrtou testovanou linii této série – HCT116 p53 (R248W/-) nemohlo být zjištěno, protože této látce bylo nedostatečné množství a nadále byla nedostupná. U linie HCT116 Parental byla vypočtena mírně vyšší hodnota terapeutického indexu 57,390, u linie HCT116 p53 (-/-) byla hodnota TI ještě mnohem vyšší, a to 144,061. Tuto látku lze proto řadit mezi selektivní. Celkově nejnižší hodnota IC50 a zároveň nejvyšší hodnota terapeutického indexu byla zjištěna při působení látky LEM 573 na nádorovou buněčnou linii HCT116 K-Ras (+/-). TI dosáhl hodnoty 160,432, a z tohoto důvodu byla tato látka vyhodnocena jako nejselektivněji působící látkou z těch, které byly v této bakalářské práci testovány. Tato látka by, podle mého názoru, měla být dosyntetizována a testována na dalších nádorových buněčných liniích odvozených od kolorektálního karcinomu. Díky vysoké selektivitě a schopnosti destrukce primárně nádorových buněk se současným zachováním buněk zdravých, je zde vysoká pravděpodobnost, že by látka mohla být úspěšně testovaná i později v klinických testech.

Pro fluorescenční mikroskopování na nádorové buněčné linii U2OS a zjišťování míry fluorescence testovaných látek byly zvoleny dvě rozdílné koncentrace látek. Při vyšší koncentraci, tj. 10 $\mu\text{mol/l}$, bylo pozorováno viditelně méně fluoreskujících buněk. Tento jev mohl být způsoben silnější cytotoxicitou látek na buňky a nejspíše došlo k jejich odumírání. Látka LEM 576, která vykazovala významnější fluorescenci, by proto byla úspěšná při použití jako cytostatikum či léčivo, ale záleželo by na její selektivní schopnosti rozlišovat nádorové a normální zdravé buňky. Jelikož u této látky byla výsledná hodnota terapeutického indexu 8,372, což je řazeno spíše k nižším hodnotám, lze usoudit, že LEM 576 by nebyla zrovna nejoptimálnější látkou pro klinickou aplikaci. Nižší hodnoty terapeutického indexu totiž značí neselektivní zabíjení nádorových a nenádorových buněk. Její používání by proto mohlo mít pro organismus jedince spíše destruktivní účinky. V nižší koncentraci, tj. 1 $\mu\text{mol/l}$, byl větší podíl fluoreskujících buněk, z čehož lze usuzovat schopnost vybraných látek kumulovat se v buňkách a možnou vyšší cytotoxicitu při dlouhodobém působení. Významná fluorescence byla zjištěna u látky LEM 574, ke které byl ale vypočítán nízký terapeutický index 0,405, který tímto řadí látku mezi nedoporučované z důvodu jejího zanedbatelného selektivního působení.

Testování pomocí průtokového cytometru probíhalo na nádorové buněčné linii CCRF-CEM, což je buněčná linie odvozená od akutní lymfoblastické leukémie, a zahrnovalo třináct testovaných látek – každou ve dvojí koncentraci ($1 \times \text{IC}_{50}$

a $5 \times IC_{50}$). Pro všechny látky byl vypočten terapeutický index. Do diskuze byly vybrány, dle výsledných hodnot, ty nejzajímavější z nich. Při koncentraci $1 \times IC_{50}$ byla významná pouze jediná látka – LEM 529, která nejvíce stimulovala syntézu RNA. Při koncentraci $5 \times IC_{50}$ už bylo významných látek více. Látka LEM 527 měla inhibiční účinek na buňky v G₀/G₁ fázi a zároveň akumulaci účinek na buňky v S fázi buněčného cyklu, což si navzájem neodporuje. Látka LEM 529 naopak inhibovala buňky v S fázi a akumulovala je v G₀/G₁ fázi. Byla také látkou, která nejvíce inhibovala fosforylaci histonu a zároveň měla největší cytotoxický účinek na tuto nádorovou linii CCRF-CEM. Její terapeutický index (24,487) nepatřil k nejvyšším zjištěným hodnotám, z čehož vyplývá, že tato látka není selektivní a zabíjí i nenádorové buňky. Látka LEM 530 působila silně negativně na syntézu RNA a slabě pozitivně na syntézu DNA. Látka LEM 573 nejvíce inhibovala syntézu DNA. Největší akumulaci buněk v G₂/M fázi buněčného cyklu způsobila látka LEM 575. LEM 576 naopak na buňky v G₂/M fázi působila inhibičně. Žádná ze všech testovaných látek nezpůsobila významné snížení apoptózy, ani zajímavé zvýšení fosforylace histonu. Nejvyšší hodnoty terapeutického indexu a tudíž nejlepší selektivní působení na nádorovou buněčnou linii CCRF-CEM vykazovaly látky LEM 534 s hodnotou terapeutického indexu 173,844 a LEM 526 s TI 144,049. Tyto látky se však nedostaly do užšího výběru nejzajímavějších látek při vyhodnocování měření na průtokovém cytometru, proto tato vysoká selektivita nemohla být v této diskuzi využita.

Všechny výsledky byly přehledně zpracovány. Výše zmíněné nejaktivnější látky by byly vhodné pro další testování. Mohly by se v následujících letech stát pro chemoterapii přínosem.

7 Závěr

Teoretická část této bakalářské práce se zabývala problematikou kolorektálního karcinomu, zvláště pak jeho chemoterapeutických přístupů. Další kapitoly popisovaly možnosti testování cytotoxicity a chelátory v protinádorové terapii.

Prakticky byl proveden MTT test cytotoxicity testovaných látek (chelátorů) na nádorových buněčných liniích U2OS, C6, U87MG a klonech HCT116. Pozornost byla věnována hlavně buňkám odvozených od kolorektálního karcinomu. MTT test je obecně v praxi široce používán. Dalším úkolem byla fluorescenční mikroskopie na testovaných látkách a linii U2OS. Posledním bodem byla průtoková cytometrie, konkrétně analýza buněčného cyklu, histonu, apoptózy, syntézy DNA a RNA.

V rámci experimentální části práce bylo zjištěno, že ne všechny testované látky jsou vhodné pro klinické použití. Ze získaných výsledků testování cytotoxicity vyplynulo, že celkově nejvýznamnější látkou byla LEM 573, a to při vysoce selektivním působení na nádorovou buněčnou linii odvozenou od kolorektálního karcinomu – HCT116 K-Ras (+/-). Velmi podobný efekt měla i na příbuznou linii, a to na HCT116 p53 (-/-). Při vyhodnocení fluorescenční mikroskopie, která probíhala na buněčné linii odvozené od lidského osteosarkomu – U2OS, byla jako nejzajímavější vyhodnocena látka LEM 576, která ale svým nízkým terapeutickým indexem není nejvhodnější pro další testování. Z výsledků hodnot naměřených na průtokovém cytometru bylo mimo jiné zjištěno, že největší procentuální rozdíl hodnot v porovnání s kontrolou u všech testovaných látek dosáhla látka LEM 530, která inhibovala syntézu RNA až o 58,18 %. Pomocí průtokové cytometrie lze analyzovat mechanismy působení jednotlivých testovaných látek, zvláště pak při analýze buněčného cyklu.

Nalezení takové látky, která by v nízké koncentraci usmrtila co největší počet nádorových buněk, je v zájmu celé populace, protože rakovina je globálním onemocněním s tolika variantami, na které se zatím stále nepodařilo nalézt adekvátní léčivo či cytostatikum, které by splňovalo podmínky úspěšné terapie. Vysoký stupeň selektivního působení a s tím spojená nízká míra cytotoxicity na zdravé buňky je jistě cílem mnoha buněčných biologů.

8 Literatura

Abeyasinghe, R. D., Greene, B. T., Haynes, R., Willingham, M. C., Turner, J., Planalp, R. P., Brechbiel, M. W., Torti, F. M., Torti, S. V. (2001): p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis* 22(10): 1607 – 14.

Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J. (eds.) (2010): *Speciální onkologie: Příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén. 417 s. ISBN 978-80-7262-648-9.

Adam, Z., Vorlíček, J., Vaníček, J. (eds.) (2004): *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2. aktualiz. a dopl. vyd.* Praha: Grada. 684 s. ISBN 80-247-0896-5.

Berridge, M. V., Tan, A. S. (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303(2): 474 – 82.

Blatt, J. (1994): Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. *Anticancer Research* 14(5B): 2109 – 12.

Blatt, J., Stitely, S. (1987): Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines. *Cancer Research* 47(7): 1749 – 50.

Brem, S., Grossman, S. A., Carson, K. A., New, P., Phuphanich, S., Alavi, J. B., Mikkelsen, T., Fisher, J. D. (2005): Phase 2 trial of copper depletion and penicillamine as antiangiogenesis therapy of glioblastoma. *Neuro-oncology* 7(3): 246 – 53.

Brewer, G. J., Dick, R. D., Grover, D. K., LeClaire, V., Tseng, M., Wicha, M., Pienta, K., Redman, B. G., Jahan, T., Sondak, V. K., Strawderman, M., LeCarpentier, G., Merajver, S. D. (2000): Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate,

an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clinical Cancer Research* 6(1): 1 – 10.

Buss, J. L., Greene, B. T., Turner, J., Torti, F. M., Torti, S. V. (2004): Iron chelators in cancer chemotherapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4(15): 1623 – 35.

Büchler, T. (2009): Strategie a cíle léčby nemocných s kolorektálním karcinomem. *Farmakoterapie, příloha Kolorektální karcinom* 9(5): 31 – 8.

Cox, C., Merajver, S. D., Yoo, S., Dick, R. D., Brewer, G. J., Lee, J. S., Teknos, T. N. (2003): Inhibition of the growth of squamous cell carcinoma by tetrathiomolybdate-induced copper suppression in a murine model. *JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery* 129(7): 781 – 5.

Cox, C., Teknos, T. N., Barrios, M., Brewer, G. J., Dick, R. D., Merajver, S. D. (2001): The role of copper suppression as an antiangiogenic strategy in head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope* 111: 696 – 701.

Ding, W. Q., Liu, B., Vaught, J. L., Yamauchi, H., Lind, S. E. (2005): Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Research* 65(8): 3389 – 95.

Donfrancesco, A., Deb, G., Dominici, C., Pileggi, D., Castello, M. A., Helson, L. (1990): Effects of a Single Course of Deferoxamine in Neuroblastoma Patients. *Cancer Research* 50: 4929 – 30.

Egeberg, R., Olsen, A., Christensen, J., Halkjær, J., Jakobsen, M. U., Overvad, K., Tjønneland, A. (2013): Associations between red meat and risks for colon and rectal cancer depend on the type of red meat consumed. *The Journal of Nutrition* 143(4): 464 – 72.

Espié, M., Wassermann, J., de Kermadec, E., Lalloum, M., Coussy, F. (2013): Vitamin D and cancers. *Presse Médicale* 42(10): 1405 – 11.

Feng, P., Li, T. L., Guan, Z. X., Franklin, R. B., Costello, L. C. (2002): Direct effect of zinc on mitochondrial apoptosis in prostate cells. *The Prostate* 52(4): 311 – 8.

Feng, P., Liang, J. Y., Li, T. L., Guan, Z. X., Zou, J., Franklin, R., Costello, L. C. (2000): Zinc induces mitochondria apoptogenesis in prostate cells. *Molecular Urology* 4(1): 31 – 6.

Fotakis, G., Timbrell, J. A. (2006): *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160(2): 171–7.

Gamelin, E., Delva, R., Jacob, J., Merrouche, Y., Raoul, J. L., Pezet, D., Dorval, E., Piot, G., Morel, A., Boisdron-Celle, M. (2008): Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26(13): 2099 – 105.

Gamelin, E. C., Danquechin-Dorval, E. M., Dumesnil, Y. F., Maillart, P. J., Goudier, M. J., Burtin, P. C., Delva, R. G., Lortholary, A. H., Gesta, P. H., Larra, F. G. (1996): Relationship between 5-fluorouracil (5-FU) dose intensity and therapeutic response in patients with advanced colorectal cancer receiving infusional therapy containing 5-FU. *Cancer* 77(3): 441 – 51.

Harris, E. D. (2004): A requirement for copper in angiogenesis. *Nutrition Reviews* 62(2): 60 – 4.

Ho, W. Y., Yeap, S. K., Ho, C. L., Rahim, R. A., Alitheen, N. B. (2012): Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. *PLoS ONE* 7(9): e44640. doi: 10.1371/journal.pone.0044640.

Hu, G. F. (1998): Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *Journal of Cellular Biochemistry* 69(3): 326 – 35.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F. (2004): Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 350(23): 2335 – 42.

Chao, A., Thun, M. J., Connell, C. J., McCullough, M. L., Jacobs, E. J., Flanders, W. D., Rodriguez, C., Sinha, R., Calle, E. E. (2005): Meat consumption and risk of colorectal cancer. *The Journal of the American Medical Association* 293(2): 172 – 82.

Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., Barnham, K. J., Volitakis, I., Fraser, F. W., Kim, Y., Huang, X., Goldstein, L. E., Moir, R. D., Lim, J. T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R. E., Masters, C. L., Bush, A. I. (2001): Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30(3): 665 – 76.

Jablonská, M. (ed.) (2000): *Kolorektální karcinom: Časná diagnóza a prevence*. Praha: Grada. 456 s. ISBN 80-7169-777-X.

Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J. Q., Boonplueang, R., Viswanath, V., Jacobs, R., Yang, L., Beal, M. F., DiMonte, D., Volitaskis, I., Ellerby, L., Cherny, R. A., Bush, A. I., Andersen, J. K. (2003): Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity *in vivo*: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 37(6): 899 – 909.

Khan, M. K., Mamou, F., Schipper, M. J., May, K. S., Kwitny, A., Warnat, A., Bolton, B., Nair, B. M., Kariapper, M. S., Miller, M., Brewer, G., Normolle, D., Merajver, S. D., Teknos, T. N. (2006): Combination tetrathiomolybdate and radiation therapy in a mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery* 132(3): 333 – 8.

Klener, P., Klener, P. jr. (2010): *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada. 209 s. ISBN 978-80-247-2808-7.

Le, N. T., Richardson, D. R. (2002): The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1603(1): 31 – 46.

Li, X., Niu, Y., Jia, Q., Zhang, Z., Duan, H., Wang, X., Zheng, Y. (2013): Comparison of four cytotoxicity assays for determining the acute toxicity of diesel exhaust particulate extracts. *Journal of Hygiene Research* 42(2): 221–7.

Lovejoy, D. B., Richardson, D. R. (2003): Iron chelators as anti-neoplastic agents: current developments and promise of the PIH class of chelators. *Current Medicinal Chemistry* 10(12): 1035 – 49.

Martinez-Cardús, A., Martinez-Balibrea, E., Bandrés, E., Malumbres, R., Ginés, A., Manzano, J. L., Taron, M., Garcia-Foncillas, J., Abad, A. (2009): Pharmacogenomic approach for the identification of novel determinants of acquired resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 8(1): 194 – 202.

Martínková, J., Hroch, M., Grim, J. (2011): Poznámky k inovacím v cytostatické terapii 5-fluorouracilem. *Klinická farmakologie a farmacie* 25(2): 87 – 91.

McCullough, M. L., Gapstur, S. M., Shah, R., Jacobs, E. J., Campbell, P. T. (2013): Association between red and processed meat intake and mortality among colorectal cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology* 31(22): 2773 – 82.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2): 55–63.

Novotný, J., Vitek, P. (eds.) (2012): *Onkologie v klinické praxi: Standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů*. Praha: Mladá fronta. 531 s. ISBN 978-80-204-2663-5.

Olivieri, N. F., Brittenham, G. M. (1997): Iron-Chelating Therapy and the Treatment of Thalassemia. *Blood* 89(3): 739 – 61.

Pan, Q., Bao, L. W., Kleer, C. G., Brewer, G. J., Merajver, S. D. (2003): Antiangiogenic tetrathiomolybdate enhances the efficacy of doxorubicin against breast carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* 2(7): 617 – 22.

Pan, Q., Kleer, C. G., van Golen, K. L., Irani, J., Bottema, K. M., Bias, C., De Carvalho, M., Mesri, E. A., Robins, D. M., Dick, R. D., Brewer, G. J., Merajver, S. D. (2002): Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Research* 62(17): 4854 – 9.

Polat, B. E., Lin, S., Mendenhall, J. D., VanVeller, B., Langer, R., Blankschtein, D. (2011): An Experimental and Molecular Dynamics Investigation into the Amphiphilic Nature of Sulforhodamine B. *The Journal of Physical Chemistry. B.* 115(6): 1394–1402.

Redman, B. G., Esper, P., Pan, Q., Dunn, R. L., Hussain, H. K., Chenevert, T., Brewer, G. J., Merajver, S. D. (2003): Phase II trial of tetrathiomolybdate in patients with advanced kidney cancer. *Clinical Cancer Research* 9(5): 1666 – 72.

Richardson, D. R., Milnes, K. (1997): The Potential of Iron Chelators of the Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone Class as Effective Antiproliferative Agents II: The Mechanism of Action of Ligands Derived From Salicylaldehyde Benzoyl Hydrazone and 2-Hydroxy-1-Naphthylaldehyde Benzoyl Hydrazone. *Blood* 89(8): 3025 – 38.

Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48(17): 4827–33.

Selig, R. A., White, L., Gramacho, C., Sterling-Levis, K., Fraser, I. W., Naidoo, D. (1998): Failure of Iron Chelators to Reduce Tumor Growth in Human Neuroblastoma Xenografts. *Cancer Research* 58: 473 – 8.

Shafiee, F., Sadeghi-Aliabadi, H., Hassanzadeh, F. (2012): Evaluation of cytotoxic effects of several novel tetralin derivatives against Hela, MDA-MB-468, and MCF-7 cancer cells. *Advanced Biomedical Research* 1:76. doi: 10.4103/2277-9175.102983.

Shen, L., Zhao, H. Y., Du, J., Wang, F. (2005): Anti-tumor activities of four chelating agents against human neuroblastoma cells. *In Vivo* 19(1): 233 – 6.

Shin, H. J., Cho, M. S., Jung, S. Y., Kim, H. I., Im, K. I. (2000): *In vitro* cytotoxicity of *Acanthamoeba* spp. isolated from contact lens containers in Korea by crystal violet staining and LDH release assay. *The Korean Journal of Parasitology* 38(2): 99–102.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82(13): 1107–12.

Sumantran, V. N. (2011): Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods in Molecular Biology* 731: 219 – 36.

Torti, S. V., Torti, F. M., Whitman, S. P., Brechbiel, M. W., Park, G., Planalp, R. P. (1998): Tumor cell cytotoxicity of a novel metal chelator. *Blood* 92(4): 1384 – 9.

Turner, J., Koumenis, C., Kute, T. E., Planalp, R. P., Brechbiel, M. W., Beardsley, D., Cody, B., Brown, K. D., Torti, F. M., Torti, S. V. (2005): Tachpyridine, a metal chelator, induces G2 cell-cycle arrest, activates checkpoint kinases, and sensitizes cells to ionizing radiation. *Blood* 106(9): 3191 – 9.

Vichai, V., Kirtikara, K. (2006): Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1(3): 1112 – 6.

Wang, C., Tian, L. L., Li, S., Li, H. B., Zhou, Y., Wang, H., Yang, Q. Z., Ma, L. J., Shang, D. J. (2013): Rapid cytotoxicity of antimicrobial peptide temporin-1CEa in breast cancer cells through membrane destruction and intracellular calcium mechanism. *PLoS ONE* 8(4): e60462. doi: 10.1371/journal.pone.0060462.

Whitnall, M., Howard, J., Ponka, P., Richardson, D. R. (2006): A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(40): 14901 – 6.

Wisniewska-Jarosinska, M., Sliwinski, T., Kasznicki, J., Kaczmarczyk, D., Krupa, R., Bloch, K., Drzewoski, J., Chojnacki, J., Blasiak, J., Morawiec-Sztandera, A. (2011): Cytotoxicity and genotoxicity of capecitabine in head and neck cancer and normal cells. *Molecular Biology Reports* 38(6): 3679 – 88.

Xiao, Y., Li, J. D., Shi, H. L., Liu, J. H., Feng, Y. L., Li, M. D. (2007): Predictive value of *in vitro* MTT assay chemosensitivity test of cytotoxic drug activity in cervical cancer. *Chinese Journal of Cancer* 26(4): 386–9.

Yee, K. W., Cortes, J., Ferrajoli, A., Garcia-Manero, G., Verstovsek, S., Wierda, W., Thomas, D., Faderl, S., King, I., O'Brien, S. M., Jeha, S., Andreeff, M., Cahill, A., Sznol, M., Giles, F. J. (2006): Triapine and cytarabine is an active combination in patients with acute leukemia or myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research* 30(7): 813 – 22.

Yen, Y., Margolin, K., Doroshow, J., Fishman, M., Johnson, B., Clairmont, C., Sullivan, D., Sznol, M. (2004): A phase I trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone in combination with gemcitabine for patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 54(4): 331 – 42.

Yoshii, J., Yoshiji, H., Kuriyama, S., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Okuda, H., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Kishida, H., Nakae, D., Gomez, D. E., De Lorenzo, M. S., Tejera, A. M., Fukui, H. (2001): The copper-chelating agent, trientine, suppresses tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Cancer* 94(6): 768 – 73.

Yoshiji, H., Yoshii, J., Kuriyama, S., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Yanase, K., Namisaki, T., Kitade, M., Yamazaki, M., Fukui, H. (2005): Combination of copper-chelating agent, trientine, and methotrexate attenuates colorectal carcinoma development and angiogenesis in mice. *Oncology Reports* 14(1): 213 – 8.

Yu, Y., Wong, J., Lovejoy, D. B., Kalinowski, D. S., Richardson, D. R. (2006): Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clinical Cancer Research* 12(23): 6876 – 83.

Yuan, J., Lovejoy, D. B., Richardson, D. R. (2004): Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: *in vitro* and *in vivo* assessment. *Blood* 104(5): 1450 – 8.

9 Přílohy

9.1 Seznam použitých zkratk

BrdU	5-brom-2'-deoxyuridin
BrU	5-bromuridin
BSA	hovězí sérový albumin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FCSI	fetální sérum
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NP-40	Nonidet™ P 40 Substitute, detergent
PBS	fosfátový pufr
PNC	penicilin, antibiotikum
PI	propidium jodid
PYNA	pyruvát sodný
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza A	ribonukleáza A
SDS	dodecylsírán sodný
STM	streptomycin, antibiotikum
TK H ₂ O	sterilní voda pro účely laboratoře tkáňových kultur