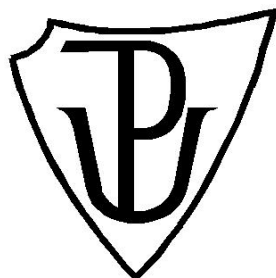


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



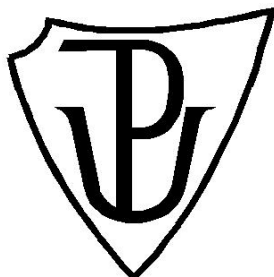
**VLIV PŘÍRODNÍCH LÁTEK Z OSTROPESTRČE
MARIÁNSKÉHO A JEJICH SEMI-SYNTETICKÝCH
DERIVÁTŮ NA ANGIOGENEZI A APOPTOSU**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2019

Daniel Karas

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Daniel Karas

**VLIV PŘÍRODNÍCH LÁTEK Z OSTROPESTRČE
MARIÁNSKÉHO A JEJICH SEMI-SYNTETICKÝCH
DERIVÁTŮ NA ANGIOGENEZI A APOPTOSU**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.

Studijní program: P5186 – Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční a kombinované formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2012 – duben 2019.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Daniel Karas

Děkuji své školitelce a přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. za možnost pracovat pod jejím vedením a za zkušenosti předávané po celou dobu doktorského studia. Mgr. Veronice Tomšíčkové, Ph.D. velice děkuji za spolupráci při experimentech a na publikacích. Za cenné rady a především pomoc při sepisování publikací bych rád poděkal doc. Ing. Kateřině Valentové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR a prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. ze stejného pracoviště za poskytnutí studovaných látek. V neposlední řadě děkuji prof. MUDr. Ivaně Oborné, Ph.D. z Porodnicko-gynekologické kliniky FN Olomouc za poskytnutí pupečnicků pro izolaci endotelových buněk a za samotnou izolaci endotelových buněk děkuji Sylvě Snášelové. Také děkuji PharmDr. Nikole Karasové za formální úpravy této práce.

Dr. C. D. Mullerovi z Univerzity ve Štrasburku děkuji za umožnění realizace pracovní stáže, během které byla získána část výsledků uvedených v této práci.

Děkuji všem kolegům z Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za pomoc při řešení odborných problémů a zprostředkování ideálních pracovních podmínek. Také děkuji finanční podpoře z grantů IGA_LF_2016_012, LO1304 and GAČR P301/11/0767, bez kterých by nebylo možné tuto práci vytvořit.

Souhrn

Dysregulace angiogeneze a apoptosy může být spojena s rozvojem nádorového onemocnění. K léčbě nádorů jsou využívána chemoterapeutika, která jsou však limitována řadou vedlejších účinků. Silnými protinádorovými účinky se však vyznačuje mnoho přírodních látek a proto je v dnešní době testováno velké množství těchto látek pro jejich schopnost potlačit růst a metastázování tumorů. Předložená disertační práce se zabývá působením flavonolignanů 2,3-dehydrosilybinu (DHS), minoritní složky extraktu plodu ostropestřce mariánského */Silybum marianum/* (silymarinu) a jeho semi-syntetických derivátů na důležité biologické děje, kterými angiogeneze a apoptosa jsou.

První část disertační práce je zaměřena na *in vitro* testování cytotoxicity a schopnosti potlačovat buněčnou proliferaci a migraci pomocí 2,3-dehydrosilybinu a jeho čtyř semi-synteticky připravených galloyl esterů (3-, 7-, 20- a 23-*O*-galloyl-2,3-dehydrosilybinu (3-, 7-, 20- a 23-*G-D*)). Jako *in vitro* model byly využity primární endotelové buňky lidské pupečnickové žíly (HUVEC). Bylo zjištěno, že největší schopnost potlačit proliferaci a migraci HUVEC měl 7-*G-D*, který zároveň vykazoval nejvyšší cytotoxicitu.

Další část disertační práce je věnována hodnocení vlivu výše zmíněných látek na angiogenezi. Na buněčné linii lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk HMEC-1 byly studovány buněčná proliferace, diferenciace, průběh buněčného cyklu a fosforylace proteinů Akt a ERK1/2. Naše výsledky ukázaly, že ze všech testovaných látek jevil nejlepší antiangiogenní aktivitu 20-*G-D*. Navíc bylo prokázáno, že 20-*G-D* inhibuje angiogenezi přes dráhu PI3K/Akt.

Poslední část disertační práce byla zaměřena na schopnost látek (DHS, 3-, 7-, 20- a 23-*G-D*) vyvolat apoptosu rakovinných buněčných linií. Jako *in vitro* model byly vybrány linie lidského maligního pluripotentního embryonálního karcinomu NTERA-2 a linie lidské akutní monocytické leukémie THP-1. Z důvodu zjištění, zda látky specificky cílí pouze na rakovinné buňky a neovlivňují buňky zdravé, byla také použita linie normálních lidských fibroblastů BJ. Kromě DHS a jeho galloylderivátů byla schopnost vyvolat apoptosu sledována také u flavonolignanů silybinu (SB), čistých stereoisomerů SB a DHS a také u kyseliny gallové (GA), výchozí molekuly pro derivatizaci DHS. Bylo zjištěno, že téměř všechny látky byly schopny vyvolat apoptosu vybraných rakovinných linií. Apoptosu u zdravých buněk vyvolala pouze kyselina gallová.

SOUHRN

Klíčová slova: angiogeneze, apoptosa, *in vitro* testování, flavonolignany, semi-syntetické galloylderiváty

SUMMARY

Summary

Dysregulation of angiogenesis and apoptosis can be connected with tumor disease development. Chemotherapeutics are used for cancer treatment, but they are limited by number of side effects. Many natural substances are characterized by antitumor properties and therefore, a large number of natural substances are being tested nowadays for their ability to suppress tumor growth and metastasis. This dissertation is concerned with functioning of flavonolignan 2,3-dehydrosilybin (DHS), a minor component of a *Silybum marianum* extract (silymarin) and its semi-synthetic derivatives on significant biological processes, where angiogenesis and apoptosis belong.

The first part of this work is focused on *in vitro* testing of cytotoxicity and the ability to suppress cell proliferation and migration of 2,3-dehydrosilybin (DHS) and its four semi-synthetically prepared galloyl esters (3-, 7-, 20- and 23-*O*-galloyl-2,3-dehydrosilybin (3-, 7-, 20- and 23-G-D)). Primary endothelial cells from human umbilical vein (HUVEC) as an *in vitro* model were used. It was found that 7-G-D possess the highest ability to suppress proliferation and migration of HUVECs. 7-G-D was the most cytotoxic compound at the same time.

The next part of this dissertation is dedicated to evaluation of an effect of above-mentioned compounds on angiogenesis. Cell proliferation, differentiation, cell cycle progression and phosphorylation of Akt and ERK1/2 proteins on human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) were studied. Our results showed that from all of compounds tested, 20-G-D displayed the greatest antiangiogenic activity. In addition, it was revealed that 20-G-D inhibits angiogenesis through PI3K/Akt pathway.

The last part of the work is focused on the ability of compounds (DHS, 3-, 7-, 20- and 23-G-DHS) to induce apoptosis of cancer cell lines. Human malignant pluripotent embryonal carcinoma cell line NTERA-2 and human acute monocytic leukemia cell line THP-1 as an *in vitro* model were chosen. Normal human fibroblasts cell line BJ was used by reason of finding, if the compounds specifically target only cancer cells and do not affect healthy cells. Next to DHS and its galloylderivatives the ability to cause apoptosis also in the case of flavonolignan silybin (SB), pure stereoisomers of SB and DHS and also gallic acid (GA), starting compound for DHS derivatization, was observed. It was found that almost all compounds were able to cause apoptosis of chosen cancer cell lines. Apoptosis of healthy cells was evoked only by gallic acid.

SUMMARY

Keywords: angiogenesis, apoptosis, *in vitro* testing, flavonolignans, semi-synthetic galloyl derivatives

OBSAH

1	Úvod	1
2	Přehled současného stavu problematiky	5
2.1	Angiogeneze	5
2.1.1	Mechanismus angiogeneze.....	5
2.1.2	Fyziologická vs. nádorová angiogeneze.....	7
2.1.3	Angiogenní faktory	7
2.1.3.1	Přehled proangiogenních faktorů	7
2.1.3.1.1	Rodina cytokinů VEGF.....	9
2.1.3.1.1.1	VEGF jako terapeutický cíl.....	9
2.1.3.1.1.2	Placentární růstový faktor (PLGF).....	10
2.1.3.1.1.3	Cílení dráhy VEGF/VEGFR	10
2.1.3.1.2	Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF).....	11
2.1.3.1.2.1	Terapeutické možnosti proti FGFR.....	12
2.1.3.1.3	Destičkový růstový faktor (PDGF).....	13
2.1.3.1.4	Hepatocytární růstový faktor/„scatter“ faktor (HGF/SF)	17
2.1.3.1.5	Angiopoetiny.....	17
2.1.3.2	Příklady antiangiogenních látek.....	18
2.1.3.2.1	Bevacizumab.....	18
2.1.3.2.2	Sunitinib.....	19
2.1.3.2.3	Sorafenib	19
2.1.3.2.4	Pazopanib.....	20
2.1.3.2.5	Shrnutí k antiangiogenním činidlům.....	21
2.1.4	Angiogenní inhibitory	21
2.1.4.1	Angiostatin.....	21
2.1.4.2	Endostatin	24
2.1.4.3	Thrombospondin-1	26
2.1.4.4	Vasostatin.....	26
2.1.4.5	S destičkami přidružený destičkový faktor-4	26
2.1.4.6	Osteopontin	27

OBSAH

2.1.4.6.1	Struktura osteopontinu	28
2.1.4.7	Tkáňové inhibitory metaloproteinás	28
2.1.5	Signální dráhy PI3K/Akt a ERK	30
2.1.6	Blokace angiogeneze	30
2.1.7	Biologický základ terapeutické angiogeneze	31
2.1.7.1	Angiogeneze: růst krevních cév řízený hypoxií	31
2.1.8	Metody a modely pro studium angiogeneze	32
2.1.8.1.1	Buněčné modely pro <i>in vitro</i> studie	34
2.1.8.1.2	<i>In vivo</i> modely angiogeneze	38
2.1.8.1.3	Metody hodnocení <i>In ovo</i>	42
2.1.8.1.4	Shrnutí k angiogenním metodám a modelům	42
2.2	Apoptosa	43
2.2.1	Dráhy vedoucí k apoptose	44
2.2.2	Resistence nádorových buněk vůči apoptose	45
2.3	Buněčný cyklus	45
2.4	Detekce apoptosy a buněčného cyklu	46
2.4.1.1	Metoda Riccardiho a Nicolettiho	47
2.5	Přírodní látky	47
2.5.1	Polyfenoly	47
2.5.1.1	Vznik, struktura a klasifikace polyfenolických látek	47
2.5.1.2	Výskyt polyfenolů	48
2.5.1.3	Biologické vlastnosti polyfenolů	49
2.5.1.4	Flavonoidy	50
2.5.1.4.1	Struktura a třídění flavonoidů	50
2.5.1.4.2	Biologické vlastnosti flavonoidů	50
2.5.1.5	Lignany	50
2.5.1.5.1	Struktura a třídění lignanů	50
2.5.1.6	Flavonolignany	51
2.5.1.6.1	Rysy, klasifikace a objasnění struktury flavonolignanů	51
2.5.1.6.2	Ostropestřec mariánský a jeho složky	51
2.5.1.6.2.1	Biologická aktivita flavonolignanů ostropestřce mariánského	52

OBSAH

2.5.1.6.2.1.1	Silymarin a silybin.....	52
2.5.1.6.2.1.1.1	Vliv silymarinu a silybinu na apoptosu	55
2.5.1.6.2.1.1.2	Vliv silymarinu a silybinu na buněčný cyklus.....	55
2.5.1.6.2.1.2	2,3-Dehydrosilybin	56
2.5.1.6.2.1.3	Analoga silybinu a 2,3-dehydrosilybinu.....	56
2.5.1.7	Polyfenoly a jejich galloylderiváty	57
2.5.1.7.1	Výskyt a biologické vlastnosti galloylovaných polyfenolů.....	57
2.5.1.7.2	Kyselina gallová a galloylace	58
2.5.1.7.2.1	Kyselina gallová.....	58
2.5.1.7.2.1.1	Deriváty kyseliny gallové a galloylace.....	58
2.5.1.7.3	Galloyl estery nacházející se v přírodě	59
2.5.1.7.3.1	Katechiny, theaflaviny a procyanidiny.....	59
2.5.1.7.3.2	PGG a gallotanniny	61
2.5.1.7.3.3	Ellagitanniny a kyselina ellagová.....	64
2.5.1.7.3.4	Flavonoly.....	65
2.5.1.7.4	Semi-syntetické galloyl estery polyfenolů.....	66
2.5.1.7.5	Průmyslové a další použití derivátů látek s kyselinou gallovou	69
2.5.1.7.6	Vliv galloylace na biologické vlastnosti polyfenolů.....	70
2.5.1.7.7	Vliv galloylace na angiogenezi	70
2.5.1.7.8	Toxicita/bezpečnost přírodních a semi-syntetických gallátů.....	70
3	Cíle disertační práce	74
4	Experimentální část	76
4.1	Materiál a chemikálie	76
4.1.1	Biologický materiál	76
4.1.1.1	Lidský biologický materiál pro izolaci HUVEC	76
4.1.1.2	Buněčný materiál	76
4.1.1.2.1	Buněčná kultura HMEC.....	76
4.1.1.2.2	Buněčné kultury NTERA-2 a BJ	77
4.1.1.2.3	Buněčná kultura THP-1	77
4.1.2	Chemikálie	77
4.1.2.1	Studované látky.....	77
4.1.2.2	Ostatní chemikálie	77

OBSAH

4.1.3	Roztoky	78
4.1.3.1	Fosfátový isotonický pufr	78
4.1.3.2	Roztoky pro izolaci endotelových buněk (HUVEC) a jejich kultivaci.....	79
4.1.3.3	Roztoky pro stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové....	79
4.1.3.4	Roztoky používané při SDS-PAGE a Westernově přenosu	79
4.1.4	Přístroje	80
4.1.5	Ostatní použitý materiál	81
4.2	<i>In vitro</i> sledování vlivu 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na endotelové buňky za použití buněčné linie HUVEC	81
4.2.1	Hodnocení cytotoxicity a buněčného růstu (MTT test)	81
4.2.2	Hodnocení buněčné migrace („Wound scratch assay“)	82
4.2.3	Statistika	82
4.3	<i>In vitro</i> studium vlivu 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na angiogenezi za použití buněčné linie endotelových buněk HMEC-1	83
4.3.1	Hodnocení buněčné proliferace.....	83
4.3.2	Diferenční test (test tvorby trubic).....	83
4.3.3	Analýza buněčného cyklu a apoptosy pomocí průtokové cytometrie.....	84
4.3.4	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza a imunoblotování	84
4.3.5	Statistika	85
4.4	Vliv DHS a jeho galloyl derivátů na apoptosu a buněčný cyklus u vybraných lidských nádorových linií.....	86
4.4.1	Sledování apoptosy buněčných linií THP-1, NTERA-2 a BJ	86
4.4.1.1	Stanovení časové závislosti apoptosy po působení látek na buněčné linie.	86
4.4.1.2	Stanovení apoptosy po působení látek na buněčné linie v různých časových intervalech	86
4.4.2	Měření buněčného cyklu u THP-1 buněk	86
4.4.3	Statistika	87

5	Výsledky	88
5.1	<i>In vitro</i> studium vlivu 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na endotelové buňky HUVEC	88
5.1.1	Hodnocení cytotoxicity (MTT test).....	88
5.1.2	Hodnocení buněčného růstu (MTT test)	89
5.1.3	Hodnocení buněčné migrace („Wound scratch assay“)	89
5.2	<i>In vitro</i> studium vlivu 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na endotelové buňky HMEC-1	91
5.2.1	Hodnocení buněčné proliferace.....	91
5.2.2	Diferenciace buněk (test tvorby trubic).....	93
5.2.3	Analýza buněčného cyklu a apoptosy pomocí průtokové cytometrie.....	94
5.2.4	Vliv 20-G-D na fosforylaci Akt a ERK1/2	96
5.3	Vliv 2,3-dehydrosilybinu jeho galloylderivátů na apoptosu a buněčný cyklus vybraných nádorových linií	99
5.3.1	Sledování apoptosy buněk po 24 hodinovém působení látek	99
5.3.2	Stanovení časové závislosti apoptosy buněčných linií po působení látek.	100
5.3.3	Měření buněčného cyklu THP-1 buněk	102
6	Diskuze	103
6.1	Vliv látek na endotelové buňky HUVEC	103
6.2	Antiangiogenní vlastnosti látek na buňkách HMEC-1	104
6.3	Vliv látek na vyvolání apoptosy a distribuci fází buněčného cyklu u nádorových linií	106
7	Závěr	109
7.1	Vliv látek na endotelové buňky HUVEC	109
7.2	Hodnocení antiangiogenních vlastností látek na HMEC-1	109
7.3	Vliv látek na apoptosu u rakovinných buněčných linií	109
8	Seznam prací	111
8.1	Seznam prací vztahujících se k disertaci	111

OBSAH

8.1.1	Publikace	111
8.1.2	Abstrakta ke konferencím	111
8.2	Ostatní práce	112
8.2.1	Publikace	112
8.2.2	Abstrakta ke konferencím	112
9	Reference	113

Seznam zkratek

20-G-D	20- <i>O</i> -galloyl-2,3-dehydrosilybin
22Rv1	lidské epitelové buňky karcinomu prostaty
23-G-D	23- <i>O</i> -galloyl-2,3-dehydrosilybin
3-G-D	3- <i>O</i> -galloyl-2,3-dehydrosilybin
786-O	lidské buňky ledvinného adenokarcinomu
7-G-D	7- <i>O</i> -galloyl-2,3-dehydrosilybin
A375-S2	buňky lidského maligního melanomu
ADAM	disintegrin a metaloproteinasa („a disintegrin and metalloprotease“)
ACHN	lidské buňky ledvinného adenokarcinomu (metastatické)
Akt	proteinkinasa B
ALD	alkoholické onemocnění jater
ANG(s)	angiopoetin(y)
APAF1	„apoptotic protease activating factor 1“
APS	persulfát amonný
AREs	„antioxidant response elements“
AsPC-1	lidské buňky pankreatického adenokarcinomu (metastatické)
BAE buňky	bovinní arteriální endotelové buňky
BAKk	„Bcl-2 homologous antagonist/killer“
BAX	„Bcl-2-like protein 4“
Bcl-2	protein B-buněk lymfomu 2 („B-cell lymphoma-2 protein“)
Bcl-xL	„B-cell lymphoma-extra large“
BCR-ABL	fúzní gen Filadelfského chromozomu, sloužící jako molekulární marker pro chronickou myeloidní leukémii (CML)
bFGFR	receptor pro bazický fibroblastový růstový faktor
BID	„BH3-interacting domain death agonist“
BJ	buněčná linie lidských fibroblastů
BSA	bovinní sérový albumin
CAM	chorioallantoová membrána

SEZNAM ZKRATEK

CD36	„cluster of differentiation 36“
CDKs	cyklin-dependentní kinasy
cDNA	komplementární DNA
cFLIP	„cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein“
cIAP1/2	„baculoviral IAP repeat-containing protein 2“
c-KIT (CD117)	receptor pro „stem cell factor (SCF)“ charakteru tyrosinkinasy
c-Met	tyrosin-protein kinasa Met
COX	cyklooxygenasa
CSF-1R	receptor pro kolonii stimulující faktor 1 („colony stimulating factor receptor Type 1“)
CWR22R	androgen-nezávislý xenograftový model rakoviny prostaty
CXCL1/Gro α	růstem regulovaný alfa protein
CXCL4	chemokinový ligand 4
CXCL6/GCP2	granulocytární chemotaktický protein 2
CXCR3B	chemokinový receptor (jedna z isoform)
Da (kDa)	dalton (kilodalton)
DB1	„procyanidin dimer B1“
DB2	„procyanidin dimer B2“
DGB1	[3- <i>O</i> -galloyl]-(-)-epicatechin-(4 β ,8)-(+)-catechin-3- <i>O</i> -gallát
DGB2	[3- <i>O</i> -galloyl]-(-)-epicatechin-(4 β ,8)-(+)-epicatechin-3- <i>O</i> -gallát
DGR	digalloylresveratrol
Del-1	vývojově-regulovaný protein lokusu 1 endotelových buněk
DHS	2,3-dehydrosilybin
DISC	„death-inducing signaling complex“
DII4	„delta-like protein 4 precursor“
DMEM	eagleovo médium modifikované Dulbeccoem
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTT	dithiotreitol

SEZNAM ZKRATEK

DU145	lidské buňky karcinomu prostaty (metastatické)
EA.hy926	lidské hybridní somatické endotelové buňky
EACA	epsilon-amino kaproová kyselina („epsilon-amino caproic acid“)
EB	endotelové buňky
EBS	earleův solný roztok
EC	epikatechin
EC ₅₀	poloviční maximální účinná koncentrace
ECG	epikatechin gallát
ECGS/H	„endothelial cell growth supplement/heparin“
ECM	Extracelulární matrix
ED ₅₀	poloviční efektivní dávka
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGC	epigallokatechin
EGCG	epigallokatechin gallát
EGM	růstové médium pro endotelové buňky
EMA	Evropská léková agentura
ERK1/2	„extracellular signal-regulated kinase 1/2“
FADD	„fas-associated protein with death domain“
FAK	fokální adhezivní kinasa
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	„U.S. Food and Drug administration“
FGF	fibroblastový růstový faktor
FITC	fluorescein isothiokyanát
FLT-3	„fms-like tyrosine kinase 3“
GA	kyselina gallová
GAG	glykosaminoglykan
GISTs	gastrointestinální stromální tumory
GM-CSF	granulocytární-makrofágový kolonii stimulační faktor
GQAs	galloylchinové kyseliny

SEZNAM ZKRATEK

GSH	glutathion
HaCaT	imortalizované lidské keratinocyty
HGF/SF	hepatocytární růstový faktor/„scatter factor“
HG-PIN	prostatická intraepiteliální neoplazie ve vysokém stádiu
HHDP	hexahydroxydifenylová kyselina
HIF-1 α	hypoxií indukibilní faktor 1 α
HL-60	lidské buňky akutní promyelocytické leukémie
HMEC-1	lidské kožní mikrovaskulární endotelové buňky
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
HRP	křenová peroxidasa
HSPs	„heat shock proteins“
HT-29	lidské buňky kolorektální adenokarcinomu
HuH7	buněčná linie lidského hepatokarcinomu
HUVEC	lidské endotelové buňky z pupečnickové žíly
CHO buňky	buňky vaječníků čínského křečka („finese hamster ovary cell“)
IC ₅₀	50% inhibiční koncentrace
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
IL	interleukiny
JNK	„c-Jun N-terminal kinase“
K562	lidské lymfoblastové buňky chronické myelogenní leukémie
KDR	gen kódující „kinase insert domain receptor“
Keap1	„kelch-like ECH-associated protein 1“
KIT	receptor pro „stem cell factor“
KRAS	„v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“
L6 buňky	kryší skeletální myoblasty
LBSs	lysin-vázající místa („lysin-binding sites“)
LNCaP	lidské buňky karcinomu prostaty (metastatické)
LRP-1	„low density lipoprotein receptor-related protein 1“
LY-R	buňky myššího chemicky indukovaného lymfomu brzlíku

SEZNAM ZKRATEK

mAB	monoklonální protilátka
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
Mek	mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa („mitogen-activated protein kinase kinase“)
MEM	minimální esenciální médium
MMP	matrixová metaloproteinasa
MOMP	permeabilita vnější mitochondriální membrány
MT-MMP	membránový typ matrixových metaloproteinás
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid
MVD	mikrovaskulární denzita
NCI	„National Cancer Institute“
NF- κ B	jaderný faktor kappa B
NK, PK	negativní a pozitivní kontrola
NMR	nukleární magnetická rezonance
Notch1	„notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)“
Nrf2	„Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2“
NRP	neuropilin
NTERA-2	buňky lidského maligního pluripotentního embryonálního karcinomu varlat (metastatické)
OPN	osteopontin
OVCAR3	model ovariálního tumoru
P-388	buňky myššího lymfomu
PAM	„plasminogen-binding group-A streptococcal M-like protein“
PARP	„poly (ADP-ribose) polymerase“
PBS	fosfátový pufr pH 7,4
PC3	lidské buňky adenokarcinomu prostaty (metastatické)
PDGF	destičkový růstový faktor
PDGFR	receptor pro destičkový růstový faktor
PDZ	proteinové doména známé také jako „Discs-large homologous regions (DHR) or GLGF“
PF4	destičkový faktor 4 („platelet factor 4“)

SEZNAM ZKRATEK

PI	propidium jodid
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PLGF	placentární růstový faktor
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PPAR- γ	perixosomový proliferaci aktivovaný receptor γ
PRPs	slinné proteiny bohaté na prolin
PTP	proteinová tyrosin fosfatasa
PVDF	polyvinylidenfluorid
Raf	proteinová kinasa Raf
RAW264.7	kultura myších makrofágů (makrofágy z Abelsonova myššího leukemického virem-indukované tumoru)
RCC	renální buněčný karcinom („renal cell carcinoma“)
RET	„rearranged during transfection,“ či také „glial cell-line derived neurotrophic factor receptor“
RIP	„receptor-interacting protein“
RIPA pufr	pufr pro radioimunoprecipitaci
RNA	ribonukleová kyselina
ROS a RNS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute Medium“
RT	laboratorní teplota
SB	silybin
SCID	„severe combined immunodeficiency“
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SE	směrodatná chyba
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor
SHP-1	nereceptorová protein tyrosin fosfatasa (“non-receptor protein tyrosinprospatase”)
SW620	lidské buňky kolorektálního adenokarcinomu (metastatické)
T	theaflavin

SEZNAM ZKRATEK

T24	buňky lidského přechodného karcinomu močového měchýře
T3G	theaflavin-3-gallít
T3'G	theaflavin-3'-gallát
tBID	„truncated BID“
TBS	„tris buffered saline“
TBS/T	TBS obohacený o tween 20
TCC-SUP	buňky lidského přechodného karcinomu močového měchýře
TDG	theaflavin-3,3'-digallát
TGF	transformující růstový faktor
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGQA	3,4,5-tri- <i>O</i> -galloylchinová kyselina
THP-1	buňky lidské akutní monocytické leukémie
Tie-2 receptor	„tunica intima endothelial kinase 2 receptor“
TIME	telomerasou immortalizované lidské mikrovaskulární endotelové buňky
TIMP	tkáňové inhibitory metaloproteinas
TKIs	inhibitory tyrosinkinas
TNFR1	TNF receptor 1
TNF α	faktor nádorové nekrózy α
TP53	tumorový protein p53
TRADD	„tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein“
TRAF	„TNF receptor associated factor“
TRAIL	„TNF-related apoptosis-inducing ligand“
TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRX	thioredoxin
TSP-1	trombospondin-1
TSR	„trombospondin repeat“
ULMS	děložní leiomyosarkomy
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor

SEZNAM ZKRATEK

VMCs	buňky hladského svalstva cév
Xiap	„x-linked inhibitor of apoptosis protein“

1 Úvod

Naše smýšlení o výživě v oblasti biochemie a molekulární biologie spolu s epidemiologickými daty se změnilo. Je stále jasnější, že potrava hraje stěžejní roli v udržování našeho zdraví a nevyvážená strava může způsobit vážné zdravotní problémy. Zdá se být pravděpodobné, že mezi hlavní regulátory mnoha fyziologických procesů patří antioxidanty. Proto je redoxní rovnováha mezi antioxidanty a prooxidanty ve stravě, gastro-intestinálním traktu, plazmě a tkáních důležitým činitelem pro stav našeho zdraví. Rostliny konzumované lidmi a zvířaty obsahují tisíce fenolických sloučenin. V popředí zájmu vědců jsou nyní účinky dietních polyfenolů, mezi něž řadíme silymarin. Různé fytochemikálie, včetně flavonoidů jsou skutečně esenciální součástí naší stravy a jsou zodpovědné za aktivaci a udržování optimálního stavu naší antioxidační obrany. Jelikož absorpce flavonoidů trávicím traktem není velká, jejich aktivní koncentrace v plazmě a cílových orgánech jsou poměrně nízké. Jsou však pravděpodobně dostatečné pro aktivaci Nrf2 („nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2“) a potlačení jaderného faktoru κ B (NF- κ B), stejně jako aktivaci tzv. vitagenů (termín poprvé použit v roce 1998 Rattanem [1]), které jsou zodpovědné za syntézu ochranných molekul, jako jsou heat shock proteins (HSPs), thioredoxin a sirtuiny a poskytují tak přídavnou ochranu za stresových podmínek [2].

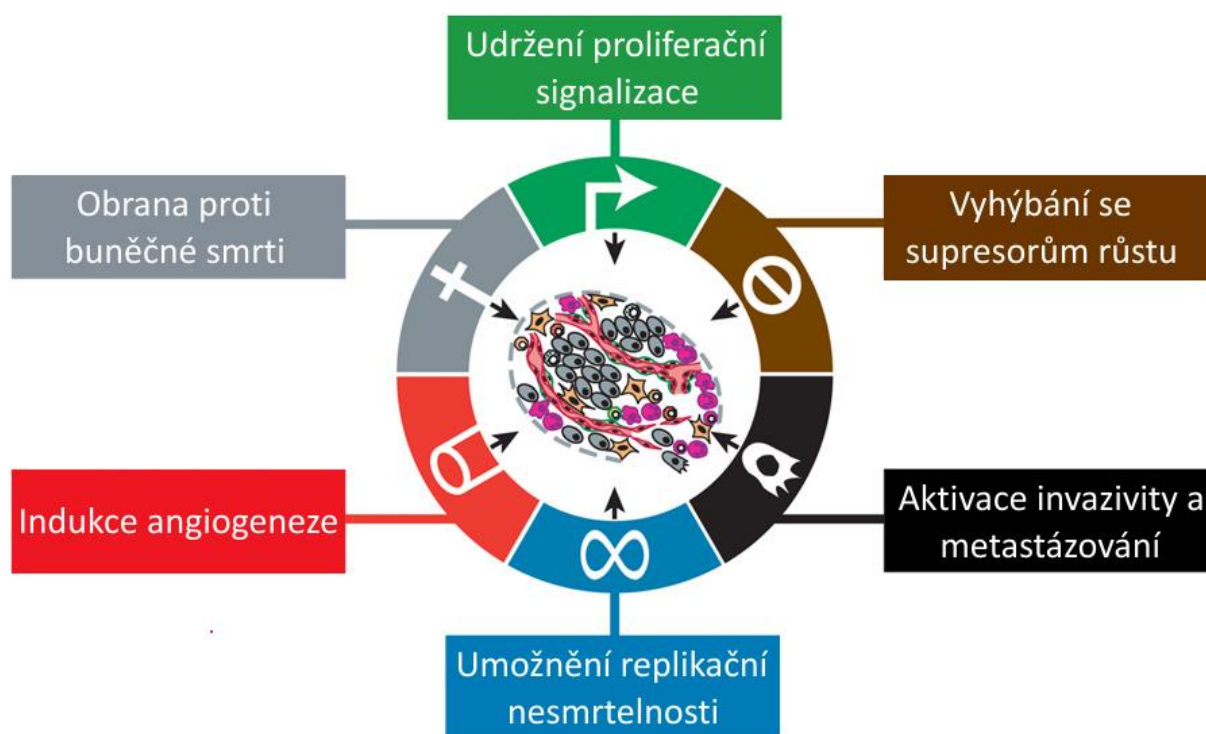
Je pravděpodobné, že spíše než přímé vychytávání volných radikálů, mohou být hlavními mechanismy zdraví prospěšného působení fytochemikálií, včetně silymarinu, aktivace Keap1/Nrf2/ARE dráhy a inhibice NF- κ B dráhy. Konzumace těchto fytochemikálií tak může mít modulační vliv na antioxidační systém těla. To může vysvětlit prospěšné zdraví podporující účinky stravy bohaté na ovoce a zeleninu jako důležitých zdrojů již zmíněných látek (polyfenolů a dalších fytochemikálií) udržujících schopnost těla být vysoce přizpůsobitelné k různým stresovým situacím. Silymarin a jeho hlavní komponenta silybinin mohou být odpovědné za regulaci antioxidační ochrany ve střevě i v celém těle. Předpokládá se, že některé složky stravy, které nejsou dobře absorbovány, mohou mít zdraví prospěšné působení udržováním redoxní rovnováhy v tlustém střevě. Zde jsou koncentrace dalších antioxidantů (vitamín E, karotenoidy, askorbát) nízké, ale prooxidanty (železo, oxidované polynenasycené mastné kyseliny atd.) a substráty oxidace jsou stále přítomny. Toto protektivní působení v tlustém střevě může být zodpovědné například za ochranu proti rakovině střev. To může vysvětlovat, že některé nutrienty nejsou absorbovány, ale jsou i přesto stále zapojeny v antioxidační ochraně střev. S ohledem na vysoké koncentrace fytochemikálií ve střevech tedy

ÚVOD

lze přepokládat, že hrají esenciální roli v udržování optimální antioxidační-prooxidační rovnováhy v trávicím traktu, která je zodpovědná za další zdraví prospěšné účinky fytochemikálií včetně silymarinu. Silymarin, samostatně, nebo v kombinaci s dalšími hepatoaktivními látkami (karnitin, betain, vitamín B12, atd.), by mohl mít obdobné hepatoprotektivní účinky (s podobnými mechanismy účinku), které jsou popsány u lidí i u zvířat [2].

Existuje mnoho možných mechanismů (přímých i nepřímých), kterými silymarin může vylepšit antioxidační obranu těla. Patří sem přímé vychytávání volných radikálů a chelatování volného Fe a Cu, které je efektivní zejména ve střevě. Velmi důležitá je ochrana před tvorbou volných radikálů prostřednictvím inhibice specifických enzymů katalyzujících reakce produkujících ROS, nebo zvýšení integrity elektron-transportního řetězce mitochondrií při stresových podmínkách jako výsledek konzumace silymarinu. Silymarin aktivuje v buňce řadu antioxidačních enzymů i neenzymatických antioxidantů, a to zvláště skrze aktivaci Nrf2. Tento transkripční faktor je pravděpodobně hlavní řídicí silou antioxidačního působení silymarinu a díky tomu dochází k udržování optimální redoxní rovnováhy. Silymarin je také schopen snižovat zánětlivou odpověď ve střevě a dalších tkáních inhibicí NF- κ B drah, což je předpokládaný mechanismus protektivního účinku silymarinu v případě jaterní toxicity a hepatopatií. Bylo by vhodné se v dalším výzkumu zaměřit na silymarinem aktivované vitageny, zodpovědné za syntézu ochranných molekul (např. HSP („heat shock protein“), TRX (thioredoxin) a sirtuiny) a poskytující přídatnou ochranu při stresových podmínkách. Rovněž by bylo zajímavé studovat mikroprostředí střev, kde dochází k interakci mezi silymarinem a bakteriemi [2].

Nádorové onemocnění je charakterizováno typickými znaky (Obr. 1), mezi které se řadí procesy udržení proliferační signalizace, vyhýbání se supresorům růstu, obrana proti buněčné smrti, umožnění replikační nesmrtelnosti, indukce angiogeneze a aktivace invazivity a metastázování. Novější poznatky zahrnují také reprogramování energetického metabolismu a vyvarování se destrukci imunitním systémem [3].



Obrázek 1 – Charakteristické znaky nádorového onemocnění. Upraveno dle Hanahana a Weinberga, 2011 [3].

Vznik těchto charakteristických znaků umožňují aktivující vlastnosti jako 1) genomová nestabilita a mutace a 2) zánět podporující tumor.

Problematika nádorových onemocnění je velice rozsáhlá a není proto možné se adekvátně věnovat všem procesům, které zahrnuje. Přesto, že jsou všechny zmíněné charakteristické znaky i aktivující vlastnosti pro tumor nezbytné [3], zaměřili jsme se v disertační práci na angiogenezi a apoptosu, protože vedle aberantní proliferace buněk jsou neoplastický vývoj a metastáze spojeny také s apoptosou a angiogenezí [4, 5]. Indukcí angiogeneze, procesu vytvářejícího s tumorem přidružené neovaskulatury, si rostoucí tumor zajišťuje potřebnou výživu doručením nutrientů a kyslíku. Nově vytvořené cévy také umožňují odstranění metabolického odpadu a oxidu uhličitého z nádoru [3]. Vzhledem k tomu, že novotvorbu cév využívá nádor o objemu již 1 mm³, jsou látky blokující angiogenezi nadějnými léčivy. Za přirozenou bariéru proti vývoji rakoviny je považována programovaná buněčná smrt apoptosou [6-8]. Nádorové buňky díky mutacím často nereagují na signály spouštějící tento děj a obnova apoptotické kaskády je tedy další terapeutickou strategií.

V dnešní době se využívá k léčbě nádorových onemocnění široká škála chemoterapeutik, které jsou však mnohdy pro celkový organismus velmi toxické. Proto se hledají přírodní alternativy, případně jejich semi-synteticky upravovaná analoga. Mezi

ÚVOD

studované látky patří také flavonolignany z extraktu ostropestřce mariánského a jejich modifikované deriváty.

2 Přehled současného stavu problematiky

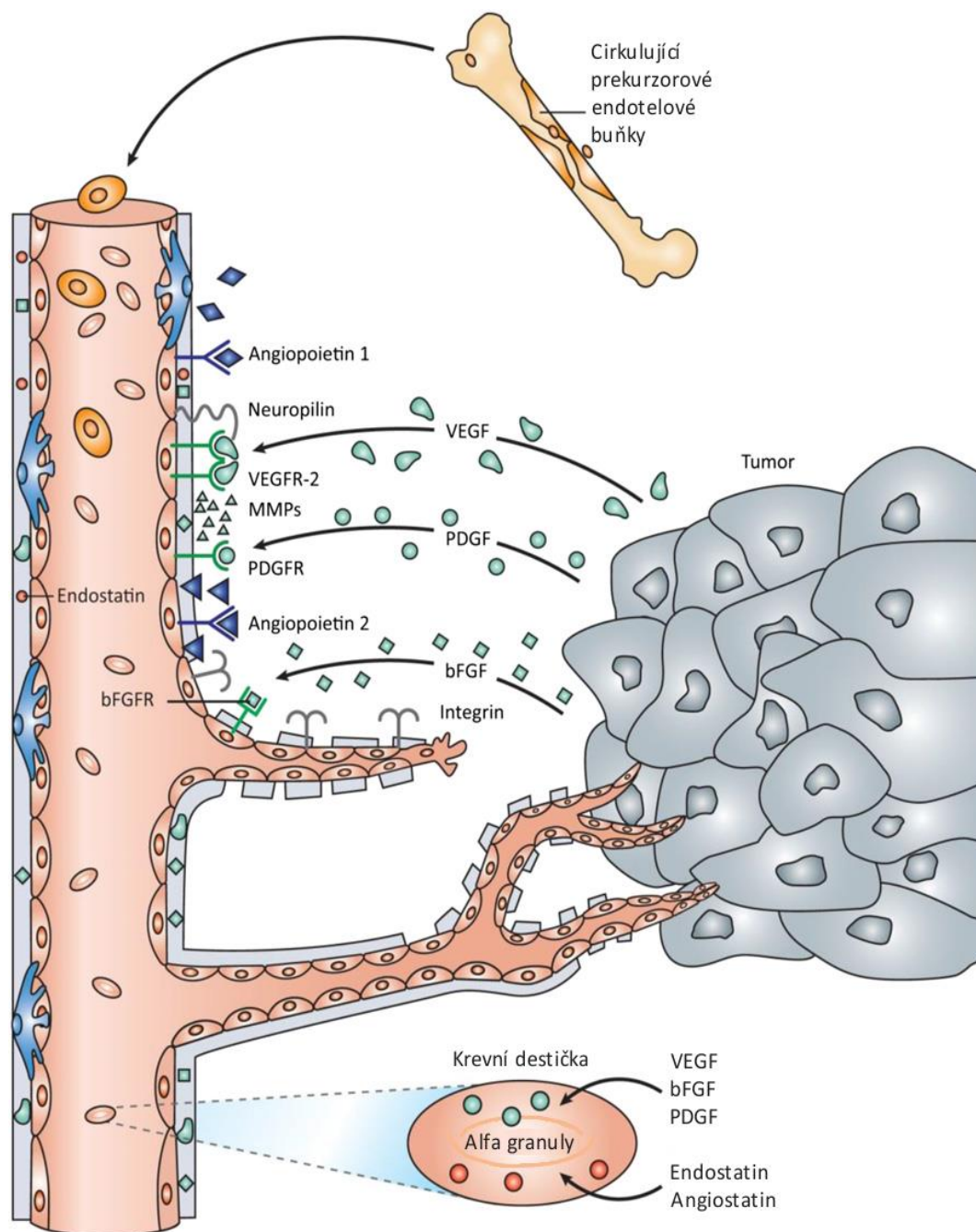
2.1 Angiogeneze

2.1.1 Mechanismus angiogeneze

Obecně je angiogeneze považována za komplexní fyziologický proces vytvářející novou vaskulaturu díky pučení endotelových buněk z již pre-existujících krevních cév, zahrnující těsnou regulaci četných signálních drah [9] a udržující stálost vnitřního prostředí (homeostázu). Tento proces je důležitý pro fyziologické děje jako je reprodukce, embryogeneze, hojení ran a remodelace tkání. Na druhou stranu vede nerovnováha v angiogenezi mimo jiné ke kardiovaskulárním chorobám, chronickému zánětu a především k rozvoji nádorového onemocnění [10], které angiogenní mechanismus využívá ke stimulaci svého růstu a progresi (Obr. 2) [11].

Počátky studií v oblasti angiogeneze a hypoxie ve spojení s rakovinou souvisí s hypotézou uvedenou v roce 1971 Dr. Judah Folkmanovou v časopise *New England Journal of Medicine*, že tvorba nových krevních cév je v nádorovém mikroprostředí způsobena produkcí proangiogenních faktorů tumory [12]. Postupem času bylo nalezeno množství genů, signálních kaskád a transkripčních faktorů, což vedlo k potvrzení hypotézy a komplexity angiogeneze [13].

Při novotvorbě krevních cév, umožňujících rostoucímu nádoru přívod živin a kyslíku, úzce spolupracují buňky tumorové, endotelové a fagocyty a jejich sekretované faktory [14].



Obrázek 2 – Mechanismus tumorové angiogeneze. Rozpustné angiogenní faktory jako například vaskulární endotelový růstový faktor („vascular endothelial growth factor, VEGF“), destičkový růstový faktor („platelet-derived growth factor, PDGF“) a fibroblastový růstový faktor („fibroblast growth factor, FGF“) jsou sekretovány tumorem a okolními buňkami k navození a regulaci klíčových kroků angiogeneze. Upraveno dle Zhao and Adjei, 2015 [15].

bFGF – „basic fibroblast growth factor,“ bazický fibroblastový růstový faktor; *bFGFR* – „basic fibroblast growth factor receptor,“ receptor pro bazický fibroblastový růstový faktor; *PDGFR* – „platelet derived growth factor receptor,“ receptor pro destičkový růstový faktor; *MMP* –

„matrix metalloproteinase,“ matrixová metaloproteinasa; *VEGFR-2* – „vascular endothelial growth factor receptor 2,“ receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor 2 [15].

2.1.2 Fyziologická vs. nádorová angiogeneze

Angiogeneze je u zdravých dospělých jedinců omezený proces, hraje ovšem klíčovou úlohu při růstu tumorů. Fyziologická angiogeneze probíhá regulovaně díky rovnováze pro- a antiangiogenních faktorů, kdežto nádorové cévy jsou charakterizovány vzácným a anomálním chováním. Nádorová angiogeneze jako taková je nestálý a abnormální proces s netěsnostmi v cévách [13].

Významný rozdíl existuje i mezi samotnými endotelovými buňkami u tumorové a fyziologické angiogeneze. Tumorové endotelové buňky se dělí rychleji než normální fyziologické endotelové buňky a produkují markery, které se v normálních endotelových buňkách nevyskytují [16].

2.1.3 Angiogenní faktory

2.1.3.1 Přehled proangiogenních faktorů

Mezi nejlépe charakterizované angiogenní faktory regulující novotvorbu nádorových cév patří VEGF, bFGF, PDGF, placentární růstový faktor („placental growth factor, PLGF“), hepatocytární růstový faktor/„scatter factor“ („hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF“) a angiopoetiny („angiopoietins, ANGs“). Funkce těchto proangiogenních faktorů je v literatuře dobře popsána a v dnešní době jsou proti nim již dostupné léky [17].

S ohledem na vztah funkčních vlastností s nádorovou angiogenezí byla studována řada proangiogenních peptidů (Obr. 3) [18-22].



Obrázek 3 – Proangienní peptidy. Upraveno dle Gacche a Meshram, 2014 [17].

Díky spolupráci četných pro- a antiangiogenních faktorů, složek extracelulární matrix a buněčných typů je určen druh, místo a intenzita angiogenní odpovědi [23]. Odborná veřejnost se shoduje, že nejvýraznějšími regulátory angiogeneze jsou VEGF a jeho receptor VEGFR-2, které jsou exprimovány ve zvýšené míře u různých typů nádorů [24].

2.1.3.1.1 Rodina cytokinů VEGF

Při vývoji terapeutických metod bránících angiogenezi u různých typů rakoviny je úspěšně cílen VEGF - klíčová molekula ve fyziologické i patologické angiogenezi. Jedná se pravděpodobně o nejrozsáhleji studovaný angiogenní cytokin. Jeho vazba na receptor VEGFR-2 spouští kaskádu proangiogenních reakcí vedoucích k proliferaci a migraci endotelových buněk a rovněž způsobuje propustnost nových cév [23, 25-29].

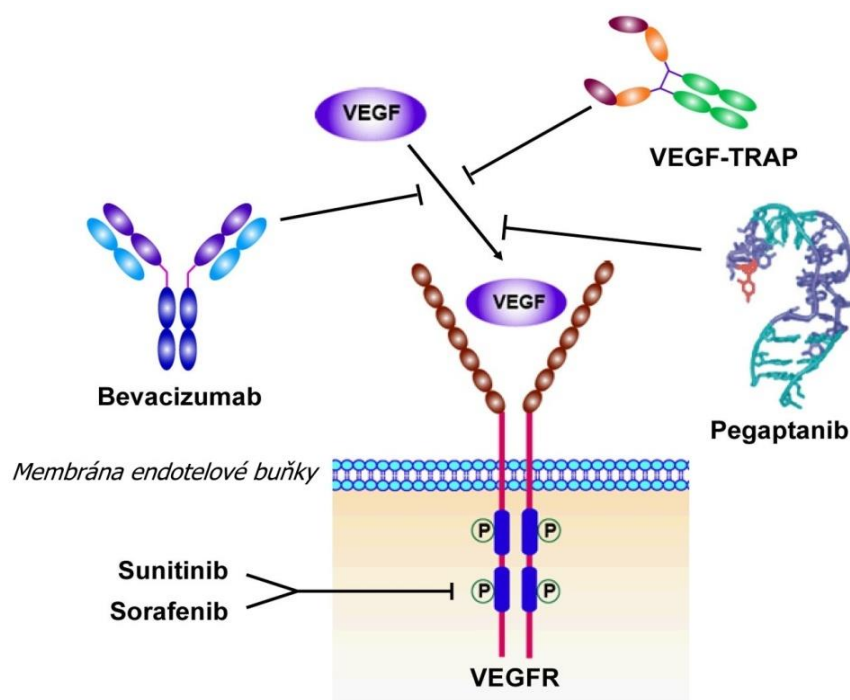
Rodina VEGF je tvořena sedmi odlišnými homologními faktory. Prvním je VEGF-A, který je jedním z nejstudovanějších v rámci této rodiny. U různých nádorových buněčných linií byla zjištěna exprese VEGF-A, zatímco exprese jeho receptorů, VEGFR-1 a -2 byla pozorována u buněk endotelových. Dalšími zástupci jsou VEGF-B, -C, -D, -E, -F a PLGF. Mechanismem alternativního sestřihu je tvořeno pět různých isoform VEGF – VEGF₁₂₃, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ a VEGF₂₀₆ [28, 30].

Exprese VEGF je regulována různými faktory. Jedním z nejdůležitějších je dostupnost kyslíku [31, 32]. Hypoxie hraje klíčovou roli v regulaci exprese VEGF, a to skrze transkripční faktor HIF-1 α (hypoxia inducible factor, hypoxia inducibilní faktor) [33].

VEGF se také váže na B domény neuropilinů (NRP1 a NRP2), ko-receptorů zahrnutých v angiogenezi a růstu nádorů [34-36].

2.1.3.1.1.1 VEGF jako terapeutický cíl

Jak již bylo uvedeno, bylo v roce 1971 na základě pozorování, že růst tumoru byl spojen s výraznou vaskulaturou, navrženo potlačení angiogeneze jakožto efektivní protirakovinná strategie. Rozpoznání dráhy VEGF jako klíčového regulátoru angiogeneze vedlo k vývoji několika látek cílících VEGF, jako například látky bránící vazbě k jeho receptorům, protilátky, které přímo blokují VEGFR-2 a malé molekuly, které inhibují kinasovou aktivitu VEGFR-2, čímž blokují signalizaci růstovými faktory. Některé z nich byly schváleny FDA pro klinické aplikace (Obr. 4) [37].



Obrázek 4 – VEGF cílené a antiVEGF léky. Upraveno dle Niu & Chen, 2010 [37].

2.1.3.1.1.2 Placentární růstový faktor (PLGF)

PLGF je exprimován především v placentárních tkáních [38, 39], ovšem za patologických podmínek je produkován v dalších typech buněk jakou jsou buňky cévní, fibroblasty, leukocyty, hepatocyty, buňky odvozené z kostní dřeně, neurony, buňky epitelu a tumorové buňky [40]. Je to cytokin patřící do rodiny VEGF a má ze 42 % shodnou sekvenci aminokyselin jako VEGF-A. Jako proangiogenní faktor je znám od roku 2009 [41].

V současnosti je PLGF zmiňován jako možný terapeutický cíl ovlivňující angiogenezi spojenou s patologickými stavy, jako je revmatoidní artritida [42], retinopatie a hojení ran u diabetiků [43, 44], ateroskleróza [45], různé typy rakoviny a zánětlivá onemocnění [46].

2.1.3.1.1.3 Cílení dráhy VEGF/VEGFR

VEGF signalizace stimuluje buněčné dráhy, které vedou k tvorbě a větvení nových cév vyživujících nádor a podporuje jeho rychlý růst a metastatický potenciál [47]. Bylo prokázáno, že by inhibice pouze samotné VEGF/VEGFR dráhy způsobila rychlou a trvalou antiangiogenní/antitumorovou odezvu [48].

Zlepšení prognózy onkologických pacientů s rakovinou ve srovnání se samotnou chemoterapií bylo indikací pro schválení několika inhibitorů VEGF/VEGFR [49-51]. Vývoj

antiangiogenních látek ovlivňujících VEGF zůstává hlavní oblastí výzkumu nových cytostatik [52].

Jako léčiva inhibující tuto dráhu byly schváleny monoklonální protilátky proti VEGF a inhibitory VEGF receptorových tyrosin kinas [53]. Jejich použití v terapii ovšem zároveň odhalilo určitá klinická omezení vedoucí k hledání nových cílů a léčiv ovlivňujících nádorovou angiogenezi [54].

Pokud je signalizace skrze VEGF zablokována, může dojít ke spuštění náhradních mechanismů zprostředkovaných PDGF a FGF signálními drahami, které také regulují proces angiogeneze, růst tumorů a jejich metastázování. Novější léčebné antiangiogenní přístupy se tudíž zaměřují na souběžnou blokádu VEGF/VEGFR signalizace a dalších drah nezbytných pro angiogenezi a růst nádorů [15].

Na VEGF se váže monoklonální protilátka bevacizumab, která je účinnou látkou protinádorového léku Avastinu, registrovaného v Evropské unii od roku 2005. Díky rozpoznání a vazbě na VEGF, dochází k zastavení účinku tohoto faktoru, který jinak cirkuluje v krvi a působuje růst krevních cév. Rakovinné buňky v důsledku toho nemají vlastní přísun krve, nedostává se k nim kyslík a živiny a dochází tak ke zpomalení růstu tumorů [55].

2.1.3.1.2 Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF)

FGF rodina zahrnuje 22 zástupců zapojených v rozličných procesech jako jsou embryonální vývoj, regenerace tkání a hojení ran [56]. Pouze 18 z těchto sekretovaných glykoproteinů [57] funguje jako ligandy pro FGF receptor, další čtyři (FGF-11, FGF-12, FGF-13 a FGF-14) jako ligandy neslouží [56]. FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-5 a FGF-8 stimulují angiogenezi [58]. Jsou známy 4 receptory pro fibroblastový růstový faktor (FGFRs 1-4) [59, 60], přičemž FGFR-1 a -2 jsou exprimovány endotelovými buňkami [58].

Díky podstatné roli ve FGFR signální dráze řídí FGF-1 angiogenezi [61] a pozitivně reguluje buněčnou migraci [61] a proliferaci [62]. Nejčastěji studovaný fibroblastový růstový faktor je peptid FGF-2, známý také jako bazický fibroblastový růstový faktor. Jeho aktivita je primárně zprostředkována vazbou na FGFR-1 a posílením cévního pučení [59, 63]. FGF-2 je schopný podporovat angiogenezi a lymfangiogenezi, stimulovat růst, migraci a v některých případech i diferenciaci buněk [53].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

FGFs navozují angiogenezi podněcováním proliferace endotelových buněk a degradace extracelulární matrix, a dále ovlivněním kadherinů, „gap junctions“ a modulací exprese integrinů, což vede ke změnám mezibuněčné adheze a komunikace [53, 64, 65].

Angiogenní působení FGF je zprostředkováno především skrze aktivaci endotelových buněk a doplnění pericytů, buněk hladkého svalstva cév („vascular smooth muscle cells, VMCs“) a monocytů [56]. FGF také hraje klíčovou roli v regulaci integrity cév. Působením na buněčné spoje a enzymy tyto spoje ovlivňující, přispívá FGF k odbourávání extracelulární matrix, což usnadňuje migraci endotelových buněk [66].

V terapiích cílících FGF a FGFR se využívá tyrosinkinasových inhibitorů o malé molekulové hmotnosti (proti FGFR, PDGR a VEGFR), protilátek proti FGFR a FGF ligandové pasti [60].

První důkazy o změnách ve dráze FGF/FGFR byly objeveny u metabolických onemocnění jako například kraniosynostózy, achondroplazie a hypogonadotropního hypoadismu. V dnešní době je známo, že mutace identické s těmi, které jsou přítomny u těchto onemocnění, mohou být detekovány u tumorových buněk [67].

Nedávná studie, kdy bylo porovnáno více než 4800 vzorků tumorové tkáně, ukázala, že 7,1 % všech typů tumorů vlastní genetické změny v ose FGF-FGFR. Procento odchylek bylo analyzováno pro rozdílné podrodiny FGFRs a bylo prokázáno, že nejčastěji změny ovlivňují FGFR1 (49 %), poté FGFR3 (23 %) a FGFR2 (19 %). FGFR4 je ovlivněn ze 7 %. Navíc se u malého počtu pacientů objevily mnohonásobné změny (5 %). Změny v případě rodiny FGFR jsou běžnější u žen než u mužů (17,6 % vs 10,0 %). Tato data mají velkou vědeckou hodnotu, jelikož ukazují, že změny v této dráze jsou třetí nejčastější po anomáliích v případě TP53 a KRAS [68, 69].

2.1.3.1.2.1 Terapeutické možnosti proti FGFR

Molekuly inhibující FGFR mohou být rozděleny do dvou skupin: neselektivní FGFR TKIs a selektivní FGFR TKIs. První skupina je spojena s TKIs, které mají více cílů (mezi které FGFR patří) a druhá skupina koresponduje s vysoce selektivními FGFR TKIs. Navíc jsou pro jejich schopnost inhibovat FGFR zkoumány další dvě skupiny léčiv: monoklonální protilátky a FGF-ligandové pasti [67].

Pro řízení a léčbu několika druhů rakoviny byly syntetizovány různé chemoterapeutické látky; ovšem žádná samostatná terapie nebo kombinační terapie není mimořádně efektivní. Vedle dalšího tyrosinkinasového receptoru (TKR) bylo popsáno pozoruhodné množství

molekul inhibujících FGFR – konkrétně VEGFR, PDGFR, „fms-like tyrosine kinase 3“ (FLT-3), receptor pro „stem cell factor (SCF)“ charakteru tyrosinkinasy (c-KIT), „rearranged during transfection,“ či také „glial cell-line derived neurotrophic factor receptor“ (RET) a fúzní gen Filadelfského chromozomu, sloužící jako molekulární marker pro chronickou myeloidní leukémii (CML) (BCR-ABL). Tato inhibice může být i částečná. Mezi tyto látky patří Brivatinib, Lenvatinib, Regorafenib, Ponatinib, Dovitinib, Nintedanib, Pazopanid, Orantinib, ENMD 2076, Lucitanib, PBI 05204, Sunitinib a Cediranib [67].

V posledních letech bylo popsáno několik molekul fungujících jako selektivní inhibitory celé FGFR rodiny. Patří sem AZD4547, BGJ398, LY2874455, Tas-120, ARQ-087, PD173074, JNJ-42756493, BLU9931, DEBIO 1347, FGF 401 a BAY-1163877 [67].

Pozornost přitahuje vývoj protilátek, které cílí pouze vybrané zástupce, nebo dokonce jen isoformy receptoru. K cílení osy FGF-FGFR bylo vyvinuto několik odlišných mAb: GP369, GAL-FR21, GAL-FR22, GAL-F2, MFGR1877S, hLD1.vb, FP-1039, R3Mab, PRO-001, 1A6 a LD1. Jsou zvažovány pouze dva mechanismy účinku: buď vazba blokujícího ligandu („trap-ligand“), nebo bránění před dimerizací receptoru. Nicméně, pouze dvě z látek jsou uvažovány pro hodnocení v klinických zkouškách: MFGR1877S a FP-1039 [67].

2.1.3.1.3 Destičkový růstový faktor (PDGF)

PDGF je 30 kDa dimer (PDGF-A a PDGF-B) kódovaný dvěma geny. Mohou tedy vzniknout tři dimerní isoformy proteinu - PDGF-AA, PDGF-BB a PDGF-AB. Ty patří do heparin-vázající rodiny polypeptidových růstových faktorů. Jejich biologická aktivita je zprostředkována skrze tři dimerní receptorové struktury (PDGFR- $\alpha\alpha$, - $\beta\beta$ a - $\alpha\beta$) [17]. Kromě výše uvedených byly objeveny ještě další dvě formy PDGF – PDGF-C a PDGF-D [70, 71] tvořící homologní dimery PDGF-CC a PDGF-DD a celkem je tedy známo pět isoform tohoto růstového faktoru [72]. Po vazbě PDGF na PDGFR dochází k autofosforylaci tyrosinových zbytků receptorů, čímž je zprostředkována signalizace [73].

PDGFs získaly důležitou pozici v terapii nádorů díky tomu, že hrají nezbytnou roli v buněčné proliferaci a jsou také zapojeny v neoplaziích [74].

Zvýšená signalizace skrze PDGFRs je, mimo dalších procesů zapojena v tumorogenezi a angiogenezi [75].

PDGF uvolněný endotelovými buňkami verbuje parakrinní cestou pericyty a buňky hladkého svalstva cév, které exprimují PDGFRs [76-78] a hrají roli v integritě a funkci

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

vyvíjející se vaskulatury [79], protože podporují stabilizaci krevních cév [77, 79-82]. Navíc se mohou díky sekreci PDGF tumorovými buňkami rekrutovat stromální buňky, které umožňují podporu angiogeneze prostřednictvím uvolnění VEGF [83].

Inhibice PDGF-PDGFR signální dráhy se rovněž stala atraktivním cílem v onkologické terapii [84]. Slibnou strategií pro potlačení angiogeneze při růstu tumorů se ukázala také kombinovaná inhibice PDGF a VEGF [85, 86].

U mnoha lidských malignit byla nalezena nadexprese PDGF a PDGFR a někteří pacienti mají vysoké hladiny PDGF v séru. Zvýšená množství PDGF a PDGFR u pacientů s rakovinou korelují se slabou odpovědí na chemoterapii a kratším přežitím. Tumorové buňky a s tumorem-asociované endotelové buňky exprimují aktivující PDGFR. Inhibice fosforylace PDGFR tyrosin kinasovým inhibítorem PDGFR se stávají terapeutickou strategií, kterou se vědci zabývají zejména v poslední dekádě. Inhibice aktivace PDGFR může snížit buněčnou proliferaci a zvýšit rychlost apoptosy. Antagonisté PDGF zahrnují neutralizující protilátky proti ligandům, či receptorům, inhibitory dimerizace receptoru a nízkomolekulární látky působící skrze kompetitivní vazbu na aktivní místo receptorů. Makromolekulární sloučeniny působící extracelulárně mají v porovnání s inhibitory kinas vyšší specifitu, ovšem nižší farmakologickou účinnost. Cílené narušení vazby PDGF-B na PDGFR β má u myši za výsledek odstranění pericytů a tak mohou být tyto buňky cílem pro antiangiogenní terapii. Pericyty, jako ostatní perivaskulární a stromální buňky, exprimují PDGFR β a cílení tohoto receptoru může být prospěšné dokonce při absenci jeho onkogenní formy [87].

Nejznámějším inhibítorem PDGFR je imatinib mesylát, nízkomolekulární analog adenosintrifosfátu. Imatinib byl hodnocen u mnoha malignit a kompletní, nebo částečné odpovědi bylo dosaženo v případě výstupků dermatofibrosarkomu, glioblastomu, rakoviny prostaty a vaječníků. Navíc bylo ukázáno, že imatinib inhibuje proliferaci neuroektodermálních tumorů, jako Ewingova sarkomu, či neuroblastomu. Na druhou stranu, imatinib neměl jako samostatná látka klinický efekt na expresi PDGFR β u vysokého stádia rakoviny prsu, neměnil úroveň angiogenních molekul v plazmě a ukázal potenciální imunopresivní efekt. Toto je v kontrastu s očekávanými výsledky, jelikož nadexprese PDGFR je běžným nálezem ve většině invazivních rakovin prsu v případě tumorových i stromálních buněk [87].

Na základě získaných dat byla vyslovena hypotéza, že taková strategie je použitelná speciálně u solidních tumorů s multilékovou resistencí. Bylo nalezeno, že u lidské multilékově-resistentní buněčné linie rakoviny prostaty indukuje podání inhibitoru imatinibu společně s paclitaxelem snížení počtu kostních metastáz. Fosforylace PDGFR byla inhibována u ECs

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

a rakovinných buněk, což zvýšilo rychlost apoptosy, snížilo mikrovaskulární denzitu (MVD), velikost tumoru a metastázy v lymfatických uzlinách. Hlavním cílem pro imatinib v experimentálním modelu rakoviny prostaty je endotelová buňka. Postupně byly v klinických zkouškách u lidských pacientů s rakovinou jako vratný karcinom vaječníků či rakovina prostaty testovány imatinib, sorafenib, dasatinib, sunitinib a neutralizující PDGFR protilátky. V nedávné době bylo prokázáno, že imatinib senzitivizuje chemirezistentní buňky gliomu vůči toxicitě cisplatinu v závislosti na inaktivaci Akt [87].

U mnoha patologických podmínek a obzvláště u proliferativních lezí vede terapeutická inhibice pouze jednoho angiogenního faktoru k inhibici angiogeneze. U endometriálních lezí bylo ukázáno, že selektivní zablokování VEGF tyrosin kinasovým inhibitorem SU 5416 (semaxanib) vedlo k mírnému snížení MVD. Na druhou stranu, kombinovaná inhibice VEGF, FGF a PDGF s SU5416 a SU6668 měla za výsledek výraznou inhibici angiogeneze a zranění krevních cév. Stejné efekty byly získány blokováním VEGFR a PDGFR u myšího modelu buněk rakoviny pankreatických ostrůvků s SU10944 a imatinibem spojených do metronomické chemoterapie. Při použití tohoto režimu bylo dosaženo částečné (81%) odpovědi a prodloužení mediánu přežití myší. Toto je další důkaz demonstrující, že je angiogeneze řízena ne pouze VEGF, ale také propojením mezi mnoha angiogenními faktory. Taková terapeutická strategie potřebuje další validaci, protože v novější studii, kdy bylo použito vysoce specifických rozpustných receptorů, navrhli Kuhnert et al. [88], že závislost mezi inhibicí VEGFR a PDGFR β závisí na síle blokace VEGF a jeví se minimální za podmínek maximálního VEGF antagonismu [87].

Při hodnocení vlivů tyrosinkinasových inhibitorů na ECs u rakoviny prostaty a glioblastomu *in vivo* a *in vitro* našli Timke et al. [89] zvýšenou apoptosu, redukovanou buněčnou proliferaci a sníženou migraci a tvorbu trubic u endotelových buněk. Důležitější je, že byly tyto vlivy zvýšeny přídatným ozářením k angiogenní terapii (SU5416 a SU6668) se signifikantním zpožděním růstu tumoru. Bylo zjištěno, že radiace indukuje nadregulaci všech 4 izoform PDGF, což může částečně vysvětlit schopnost tumoru odolat před poškozením radiací. Přidání SU6668 redukuje parakrinní efekt radiace a přispívá k lepšímu protinádorovému vlivu. Kombinace radioterapie s antiangiogenní/antivaskulární terapií se tedy může stát významnou protirakovinnou strategií a již vstoupila do klinických testování. Nicméně, navzdory tomu, že jsou tato data přesvědčivá pro rakovinu prostaty a glioblastom, je u mnoha dalších lidských solidních tumorů nejasné, jaká kombinace signálních inhibitorů

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

bude neefektivnější a jak dále vytvářet různé kombinace s radioterapií pro další zvýšení účinnost [87].

Další tyrosin kinasový inhibitor, sunitinib, byl nedávno ukázán jako efektivní u pacientů s metastatickým renálním buněčným karcinomem. Zvyšoval celkové přežití, ale pouze pro 70 % léčených pacientů byl prokázán klinický přínos. Efektivita v kontrole nemocí je dokonce vyšší, pokud je sunitinib použit v terapii společně s interferonem-alpha. Naneštěstí, dodnes neexistují specifické sérové markery s prediktivním významem pro odpověď k léčbě s tyrosin kinasovými inhibitory u metastatického renálního buněčného karcinomu [87].

Vlivy tyrosin kinasových inhibitorů na růst tumorů a angiogenezi byly hodnoceny nejen u solidních tumorů, ale také u hematologických malignit. V preklinické studii bylo ukázáno, že dráha PDGF-B/PDGFR β podporovala růst tumorů a cévní pučení v mnohačetném myelomu a dasatinib, inhibitor PDGFR β /Srv, zpozdil růst tumorů a angiogenezi [87].

PDGFR β byl identifikován jako důležitý cíl léčiv v nádorové terapii na základě nadexprese PDGF-B mnoha solidními tumory. Je stále nejasné, zda současná inhibice VEGF a PDGF je více efektivní ve srovnání s inhibicí jednotlivých růstových faktorů. V nedávné experimentální studii Rip-Tag2 tumorů a Lewisových plicních karcinomů demonstrovali Sennino et al. [90] rozdílnou expresi VEGF a PDGF a rozdílný vliv na mikrovaskulaturu specifických inhibitorů. Na základě těchto výsledků bylo navrženo, že odpověď na angiogenní inhibitory může být určena buněčným zdrojem a množstvím angiogenních molekul, vztahy mezi pericyty a ECs a tumorovým fenotypem [87].

Ačkoliv byly tyrosin kinasové inhibitory, obzvláště imatinib, prokázány jako efektivní u gastrointestinálních stromálních tumorů a myelomonocytické leukémie, nebyla uvedena v klinických zkouškách žádná výhoda u různých lidských tumorů v pokročilém stádiu, jako metastatické rakoviny prsu, metastatického melanomu, mnohačetného myelomu a hepatocelulárního karcinomu. Je tedy klíčové identifikovat více efektivní kombinace tyrosin kinasových inhibitorů s jinými chemoterapeutickými činidly a identifikovat nové inhibitory PDGF/PDGFR signalizace [87].

Bylo vyvinuto mnoho úsilí za účelem identifikovat další specifické molekuly s inhibičními vlivy na osu PDGF/PDGFR. Malá molekula, GFB-111, která se váže na PDGF ji chrání před vazbou na jeho receptorovou tyrosinkinasu, blokuje PDGF-inkukovanou fosforylaci a v modelu nahých myší ukázala signifikantní inhibici růstu tumorů a angiogeneze. Molekula GFP-111 byla účinná na glioblastomové buněčné linii, ovšem ne v případě

meduloblastomových buněk. Mechanismus, kterým tato molekula zasahuje do růstu tumoru není kompletně pochopen, bylo ovšem nalezeno výrazné snížení MVD. V nedávné studii bylo ukázáno, že delfinidin, hlavní biologicky aktivní složka bobulí, rychle inhibuje aktivaci PDGFR β v perivaskulárních buňkách, potlačuje tvorbu cév, migraci pericytů a tvorbu kapilárám podobných tubulárních struktur ve třídimenziálních ko-kulturách a vykazuje protirakovinnou aktivitu [87].

2.1.3.1.4 Hepatocytární růstový faktor/„scatter“ faktor (HGF/SF)

Angiogenní rysy tohoto faktoru se projevují hlavně vazbou k jeho transmembránové receptor tyrosin kinase na endotelových buňkách, která je kódovaná proto-onkogénem MET (c-met) [91]. HGF je exprimován a následně sekretován širokým spektrem nádorových buněk a receptory c-Met na endotelových buňkách aktivuje parakrinní cestou. Touto aktivací je, převážně prostřednictvím indukce proliferace, migrace a přežívání endotelových buněk, regulována nádorová angiogeneze [17]. Osa HGF/c-Met hraje významnou roli v rozdílných stádiích vývoje a také tumorogenezi [92]. Stejně jako HGF bývá i jeho receptor v rakovinných buňkách často exprimován ve vyšší míře [17].

V literatuře můžeme nalézt experimenty, ve kterých byl HGF úspěšně blokován a tím pak i angiogeneze [17]. Proti HGF byly vyvinuty a testovány protilátky, a také bylo prokázáno, že schopnost neutralizovat *in vitro* aktivitu tohoto faktoru nemá žádná samostatná monoklonální protilátka. Výsledkem tohoto výzkumu bylo, že k zabránění aktivace Met tyrosinkinasy musí být zablokovány minimálně tři epitopy obsažené v HGF [93].

2.1.3.1.5 Angiopoetiny

Rodina růstových faktorů angiopoetinů (ANGs), nezbytných pro tvorbu krevních cév, patří mezi dimerní sekretované glykoproteiny s molekulovou hmotností okolo 75 kDa [94, 95]. Existují celkem 4 typy ANG ligandů – ANG-1 až -4, z nichž jsou nejlépe charakterizovány ANG-1 a ANG-2. ANG-3 je myší a ANG-4 lidský ortholog a v porovnání s dalšími členy rodiny ANG byly, v souvislosti s jejich rolí v angiogenezi, provedeny testy s kontroverzními výsledky [96]. Aktivita ANGs ligandů je zprostředkována skrze vazbu na Tie-2 receptor („tunica intima endothelial kinase 2 receptor“) [97-100].

Angiopoetiny plní v angiogenezi funkci při regulaci dozrávání, kde konkrétně hraje klíčovou roli ANG-2 [17], a také při remodelaci nových cév [101, 102]. Při indukci angiogeneze

a expresi matrixových metaloproteinás (MMPs) degradujících základní membránu spolupracuje ANG-2 s VEGF [102].

V rámci navrhování nových antiangiogenních léčiv byl ANG-2 na přelomu 20. a 21. století jednou z nejprobádanějších cílových molekul pro vývoj druhé generace antiangiogenních léků zastavujících růst a proliferaci nádorů [103-105].

2.1.3.2 Příklady antiangiogenních látek

Antiangiogenní látky patří mezi nejběžněji klinicky používané protirakovinné látky. Nejvíce používané antiangiogenní látky jsou ty, které cílí VEGF. Prvním inhibitorem VEGF schváleným pro léčbu rakoviny byl bevacizumab. Bevacizumab je schválen FDA, EMEA (Evropská léková agentura) a mnoha dalšími regulačními autoritami k léčbě kolorektálního, nemalobuněčného plicního, prsního a ledvinného buněčného karcinomu a také glioblastomu. Bevacizumab byl s výjimkou glioblastomu schválen pro léčbu karcinomů vždy v kombinaci s chemoterapií [36].

2.1.3.2.1 Bevacizumab

Bevacizumab je humanizovaná monoklonální protilátka tvořená konvenční lidskou strukturou IgG1 a antigen-vázacími regiony (93 %) a komplement-určujícími oblastmi z myší mAb A.4.6.1 (7 %). Bevacizumab neutralizuje všechny izoformy lidské VEGF a inhibuje VEGF-indukovanou proliferaci endotelových buněk *in vitro* s ED₅₀ okolo 50 ng/ml [37].

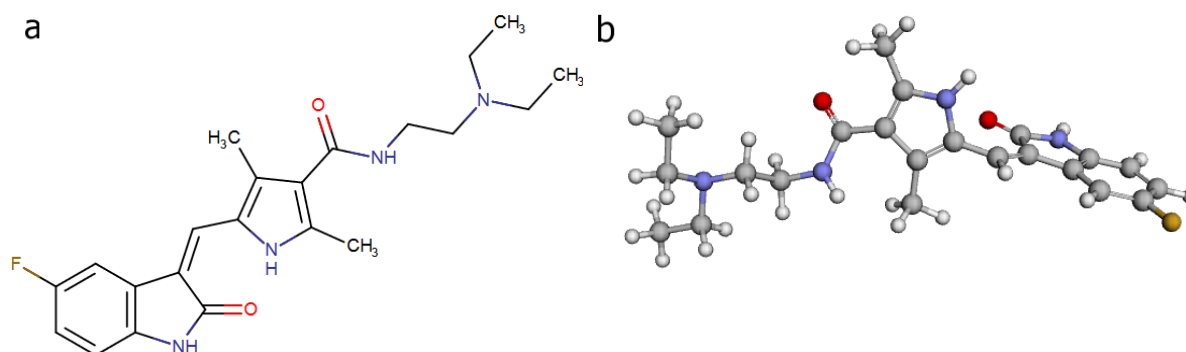
Při studiu distribuce analyzované u králičího modelu, bylo zjištěno, že většina bevacizumabu zůstává v plazmě s tím, že je v porovnání s ostatními orgány velké množství distribuováno do srdce, varlat, močového měchýře a ledvin s cirkulačním poločasem rozpadu ~ 20 dní [37].

Bevacizumab byl testován v kombinaci s několika chemoterapeutickými léčivy jako například doxorubicin, topotekan, paclitaxel a docetaxel, které mu přidávají na efektu. Kombinace bevacizumacu s paclitaxelem měla výsledek ve zřetelném potlačení růstu tumoru jak u CWR22R androgen-nezávislém xenograftovém modelu rakoviny prostaty, tak u modelu OVCAR3 ovariálního tumoru. Porovnáme-li kombinované použití s použitím samotného bevacizumabu, či paclitaxelu, přináší kombinovaný způsob signifikantně vyšší redukci růstu tumoru [37].

2.1.3.2.2 Sunitinib

Sunitinib (Sutent; Pfizer) je multikinasový inhibitor inhibující VEGFR1, 2 a 3, PDGFR, c-KIT a RET. Sunitinib je schválen FDA a EMEA pro léčbu ledvinného buněčného karcinomu a gastrointestinálních stromálních tumorů. Působení u GISTs je pravděpodobně dáno efektem sunitinibu na c-KIT, základní mutaci vyskytující se u těchto tumorů [36].

Sunitinib je podáván orální cestou. Je to nízkomolekulární inhibitor schopný zasáhnout různé receptorové tyrosin kinasy (RTK) a je schválen FDA pro léčbu renálního buněčného karcinomu (RCC) a imatinib-resistentního gastrointestinálního stromálního tumoru od 26. ledna 2006. Sunitinib inhibuje buněčnou signalizaci cílením mnohých receptorových tyrosinkinas, kam patří všechny receptory pro PDGF a receptory pro VEGF. Sunitinib rovněž inhibuje KIT (CD117), receptor tyrosin kinasu řídící většinu GISTs. Navíc sunitinib inhibuje i další receptorové tyrosin kinasy, jako jsou RET, „Colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R)“ (CSF-1R) a „fms related tyrosin kinase 3“ (flt3). V obrázku 5 je zobrazen strukturální vzorec a 3D struktura sunitibu. (DrugBank Accession Number DB01268 (DB07417)).



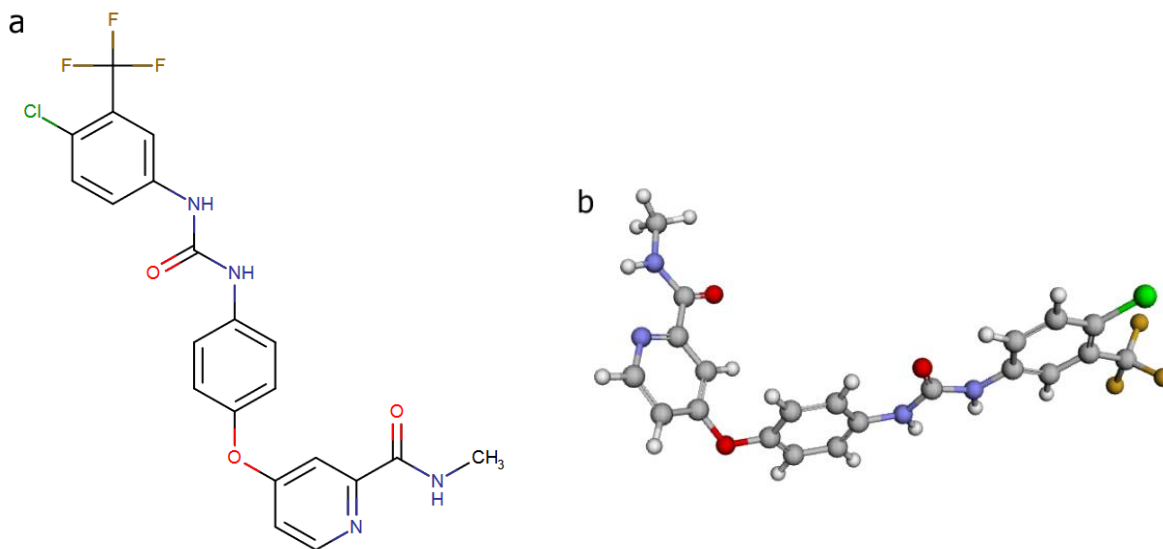
Obrázek 5 – strukturální vzorec (a) a 3D struktura (b) sunitibu. Převzato a upraveno dle databáze DrugBank.

2.1.3.2.3 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar; Onyx and Bayer) je rovněž multikinasový inhibitor inhibující VEGFR1, 2, 3, PDGFR, c-KIT, RET a proteinovou kinasu Raf (Raf). Sorafenib je schválen pro léčbu ledvinného buněčného karcinomu a hepatocelulárního karcinomu (hepatomu) [36].

Sorafenib (rINN), který je firmou Bayer prodáván jako Nexavar je lék schválený pro léčbu pokročilého renálního buněčného karcinomu (primární rakovina ledvin). Od FDA získal označení „Fast Track“ pro léčbu pokročilého hepatocelulárního karcinomu (primární rakovinu jater) a od té doby funguje dobře ve studiích fáze III. Většinu z těchto drah cílí

zvyšující se počet léků. Originalita sorafenibu stojí na simultánním cílení Raf/Mek/Erk dráhy. V obrázku 6 je zobrazen strukturální vzorec a 3D struktura sunitibu. (DrugBank Accession Number DB00398 (APRD01304, DB07438)).

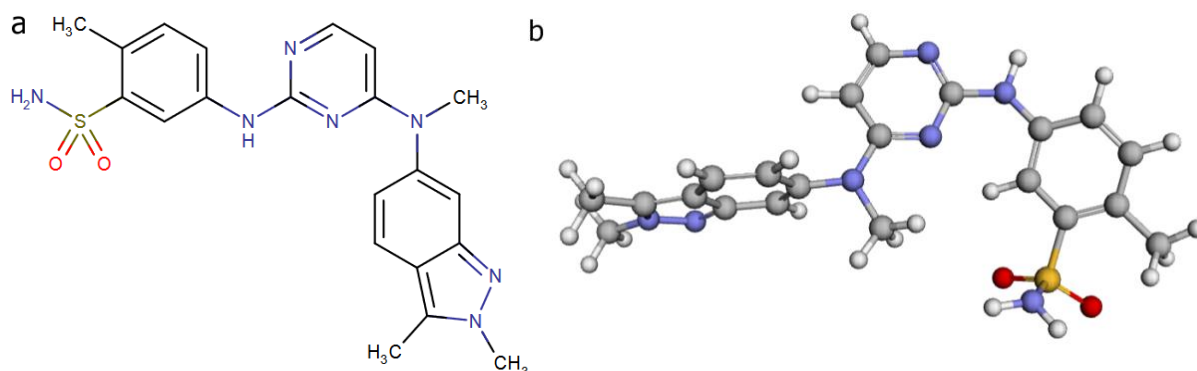


Obrázek 6 - strukturální vzorec (a) a 3D struktura (b) sorafenibu. Převzato a upraveno dle databáze DrugBank.

2.1.3.2.4 Pazopanib

Pazopanib je FDA a EMEA schválen pro léčbu pokročilých renálních buněčných karcinomů [36].

Pazopanib je malý molekulární inhibitor mnohých proteinových tyrosinkinas s potenciální antineoplastickou aktivitou. Je vyvinut firmou GlaxoSmithKline a byl schválen FDA 17. října 2009. V obrázku 7 je zobrazen strukturální vzorec a 3D struktura pazopanibu. (DrugBank Accession Number DB06589).



Obrázek 7 - strukturální vzorec (a) a 3D struktura (b) pazopanibu. Převzato a upraveno dle databáze DrugBank.

2.1.3.2.5 Shrnutí k antiangienním činidlům

Sunitinib, sorafenib a pazopanib byly schváleny jako léčiva vhodná pro monoterapii [36].

Léčebné postupy za použití anti-VEGF přístupů byly relativně dobře tolerovány, obzvláště při porovnání s tradiční chemoterapií. To může souviset se skutečností, že tumor specificky exprimuje VEGF a/nebo nadbytkem angiogeneze u pacienta [36].

2.1.4 Angienní inhibitory

Většina používaných inhibitorů angiogeneze funguje nepřímo buď odstraněním angienních růstových faktorů, nebo blokováním či zamezením funkce receptorů/signálních drah těchto růstových faktorů. Angienní inhibitory však existují také jako angiostatické látky s přímým efektem na endotelium, čímž ovlivňují buněčné regulační dráhy nezávisle na tumorových buňkách [106]. Bylo identifikováno mnoho faktorů s antiangienními vlastnostmi. Příkladem je angiostatin, který, mimo jiné, spouští v endotelových i tumorových buňkách apoptosu [107].

2.1.4.1 Angiostatin

Angiostatin byl objeven Folkmanem a jeho spolupracovníky v roce 1994. Byl identifikován skrze protinádorové vlivy u myši a později prokázán jako účinný inhibitor angiogeneze. Vnitřní fragment plazminogenu, angiostatin se skládá z „kringle“ domén vázajících lysin. Krytalová struktura angiostatinu byla první publikovaná „multikringle“-doménu obsahující struktura [108].

Navzdory intenzivnímu zájmu o angienní inhibitory je poměrně málo známo o přesném mechanismu účinku angiostatinu i většiny dalších angienních inhibitorů. Bylo

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

ovšem identifikováno několik potenciálních cílů účinku. Pizzo a jeho spolupracovníci objevili, že se angiostatin váže přímo na mitochondriální F(1)-F(0) ATP syntasu a dále, že se ATPasa může nalézat na povrchu endotelových buněk [109]. Také ukázali, že je angiostatin účinný inhibitor obou forem enzymu, který se vyskytuje na povrchu buněk purifikované mitochondriální formy [110]. Autoři spekulují, že F(1)-F(0) ATP syntasa na povrchu endotelových buněk hraje významnou roli v udržování intracelulárního pH v kyselém prostředí tumorových buněk [109, 110]. Role angiostatinu je v inhibici protonové pumpy, která dovoluje snížit intracelulární pH, což spouští apoptotické události v endotelových buňkách [108].

Alternativně našli Takada a jeho spolupracovníci, že se angiostatin váže specificky na $\alpha_v\beta_3$ integrin na povrchu CHO buněk a bovinních arteriálních endotelových (BAE) buněk EACA-závislým způsobem [111]. Dále ukázali, že plazmin, na rozdíl od plazminogenu je také ligandem $\alpha_v\beta_3$ integrinu a indukuje tak migraci endotelových buněk [112]. Mechanistickým závěrem z těchto studií je, že lokalizace proteasové domény plazminu vůči integrinu na buněčném povrchu je pro jeho aktivitu nezbytná. Angiostatin a potenciálně mnoho dalších plazminogenových „kringle“ domén by tedy mohlo blokovat toho spojení. Tyto výsledky jsou docela zajímavé, protože $\alpha_v\beta_3$ integrin je známý angiogenní aktivátor, ačkoliv není absolutně nezbytný pro angiogenezi, jelikož $\alpha_v\beta_3$ -knockautované buňky stále ukazují důležité znaky angiogeneze [108].

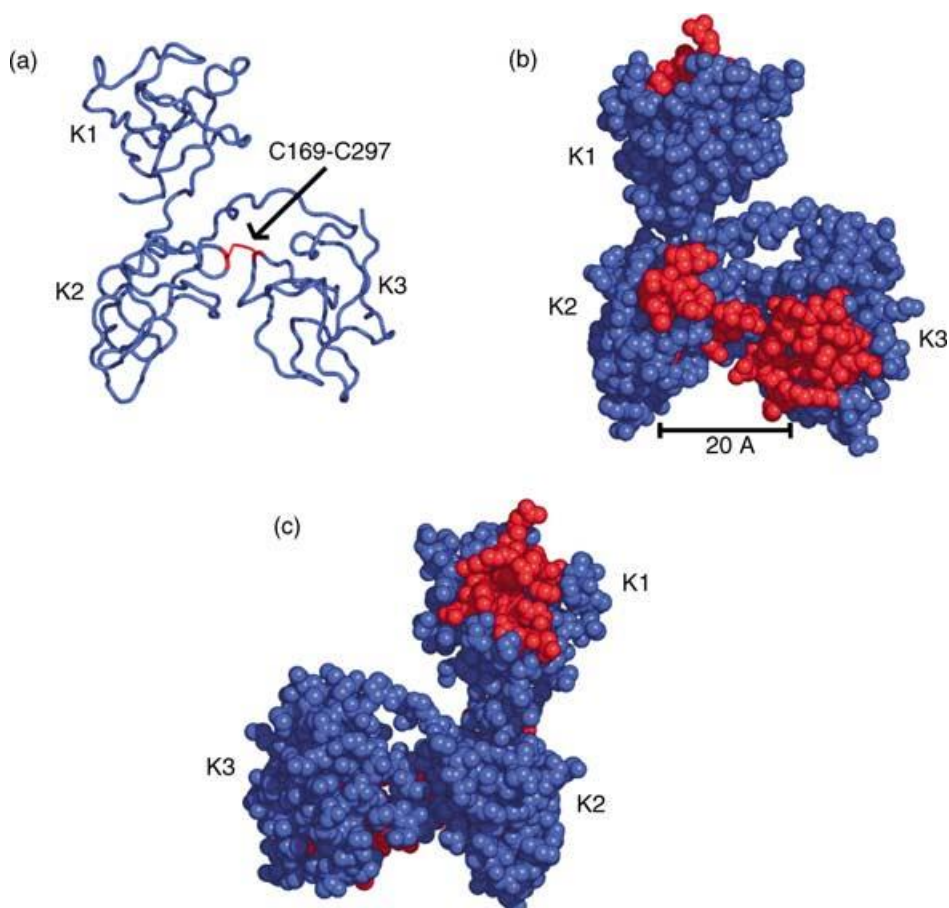
Byl stanoven ještě třetí potenciální cíl pro angiostatin. Angiomotin byl původně identifikován pomocí kvasinkového dvouhydridního systému („yeast two hybrid screen“) za použití placentální cDNA knihovny. Paradoxně, angiomotin se neobjevuje jako receptor na povrchu buněk, ani neobsahuje signální sekvenci pro sekreci. Nicméně se zdá, že se váže k angiostatinu na povrchu endotelových buněk. Angiomotin se skládá z konzervované domény ve tvaru svinuté cívky („coiled-coil“) a PDZ-vázající domény. Buňky obsahující angiomotin byly schopny vázat a internalizovat angiostatin, což vedlo k indukci aktivity fokální adhezivní kinasy (FAK). FAK reguluje buněčnou pohyblivost a na adhezi-závislé buněčné přežití a proteiny FAKs jsou zahrnuty v transportu protonů. Nezávisle na tom byl angiostatin dříve ukázán jako aktivátor FAK aktivity, což má možný výsledek v inhibici migrace a apoptosy. Nicméně, jen málo je známo o funkci angiomotinu [108].

Je to také první struktura plazminogenu K3, která je zajímavá sama o sobě a je jedna z velmi málo „kringel“ domén, neprojevujících afinitu pro C-terminální lysinová residua, nebo napodobování C-terminálního lysinu. „Kringel“ domény jsou kompaktní struktury, které prakticky nemají sekundární strukturu a drží pohromadě třemi kritickými disulfidovými

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

vazbami. Při porovnání všech do roku 2004 známých „kringle“ struktur se ukazuje, že všechny struktury jsou docela podobné se střední kvadratickou odchylkou ne větší než 0,1 – 0,2 nm. Jak je ukázáno v obrázku 8, tři „kringle“ domény angiostatinu se scházejí dohromady a tvoří trojúhelníkovou kulovitou strukturu. Jak je ukázáno v obrázku 8a, „interkringle“ disulfidová vazba mezi K2 residuem C169 a K3 residuem C297 významně přispívá k relativní orientaci K2 a K3, zatímco pozice K1 je poněkud omezená krátkým (tři residua) „interkringle“ peptiovým spojením mezi K1 a K2. Fixace vzájemné orientace K2 a K3 disulfidovým spojením není nicméně pro aktivitu angiostatinu požadována, jelikož narušení vazby má malý vliv na jeho antiproliferativní aktivitu. Zdá se, že mnoho interakcí mezi „interkringle“ peptidy a „kringles“ stabilizuje uspořádání ve struktuře. Nicméně neexistuje přímá interakce mezi žádnými třemi „kringle“ doménami, což zvyšuje možnost, že může mezi třemi doménami dojít k významnému pohybu. Ve skutečnosti struktura angiostatinu vázaná na peptid PAM-30 odvozeného od povrchového proteinu streptokoka PAM indikuje, že skutečně nastává signifikantní reorientace tří „kringle“ domén. Pohyb je poněkud omezený „interkringle“ disulfidovou vazbou mezi K2 a K3 [108].

Pozoruhodně přesná pozice K2 a K3 u lysin-vázajících míst (LBSs) vychází z relativní orientace „kringle“ domén v této struktuře. Ty vytváří spíše větší dutinu (2 nm v nejširším bodu) s dvěma LBSs na každé straně (Obr. 8b). Důležité je, že specifity LBSs K2 a K3 domén jsou poměrně odlišné, protože má K2 nízkou afinitu pro napodobování C-terminálního lysinu jako například EACA, kdy dochází k nejvíce specifické vazbě k 30-aminokyselin dlouhému peptidu nalezenému v PAM (plazminogen-vazající M-podobný streptokokální protein skupiny A - protein nalezený na povrchu bakterie *Streptococcus pyogenes*). 30-reziduí dlouhý helikální peptid z PAM (PAM-30) projevuje téměř identickou afinitu pro K2 v porovnání s proteinem plné délky, což indikuje, že jde téměř o jednu helikální otočku. Residuum glutamátu okupuje pozitivní konec LBS, zatímco residuum argininu negativní konec bipolárního LBS, čímž nahrazuje C-terminální karboxyl C-terminálního residua lysinu. Tato struktura ukazuje, že „kringle domény“ mohou vytvářet interakce s různými bipolárními proteinovými ligandy a výrazně rozšiřuje možné cíle pro „kringle“ interakci. Překvapivé je, že LBS doména K1, která má vysokou afinitu pro C-terminální lysinová residua je lokalizována na opačné straně molekuly vzhledem ke K2 a K3 (Obr. 8 b, c) [108].



Obrázek 8 - (a) struktura angiostatinu. „Ribbon“ struktura ukazující K1, K2 a K3 v modré barvě. „Interkringle“ K2-K3 disulfidová vazba skládající se z residua C169 domény K2 a residua C297 domény K3 je zobrazena červeně. (b) Čelní pohled „space-filling“ modelu angiostatinu. (c) Pohled na „space-filling“ model angiostatinu ze zadní strany. Lysin-vázající místo v každé ze tří „kringle“ domén je zbarveno červeně. Obrázek byl nakreslen v programu PyMOL a PDB1D 1KIO. Převzato z Geiger et al., 2004 [108].

2.1.4.2 Endostatin

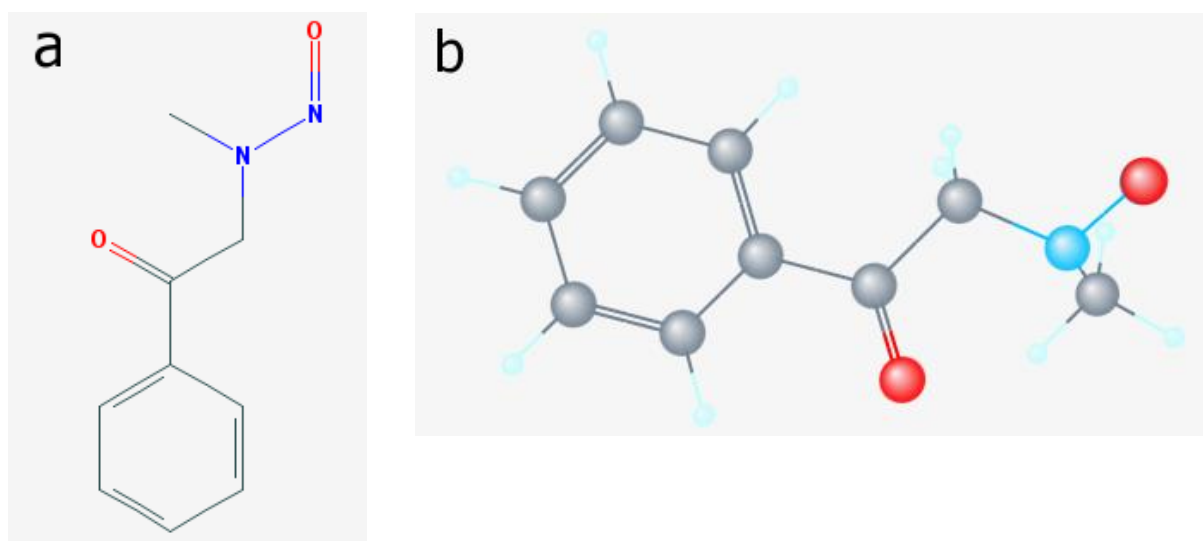
Endostatin je silný cytokin, který u endotelových buněk inhibuje migraci, vyvolává apoptosu a zastavuje buněčný cyklus [113].

Endostatin je 20 kDa velký vnitřní fragment karboxylového konce kolagenu XVIII. Byl objeven Michaelem O'Reillym ve Folkmanově laboratoři na základě Folkmanovy hypotézy mechanismu jak vysvětlit fenomén, že chirurgické odstranění určitých tumorů vede k rychlému růstu vzdálených metastáz. Tato hypotéza také iniciovala předešlé objevení angiostatinu [114] ve stejné laboratoři. Endostatin je první endogenní inhibitor angiogeneze identifikovaný v matrixovém proteinu [115].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Endostatin byl objeven použitím stejné strategie, která dříve vedla k objevení angiostatinu, tj. izolace antiangiogenního proteinu z moči myši s tumorovým ložiskem, u kterých jsou metastázy potlačeny, dokud není primární tumor chirurgicky vyjmut. Jeden z mechanismů účinku angiostatinu, který vysvětluje většinu jeho antiangiogenních funkcí je založen na jeho interakci s ATPasou na endotelovém povrchu. Druhým mechanismem je angiomotin. Pro endostatin nebyl mechanismus účinku na rozdíl od angiostatinu rozdělen do několika signálních drah. Od prvního reportu o endostatinu [116], bylo v mnoha publikacích zdůrazněno jeho široké spektrum antiangiogenního mechanismu účinku. Trvalá přítomnost genu pro endostatin v lidském genomu i v průběhu evoluce osvětluje jeho všudypřítomné působení. Endostatin se váže na $\alpha_5\beta_1$ ntegrin na endoteliu. Pro antiangiogenní aktivitu se endostatin jeví být závislý na vazbě k E-selektinu. Endostatin také blokuje aktivitu MMPs 2, 9 a 13 [115].

Endostatin způsobuje u endotelových buněk sníženou regulaci genů, které nějakým způsobem souvisí s růstem. Vliv endostatinu je obrovský. V lidských endotelových mikrovaskulárních buňkách je 12 % genů významně regulováno právě endostatinem. Endostatin potlačuje především angiogenezi patologickou a má malý, respektive žádný vliv na hojení ran, či reprodukci [115]. Struktura endostatinu je vyobrazena v obrázku číslo 9.



Obrázek číslo 9 – struktura endostatinu. (a) 2D struktura, (b) 3D konfomer. Převzato a upraveno dle databáze PubChem.

2.1.4.3 Thrombospondin-1

Dalším zástupcem je Trombospondin-1 (TSP-1), patřící do rodiny proteinů extracelulární matrix. Vazba TSP-1 na jeho receptor CD36 aktivuje sled intracelulárních dějů vedoucích k apoptose endotelových buněk [120, 121].

Trombospondin-1 obsahuje tři opakování typu 1 (TSRs), které zprostředkovávají připojení k buňkám, vazbu glykosaminoglykanu, inhibici angiogeneze, aktivaci TGF β a inhibici MMPs. Krystalová struktura TSRs byla uvedena v publikaci Tan et al., 2002 a odhalila novou, antiparalelní, třívláknovou složku skládající se ze střídavě skládaných vrstev tryptofanových a argininových residuí příslušných vláken ukotvených disulfidovými vazbami na každém konci. Přední strana TSR obsahuje pravotočivou spirálu, pozitivně nabitý žlábek, který může být „rozpoznávacím“ místem zprostředkovávajícím interakce mezi různými ligandy [122].

Dalšími silnými inhibitory angiogeneze jsou vasostatin, či s destičkami přidružený destičkový faktor-4 („platelet-associated platelet factor-4, PF4“). Oba tyto faktory byly používány dohromady jako jeden rekombinantní peptid ve vývoji lepšího antiangiogenního léku [123].

2.1.4.4 Vasostatin

Získání vasostatinu popsali ve své publikaci Pike et al., 1998. Ze supernatantu buněčné linie immortalizované virem Epstein-Barrové byl purifikován inhibitor endotelových buněk a identifikován jako fragment kalretikulinu. Purifikovaná rekombinantní NH₂-terminální doména kalretikulinu (aminokyseliny 1-180) inhibovala proliferaci endotelových buněk, ale ne buněk dalších linií a potlačovala angiogenezi *in vivo*. Tato NH₂-terminální doména kalretikulinu byla pojmenována vasostatin [124].

2.1.4.5 S destičkami přidružený destičkový faktor-4

PF4, neboli chemokinový (C-X-C motiv) ligand 4 (CXCL4) je 7,8 kDa protein syntetizovaný megakaryocyty a zabalený v α -granulích krevních destiček jako tetramerní komplex vázaný na serglycinové GAG (glukosaminoglykan) řetězce [125].

PF4 má ve vaskulatuře dvě důležité funkce. Proatherogenní roli a také antiangiogenní vlivy. Aktivita PF4 závisí, na rozdíl od jiných chemokinů vázajících se na specifické receptory na jeho neobvykle vysoké afinitě pro proteoglykany a další negativně nabitě molekuly.

Pro všechny biologické funkce PF4 je centrální vysoká afinita pro heparan sulfáty. Nicméně byly popsány další mechanismy, jako například přímá vazba růstového faktoru, aktivace isoformy chemokinového receptoru CXCR3B, která je přítomna v některých cévních buňkách, nebo vazba na „lipoprotein-related protein-1“. Navíc se PF4 váže také na integriny s afinitami podobnými molekulám matrixu. Tyto interakce mohou vysvětlovat vlivy PF4 ve zdravých a patologických tkáních. Nicméně mechanismy zahrnuté v aktivitě PF4 jsou komplexní a mohou záviset na dané tkáni a lokalizaci. Celkově je možno říci, že přestože je o PF4 známo hodně informací, jeho specifickou roli v ateroskleróze a angiogenezi je třeba ještě objasnit [126].

2.1.4.6 Osteopontin

Fosforylovaný glykoprotein osteopontin je zapojen v angiogenezi, růstu tumorů, jejich zvýšené invazivnosti a metastázování a také při hojení ran. Různorodá exprese tohoto glykoproteinu je spojena s více agresivními podtypy tumorů u rakoviny prsu [127].

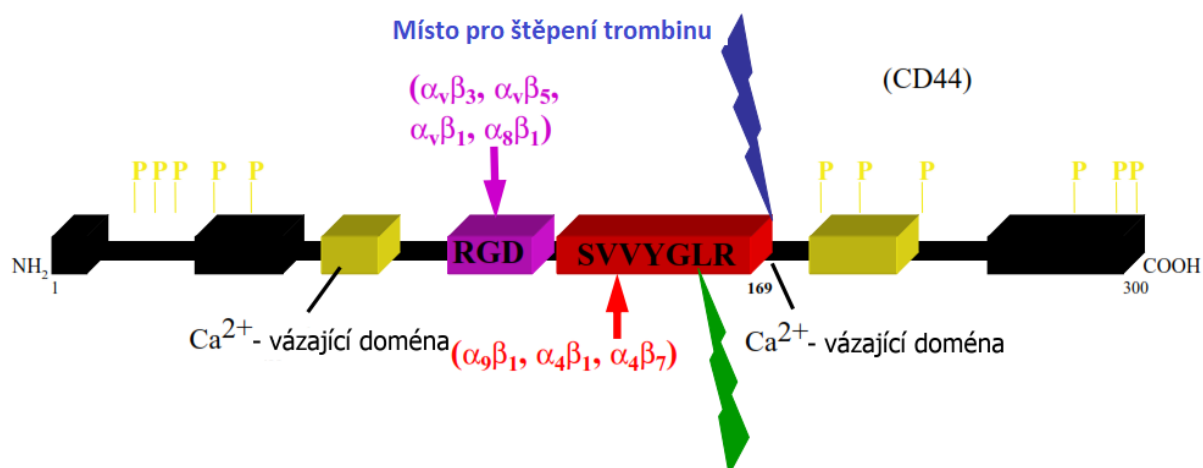
Osteopontin (OPN) je s kostmi asociovaný glykosylovaný fosfoprotein extracelulární matrix produkovaný několika typy buněk – osteoblasty, osteoklasty, imunitními, endotelovými a epitelovými buňkami i buňkami mimo kosti (kožními, ledvinnými a plicními). Různé buňky produkující v důsledku rozdílných post-translačních modifikací, tedy fosforylaci, glykosylaci, sulfataci a proteolýze osteopontin o molekulové hmotnosti od 41 do 75 kDa. Tato molekula díky tomu může mít strukturu a funkci specifickou pro určitý buněčný typ. Osteopontin hraje důležitou roli v různých normálních fyziologických procesech, jako je remodelace kostí, regulaci imunity, zánět a vaskularizace. Navíc bylo prokázáno, že je OPN zahrnut v karcinogenezi, kde má multifunkční aktivitu [128].

Dai et al. ve své studii ukázali, že OPN má cytoprotektivní účinky díky aktivaci PI3K/Akt dráhy s následnou nadregulací Bcl-xL a aktivací jaderného faktoru- κ B. OPN zvyšuje expresi VEGF skrze fosforylaci AKT a extracelulární signálem-regulovanou kinasu (ERK). Osteopontinem indukovaný VEGF aktivuje PI3K/Akt a ERK1/2 dráhu jako pozitivní zpětnovazebný signál. Blokování zpětného signálu anti-VEGF protilátkou, inhibitorem PI3-kinasy, nebo inhibitorem ERK může částečně inhibovat pohyblivost, proliferaci a tvorbu trubic endotelovými buňkami lidského pupečníku (HUVEC) indukovanou OPN, zatímco blokování signálu anti-OPN, nebo anti- α v β 3 protilátkou biologické vlivy OPN na buňkách HUVEC kompletně ruší. Zhodnocena byla navíc tvorba cév *in vivo*. Antiangiogenní efektivita anti-OPN protilátky *in vivo* je více efektivní než ta u anti-VEGF protilátky, která pouze blokuje zpětné

signály. Data z této publikace ukázala, že OPN zvyšuje angiogenezi přímo skrze PI3K/Akt- a ERK-zprostředkované dráhy s VEGF s funkcí pozitivně zpětnovazebného signálu. OPN může být hodnotným cílem pro vývoj nové anti-angiogenní terapie pro léčbu rakoviny [129].

2.1.4.6.1 Struktura osteopontinu

OPN má typické strukturální rysy, které jsou popsány a zobrazeny v obrázku číslo 10 [130].



Obrázek 10 – strukturální rysy OPN. Buněčné adhezivní domény jsou zobrazeny barevně. Známé specifické integrinové receptory pro každou adhezivní doménu jsou rovněž vyobrazeny barevně. Domény vázající vápník (Ca^{2+}) jsou vyobrazeny žlutě a další matrix vázající domény černě. Také jsou zobrazena fosforylační místa (P). Šipky indikují známá štěpící místa pro trombin a MMPs. Místo pro štěpení trombinu je *modře* a MMPs štěpící místo *zeleně* [130]. Převzato a upraveno dle Lund et al., 2009 [130].

2.1.4.7 Tkáňové inhibitory metaloproteinás

TIMPs (tkáňové inhibitory metaloproteinás, „tissue inhibitors of metaloproteinases“) jsou rodinou čtyř proteasových inhibitorů: TIMP-1, -2, -3, -4. Inhibují matrixové metaloproteinasy a mají funkci v potlačení metastáz [131].

Byly klonovány, purifikovány a charakterizovány 4 savčí TIMPs. Tyto sekretované proteiny jsou považovány za regulátory aktivity MMP během remodelace tkání. Jeden gen TIMP byl identifikován u *Drosophily* a jeho odstranění generuje fenotyp podobný tomu, jaký se nachází u integrinových mutantů, což indikuje, že má roli ve funkci extracelulární matrix ECM. Všechny čtyři savčí TIMPs mají mnoho základních podobností, ale vykazují charakteristické strukturální rysy, biochemické vlastnosti a expresní vzory. Každý TIMP

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

specifickou roli *in vivo*. Stejně jako u *Drosophily* jsou savčí geny TIMP vestavěny uvnitř genů v intronu genů pro synapsin [132].

TIMPs mají molekulovou hmotnost přibližně 21 kDa a jsou různě glykosylovány. Obsahují 6 disulfidových vazeb, třísmyčkovou N-terminální doménu a interagující třísmyčkovou C-subdoménu. Většina do roku 2002 objevených biologických funkcí těchto proteinů může být přisouditelná sekvencím uvnitř N-terminální domény, ačkoliv C-subdoména zprostředkovává interakce s katalytickými doménami některých MMPs a s hemopexinovými doménami MMP-2 a MMP-9. TIMPs jsou sekretované proteiny, ale mohou být nalezeny na buněčném povrchu v asociaci s membránově-vázanými proteiny; například TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4 mohou vázat MMP-14, což je membránový typ (MT) MMP. Je unikátní, že TIMP-3 je uzavřen na ECM vazbou k heparin-sulfát-obsahujícím proteoglykanům a možná chondroitin-sulfát-obsahujícím proteoglykanům. Všechny 4 TIMPs inhibují aktivní formy všech MMPs studovaných do roku 2002 a jejich vazebné konstanty jsou v nízkém pikomolárním rozsahu, ačkoliv je TIMP-1 slabý inhibitor MMP-19 a mnoha MT-MMPs. TIMPs nemají žádnou signifikantní aktivitu vůči astacinům, ačkoliv byla prokázána určitá aktivita TIMP-3 (a do určitého rozsahu i TIMP-1) proti ADAMs (disintegrin a metaeloproteinasa, „disintegrin and metalloprotease.“ TIMP-3 inhibuje ADAM 12 a ADAM 17 a agrekan-degradující enzymy ADAM-TS4 a ADAM-TS5 a TIMP-1 inhibuje ADAM 10. Disociační konstanty jsou zde v subnanomolárním rozsahu [132].

TIMPs potlačují aktivitu MMPs kritickou pro přestavbu ECM spojenou s fyziologickou i patologickou remodelací tkáně. Seo et al., 2003 se ve svém článku demontrovali, že TIMP-2 ruší angiogenním faktorem-indukovanou proliferaci endotelových buněk *in vitro* a angiogenezi *in vivo* nezávislou na inhibici MMP. Tyto efekty vyžadují $\alpha 3\beta 1$ integrinem-zprostředkované vazby TIMP-2 na endotelové buňky. TIMP-2 také indukuje snížení celkové aktivity proteinové tyrosin fosfatasy (PTP) spojené s podjednotkou $\beta 1$ integrinu, stejně jako disociaci fosfatasy SHP-1 z $\beta 1$. Působení TIMP-2 dále vede k doprovodnému zvýšení PTP aktivity spojené s tyrosin kinasovými receptory FGFR-1 a KDR. Jejich identifikace objevila neočekávaný, na MMP-nezávislý mechanismus pro inhibici proliferace endotelových buněk *in vitro* pomocí TIMP-2 a odhalila tak důležitou komponentu antiangiogenního vlivu TIMP-2 *in vivo* [133].

Tkáňové inhibitory metaloproteinasy byly původně charakterizovány jako inhibitory MMPs. Později však byl ukázán široký rozsah jejich funkcí, které jsou nezávislé na jejich MMP inhibičních vlastnostech. TIMP-3 je silný inhibitor VEGF-zprostředkované angiogeneze a neovaskularizace skrze jeho schopnost blokovat vazbu VEGF k receptoru VEGFR-2.

K identifikaci a charakterizaci antiangiogenní domény TIMP-3 byly provedeny strukturálně funkční analýzy a studie se systetickými peptidy použitím VEGF-zprostředkované vazby receptoru, signalizace, migrace a proliferace. Navíc byla zhodnocena schopnost TIMP-3 peptidů inhibovat CNV u myších modelů. Qi et al., 2013 demonstrovali, že antiangiogenní vlastnosti jsou vázány na COOH-terminální doménu TIMP-3 proteinu, který může blokovat vazbu VEGF specificky k jeho receptoru VEGFR-2, ale ne VEGFR-1 podobně jako u „wild-type“ proteinu plné délky. Syntetické peptidy odpovídající předpokládané smyčce 6 a oblasti ocasu TIMP-3 mají antiangiogenní vlastnosti jako bylo pomocí inhibice vazby VEGF k VEGFR-2, VEGF-indukovanou fosforylací VEGFR-2 a „downstreamovou“ signální drahou, stejně jako proliferací a migrací endotelových buněk v odpovědi na VEGF. Navíc bylo prokázáno, že intravitreální podání TIMP-3 peptidu může inhibovat velikost laserem-indukovaných choroidálních neovaskulárních lezí u myší. Tak byly identifikovány TIMP-3 peptidy jako účinné inhibitory angiogeneze a jejich potenciál pro terapeutické použití u nemocí se zvýšenou neovaskularizací [134].

2.1.5 Signální dráhy PI3K/Akt a ERK

Proces angiogeneze je kontrolován dvěma hlavními singálními drahami: PI3/Akt a ERK [129]. Proteinkinasa B (Akt) je důležitá signální molekula, která prostřednictvím aktivace jaderného faktoru (NF)- κ B ovlivňuje přežití a migraci endotelových buněk. [135, 136]. Je indukována VEGF a bFGF [137], navíc může zvyšovat expresi Bcl-2 proteinu, jehož prostřednictvím růstové faktory indukují buněčné přežití [138]. Dráha ERK je aktivována VEGF a FGF a je zapojena do regulace buněčné pohyblivosti a přežívání [139-141]. Pochopení mechanismu zahrnutého v angiogenních procesech může přispět k hledání potenciálních terapií proti rakovině [142, 143].

2.1.6 Blokace angiogeneze

Protože je angiogeneze potřebná pro růst maligních tumorů a tvorbu metastáz [144], její cílení je pokládáno za prospěšné pro léčbu a prevenci rakovinných onemocnění [145, 146]. Díky detailnímu studiu průběhu angiogeneze, které potvrzuje její důležitost pro růst tumorů, bylo objeveno mnoho terapeutických přístupů založených na jejím blokování [147]. Angiogenezi lze tedy považovat za vhodný terapeutický cíl a vzhledem k trvajícím rozsáhlému studiu tohoto procesu jsou zaručena nová efektivní cílená léčiva s vylepšeným terapeutickým indexem [15].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Na základě dosavadního výzkumu lze předpokládat, že terapie inhibitory nádorové angiogeneze bude mít pouze méně závažné nežádoucí účinky a v boji proti rakovině má proto jejich vývoj velký význam [11]. Studie také nepředpokládají vznik resistance k antiangiogenním látkám, nebo alespoň ve výrazně nižším rozsahu v porovnání s cytotoxickými chemoterapeutiky, obzvláště pokud jsou cíleny geneticky stabilní endotelové buňky [14].

Rozsáhlý výzkum v oblasti angiogeneze přinesl za poslední roky mnoho nových proangiogenních faktorů s přímým i nepřímým vlivem na nádorovou angiogenezi. Z hlediska dalšího bádání zůstává velmi zajímavou oblastí navrhování strategií pro cílení proangiogenních peptidů z důvodu léčby lidských chorob souvisejících s angiogenezí [15].

Výhodou oproti léčbě rakoviny přímým cílením rakovinných buněk je, že endotelové buňky pokrývají vnitřní část krevních cév, čímž jsou lépe dostupné pro farmaka distribuovaná krevním oběhem [11].

Nádorovou angiogenezi je vhodné potlačovat také díky jejím rozdílným vlastnostem ve srovnání s angiogenezí fyziologickou [11].

2.1.7 Biologický základ terapeutické angiogeneze

Postnatální růst krevních cév je zprostředkován třemi mechanismy: vaskulogenezí, angiogenezí a arteriogenezí. Vaskulogeneze je *de novo* tvorba vaskulatury ze specifického progenitoru, či kmenových buněk; nicméně je připisována prenatalnímu období a její role po narození je nejasná a hlavní rozsah tvorby krevních cév je zahrnut dalšími dvěma zmíněnými mechanismy. Tyto procesy na molekulární a buněčné úrovni se staly základními kameny terapeutické angiogeneze a stávají se zdrojem nových studijních objektů pro translační medicínu [148].

2.1.7.1 Angiogeneze: růst krevních cév řízený hypoxií

Angiogeneze je tvorba krevních cév *de novo*, ale v kontrastu s vaskulogenezí závisí na migraci, proliferaci a pučení již existujících endotelových (EB) buněk tvořících kapiláry. Kapiláry jsou malé cévy (8-15 μm) s chybějící *tunicou medií* odpovědné za většinu krevního zásobení tkání a výměnu O_2/CO_2 . Snížení množství tkáňového kyslíku indukuje angiogenní odpověď ve zdravém organismu, například při intenzivním cvičení, růstu tkáně atd., ale i při nemoci: v případě poškozené, nebo klesajícího dodávky v důsledku aterosklerotických lézí,

nebo anémie. Za normálních podmínek jsou kapiláry stabilizovány apokrinními a parakrinními podněty (osa Notch1, angiopoetiny, trombospondin, angiostatin, transformující růstový faktor (TGF)- β atd.), které vyvažují vliv proangiogenních cytokinů v blízkosti krevních cév (VEGFs, FGFs, HGF, PDGF). Hypoxie vychýlí tuto nerovnováhu směrem k angiogenním událostem, což je zprostředkováno senzitivním systémem citlivým O_2 na existujícím v různých buňkách zahrnujících samotné EB, buňky hladkého svalstva, pericyty a fibroblasty. Buněčná odpověď na hypoxii probíhá skrze systém hypoxií-indukovaných faktorů (HIFs) – skupinu heterodimerních transkripčních regulátorů kontrolovaných právě prolyl hydroxylasami citlivými na O_2 . Stručně řečeno, stabilita HIFs se drasticky zvyšuje v hypoxickém prostředí což vede v jejich vazbě na hypoxii-odpovídající elementy uvnitř promotérových oblastí genů zvyšujících jejich expresi. HIF-dependentní geny zahrnují rozsáhlé pole cytokinů stimulující proliferaci EB, pučení krevních cév a proto jsou značeny jako „angiogenní růstové faktory.“ Ty poslední zmíněné zahrnují rozpustné růstové faktory spojené s proliferací a diferenciací EB (kyselý FGF (aFGF), bazické FGF (bFGF), HGF, VEGFs) a cytokiny vázané k ECM a uvolněné během jejich štěpení. Tyto změny indukují proliferaci a migraci EB tvořících cévní pupen řízený tzv. „tip cell.“ Tato buňka následuje koncentrační gradient a produkuje MMPs a urokinasu ke štěpení ECM, uvolňuje růstové faktory a v podstatě tuneluje ECM a je následovaná „stalk buňkou,“ která tvoří novou kapiláru. Po vytvoření lumenu nastává normalizace krevního zásobení, což vede k vypnutí hypoxických podnětů, „tip cells“ ztrácí svůj fenotyp a proteolytický potenciál který sloužil k zahájení stabilizace mikroprostředí. Exprese TIMPs a indukce osy Dll4-Notch1 je následovaná znovuustanovením vyváženého stavu mezi pro- a antiangiogenními molekulami v tkáni opouštějící novou kapilárou tvořenou krevní cévu. Nicméně by mělo být zmíněno, že sled těchto událostí nenastává jako dokonale laděný mechanismus. „Stub“ větve jsou tvořeny a musí být vyjmuty, určité „tip cells“ pupeny nevytváří a zraní cévní síť zahrnuje disociaci některých napojení. Nakonec se pod vlivem stabilizujících signálů z obklopujících endotelových buněk, pericytů a stromálních buněk cévní lůžko vrací do normálního ustáleného stavu [148].

2.1.8 Metody a modely pro studium angiogeneze

K experimentálnímu testování angiogeneze jsou využívány různé *in vitro* a *in vivo* modely. Jak v *in vitro*, tak v *in vivo* studiích jsou jako angiogenní aktivátory často studované bFGF a VEGF [149].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Výběr vhodné metody pro studium angiogeneze je jednou z největších technických výzev. Existuje velké množství *in vitro*, *in vivo* a *in ovo* angiogenních metod. Na základě předchozích studií bylo prokázáno, že je pro přesnou identifikaci buněčných a molekulárních událostí při angiogenezi nezbytné použít kombinaci metod a nalézt kompletní rozsah účinků dané testované sloučeniny [150].

Následující metody jsou využívány ke kvantifikaci obrazu získaného z pozorování světelným mikroskopem:

- a) Krevní cévy, uzavřené v silikonovém kroužku položeném náhodně v ošetřené zóně, jsou manuálně spočítány.
- b) Binární obrazy cév jsou manuálně zakresleny, nebo jsou automaticky prahovány a jsou tedy určeny souhrnné parametry jako hustota cév v prostoru, délka cév, fraktální rozměr, nebo měření komplexity.
- c) Jsou určeny individuální parametry jako koncové body, počet zakreslených cév a délka radiálně uspořádaných kapilár během vaskulogeneze.

Poslední zmíněná metoda, která je kompletně automatická je vhodná k charakterizaci změn délky vaskularity. Ze skenovacího elektronového mikroskopu jsou k automatickému určení hustoty cév v prostoru a „pillar mean area“ použity tzv. „mercox cast images.“ Nicméně počet a střední průměr cév byly i v tomto případě určovány manuálně.

Mezi další metody patří:

- a) Kvantifikační metoda ELISA („enzyme linked immuno sorbent assay“) může být použita pro odhad angiogenních růstových faktorů. Tato metoda je provedena použitím specifického angiogenního protokolu. Nejčastěji jsou pro tuto studii použity 96- jamkové mikrolitrové destičky.
- b) Určení hemoglobinu v matrigelu („hemoglobin determination in matrigel plugs“) se používá zejména pro kvantifikace „matrigel plug assay.“ V této metodě jsou matrigely vyřezány z myši a zváženy. Poté jsou homogenizovány po dobu 5 – 10 minut na ledu, centrifugovány na mikrocentrifuze při 10 000 rpm po dobu 6 minut a supernatant je sesbírán pro měření hemoglobinu. Supernatanty jsou smíchány s Drabkinovým činidlem a hemoglobin ve vzorcích je kvantifikován kalorimetricky při 540 nm za použití spektrofotometru. Tato metoda byla jednoduchá a levná.

- c) Stanovení hustoty kapilár („capillary density estimation“). Dříve vyvinutý teoretický model Kroghova typu byl použit k odhadu hustoty kapilár v lidském skeletálním svalu na základě publikovaného měření využití kyslíku, arteriálního parciálního tlaku kyslíku a průtoku krve během těžkého cvičení. Model předpokládá, že je příjem kyslíku během těžkého cvičení limitován schopností kapilár doručit kyslík do tkání, takže je silně závislý na kompaktnosti kapilár, definované jako počet kapilár na jednotku průřezové oblasti svalů [150].

2.1.8.1.1 Buněčné modely pro *in vitro* studie

Endotelové buňky podstupují během procesu angiogeneze několik kroků. Nejprve dochází k rozrušení základní membrány, načež endotelové buňky migrují směrem k angiogenním podnětům, prolifерují pro vytvoření dostatečného množství buněk a nakonec se organizují do tubulárních struktur. Všechny tyto kroky mohou sloužit jako cíle inhibice neovaskularizace a být testovány *in vitro* [151].

Důležitým nástrojem pro *in vitro* studie angiogeneze, byly především dříve endotelové buňky. Nejvýznamějším modelem endotelových buněk jsou buňky lidského pupečníku (HUVEC). Přestože jsou tyto buňky využívány i v dnešní době, hledají se z důvodu, že nejsou tyto buňky imortalizované a po několika pasážích vymírají, nové alternativy [152]. Nahrazení endotelových buněk se uvažuje také z důvodu skutečnosti, že při pasážování endotelových buněk *in vitro* dochází ke ztrátě jejich normálních fyziologických vlastností, což vede k variabilitě ve výsledcích a může tak dojít k ovlivnění reprodukovatelnosti modelu [153]. Další nevýhodou je heterogenita endotelových buněk – existují jako mikro-vaskulární a makro-vaskulární, lišící se v morfologii, fyziologii a odpovědi na modulátory angiogeneze [153-155].

Vedle primárních endotelových buněk existují imortalizované linie endotelových buněk. Ty jsou obecně lépe charakterizované a stabilnější ve svých endotelových rysech než normální endotelové buňky. Mezi dobře charakterizované makro- a mikro-vaskulární linie endotelových buněk patří EA.hy926 a HMEC-1 [156].

Linie HMEC-1 je imortalizována stabilní transfekcí plazmidem obsahujícím dlouhý antigenní gen Viru Simian 40. Je používána v širokém spektru aplikací v rámci výzkumu endotelových buněk a vývoje léčiv [157]. Další imortalizovanou buněčnou linií endotelových buněk je telomerasou-imortalizovaná buněčná linie lidských neonatálních kožních mikrovaskulárních endotelových buněk („telomerase-immortalized human neonatal dermal microvascular endothelial cell line, TIME“) [152].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Jiná kategorie *in vitro* angiogenních testů je založena na schopnosti aktivovaných endotelových buněk narušit třídímní substráty [155], či schopnosti tkáňových explantátů zanořených uvnitř substrátu tvořit mikrocévy. Do kategorie tkáňových explantátů jsou řazeny krysí nebo myší aortové kroužky („aortic rings“), prasečí krkavice („porcine carotid artery“), kuřecí aortový oblouk („chick aortic arch“), disk placentární žíly („placental vein disc“) a fetální myší kostní explantát („fetal mouse bone explant“) [158].

In vitro testy však mají určité nedostatky. Zahrnují totiž použití kultivovaných endotelových buněk množených v jedné kultuře. Navíc jsou buňky ve stavu proliferace, což může vadit při testování látek, obzvláště pokud jsou cíleny proangiogenní faktory [153-155].

Výhodou *in vitro* metod hodnocení je jejich provedení v krátkém čase. Pokud je *in vitro* metoda kvantifikována důkladně a správně, může vést k přesnému a spolehlivému výsledku. *In vitro* testy poskytují cenné počáteční informace. K získání maximálně spolehlivých výsledků mohou být provedeny rozmanité testy [150].

Metody za použití buněčných kultur („cell culture assays“)

Jak již bylo řečeno, důležitým nástrojem pro stadium angiogeneze *in vitro* jsou stále endotelové buňky. Naopak použití endotelových buněk pro rychlé a objektivní testování pro- a antiangiogenních látek *in vivo* je vzácné, protože aplikace lidských endoteliálních buněk k založení lidské kapilární sítě u myší je jedinečný a technologicky náročný proces. ProQinase kombinuje tyto rysy v jejich na sferoidu-založené *in vivo* angiogenní metodě, čímž dovoluje rychlé *in vivo* testování a screening protilátek a látek. HUVEC jsou sice běžně užívané lidské endotelové buňky pro *in vitro* angiogenní metody (jsou jednoduše izolovatelné perfúzí pupečnickové žíly enzymem kolagenasou, nebo trypsinem a jsou úspěšně pěstovány v kultuře od roku 1973), nicméně, protože proces angiogeneze zahrnuje namísto makrovaskulatury mikrovaskulaturu, jsou tyto buňky vzdáleny od ideálních kvůli základnímu rozdílu v rodině/linii a jejich použití může vést k neadekvátním a chybným odpovědím [150].

Jedním z problémů u metod využívajících endotelové buňky jsou fenotypické rozdíly v endotelových buňkách, které nejsou vždy stejného druhu. Rozdíl může být snadno pozorován mezi endotelovými buňkami velkých cév (např. EB pupečnickové žíly) a endotelovými buňkami mikrovaskulárního původu (např. lidské dermální mikrovaskulární EB). Dalším omezením je skutečnost, že *in vitro* endotelové buňky mohou vykazovat změněné vlastnosti, například když porovnáme klidové podmínky s podmínkami kultury, ve které se buňky pohybují,

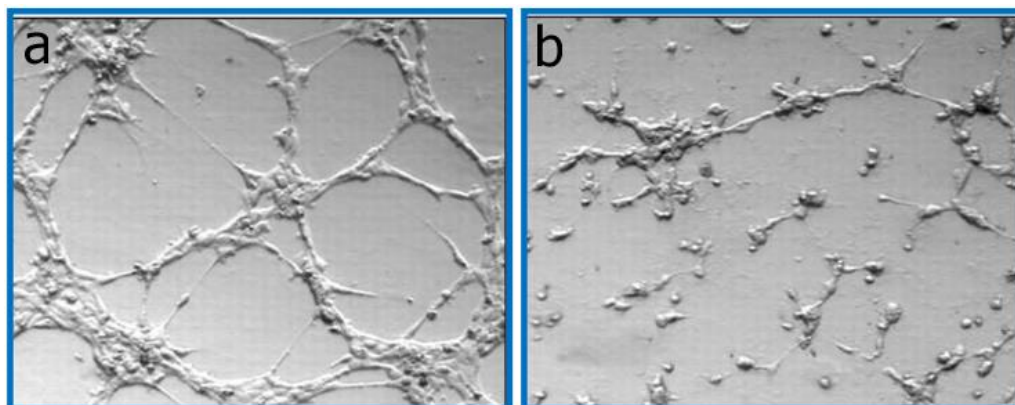
nebo při porovnání způsobů přichycení k různým matricím. Proto, přestože jsou *in vitro* metody analýzy rychlé, snadno posouditelné a spolehlivě reprodukovatelné, je omezena studie komplexních fyziologických komunikací, která se odehrává *in vivo* [150].

Navíc je problematické hodnocení sekundárních vlivů studovaných látek (které působí na ne-endotelových buňkách, jež následně produkují chemické látky mající vliv na EB). *In vitro* metody by tedy měly být vykonávány za použití EB z více než jednoho zdroje, nebo, což je důležitější, být následovány jednou, či více *in vivo* angiogenními metodami [150].

Metoda sledující tvorbu šňůrovitých útvarů („cord formation assay“)

Jedná se o poměrně jednoduchou a snadno proveditelnou metodu, ve které se využívá matrigel bez růstových faktorů. Endotelové buňky jsou inkubovány po dobu 12 hodin v růstovém médiu s obsahem 1% FBS. Poté jsou buňky trypsinizovány a rozsuspendovány ve stejném médiu a rozptýleny na matrigel (po ošetření testovanou substancí). Poté je materiál pipetován do jamek 48-jamkové destičky a po dobu 30 minut polymerizován při 37°C [150].

Po 18 hodinách je tvorba šňůrovitých útvarů v každé jamce monitorována použitím inverzního mikroskopu. Délka šňůrovitých útvarů vytvořených z buněk je měřena pomocí elektroforézy a výsledky jsou interpretovány jako velikost, tvar a růst trubic. V obrázku 11 je porovnán vzhled trubic v kontrolním vzorku a trubic po působení inhibitoru tvorby trubic.



Obrázek 11 – Porovnání vytvoření šňůrovitých útvarů v kontrolním vzorku a vzorku po působení +ve inhibitoru. (a) kontrola, (b) +ve inhibitor. Převzato a upraveno dle Khan et al., 2014 [150].

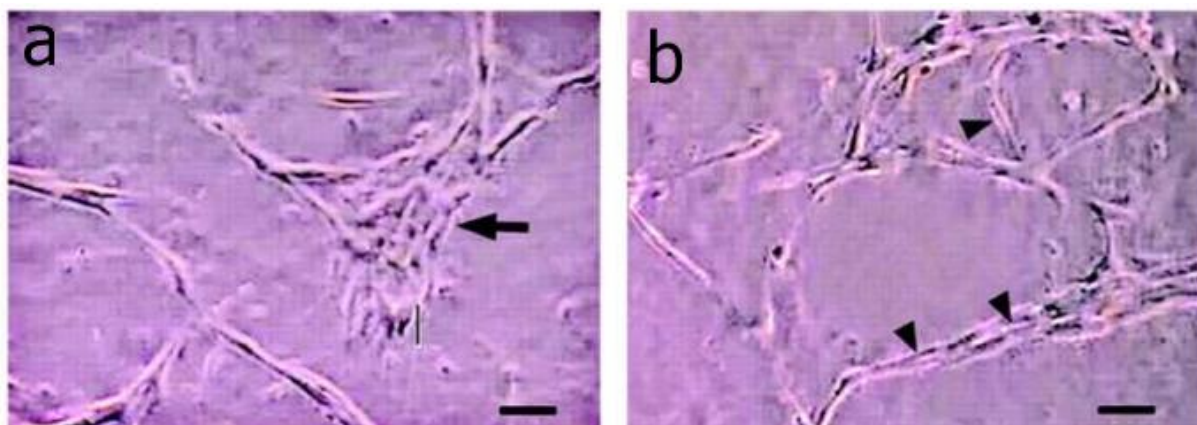
Metoda založená na tvorbě trubic („tube formation assay“)

Rychlým způsobem hodnocení angiogeneze je měření schopnosti endotelových buněk tvořit tří-dimenzionální struktury, které dávají vzniknout tvorbě trubic. Metoda je založena na měření

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

schopnosti endotelových buněk používaných v subkonfluentních hustotách s vhodnou podporou ECM tvořit kapilárám podobné struktury (trubice). Metoda je využívána k nalezení schopnosti látek narušit či bránit tvorbě trubic. Látky, které jsou schopny zabránit tvorbě mohou být použitelné u mnoha nemocí, jako je například rakovina, u které tumory spouští a podněcují formaci nových nových cév k tomu, aby získaly nutriety pro svůj růst [150].

Klíčové výhody této metody jsou krátká doba kultivace, snadná nastavitelnost, přizpůsobitelnost k vysoce výkoné analýze a kvantifikovatelnost. Její hlavní nevýhodou je pak variabilita schopnosti tvořit trubice mezi různými skupinami endotelových buněk, což samozřejmě není akceptovatelné k získání konzistentních a spolehlivých dat. Obrázek 12 porovnává vzhled trubic bez a při působení VEGF [150].



Obrázek 12 – Metoda založená na tvorbě trubic u buněk HUVEC. (a) Vzhled trubic bez působení VEGF, (b) Vzhled trubic při působení VEGF. Převzato a upraveno dle Khan et al., 2014.

Metoda založená na buněčné migraci („cell migration assay“)

Existuje několik testů, které mohou být použity k určení migrační odpovědi endotelových buněk na faktory indukující, či inhibující angiogenezi. Tato metoda je rovněž použitelná pro testování inhibičních faktorů jako je endostatin, nebo TNP 470 a faktory zvyšující pohyblivost, jako například FGF-2, nebo VEGF a díky své jednoduchosti umožňuje využití mnoha rozdílných endotelových a ne-endotelových buněčných typů ke kontrole pro specifitu pozorované odpovědi [150].

Metoda založená na buněčné proliferaci („cell proliferation assay“)

Proliferační studie jsou založeny na počítání buněk, inkorporaci tymidinu, (nebo) imunohistochemickém barvení pro proliferaci, (nebo) buněčné smrti [150].

Želatinová zymografie („gelatin zymography“)/Metoda založena na matrixových metaloproteinách („matrix metalloproteinase (MMP) assay“)

Želatinová zymografie je nejcitlivější metoda k detekci aktivity obou želatinas, ovšem její použití je spojeno s kvantifikačními problémy. Aktivity matrixových metaloproteinů myokardiální tkáně jsou měřeny za použití SDS-PAGE gelů [150].

Langendorffův model izolovaného srdce („Langendorff isolated heart model“)

Tato metoda je příkladem *in vitro* modelu ligace koronární arterie. Tento postup může být proveden použitím izolovaného puřem perfundovaného modelu srdce („isolated buffer perfused heart model“) [150].

Metody založené na pěstování orgánů („organ culture assays“)

V angiogenezi nejsou zahrnuty pouze buňky endotelové, ale její součástí jsou i obklopující buňky/orgány. Tato skutečnost vede k vývoji novějších metod hodnocení angiogeneze, které jsou označovány jako metody pěstování orgánů [150].

Metoda využívající kroužky aorty („the aortic ring assay“)

Angiogeneze může být dále hodnocena pěstováním kroužků myši aorty ve třídimenziálních kolagenových gelech s určitými modifikacemi metody původně popsané pro krysí aortu [150].

Metoda za použití oblouku kuřecí aorty („the chick aortic arch assay“)

Tato metoda reprezentuje hlavní modifikaci metody využívající krysí kroužky aorty. Původně byla vyvinuta pro jednoznačný účel testování thalidomidu (u kterého bylo již předtím prokázáno, že má omezené vlivy u hlodavců, ale silné vlivy na kuřecí embrya) [150].

2.1.8.1.2 *In vivo* modely angiogeneze

Proces angiogeneze *in vivo* nezahrnuje pouze klidové endotelové buňky, ale také interakce endotelií s dalšími typy buněk, jako jsou pericyty, buňky hladkého svalstva, fibroblasty, makrofágy a nádorové buňky [153-155].

In vivo je zaveden model CAM (chorioallantoová membrána) k měření počtu nově tvořených krevních cév okolo disků ošetřených angiogenním faktorem [159]. Jinou široce užívanou metodou je „Matrigel Plug Assay,“ kdy se myši C57BL/6 podkožně naočkují matrigelem s obsahem angiogenního faktoru. Hodnocení probíhá formou nepřímé kvantifikace funkční tvorby nových krevních cév měřením obsahu hemoglobinu v kuličkách („plugs“) matrigelu [160, 161].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Jako obdoba této metody může být použit test pro stanovení tumorem vyvolané angiogeneze, kdy je novotvorba cév detekována v okolí intradermálně očkovaných tumorových buněk [162]. Všechny tyto angiogenní experimentální nástroje mohou být užitečné pro prověřování antiangiogenní aktivity fytochemikálií, rostlinných extraktů a látek [149].

Provádět *in vivo* testy není jednoduché a ve srovnání s testy *in vitro* jsou náročnější na čas. Komplikovanější je rovněž proces kvantifikace. Testování pomocí *in vitro* metod předchází provedení metod *in vivo*, které využíváme, pokud chceme získat komplexnější výsledky [150].

Nejstarší *in vivo* metody zahrnují přípravu difúzních komor vyrobených s filtry Millipore, stejně jako různé další techniky za použití komor navržených k vizuálnímu monitorování postupu neovaskularizace implantovaných tumorů. Histologická pozorování dokonce poskytují kompletnější informace jde-li o *in vivo* angiogenní studie [150].

Vylepšené techniky pro monitorování průtoku krve Dopplerem, či radiologické přístupy rozšiřují informace dostupné ze standardních histologických pozorování. Různé typy *in vivo* angiogenních metod zahrnují například „Sponge Implantation Assay“, „The Corneal Angiogenesis Assay“, „Wound Healing Assay“ a „Dorsal Air Sac Model.“ [150].

Metoda implantace houbovitého útvaru („sponge implantation assay“)

„Sponge implantation model“ byl optimalizován a přizpůsoben k charakterizaci esenciálních komponent a jejich rolí při tvorbě krevních cév za různých fyziologických a patologických podmínek. Jako přímý důsledek výhod genetické manipulace poskytly zdroj pro vymezení mechanismu regulujícího hojení spojené s implantáty myší modely (tj. knockouty, SCID („severe combined immunodeficient“), holé myši). Nicméně rozdíly ve tvaru, velikosti a kompozici těchto houbovitých útvarů („sponges“) mohou znesnadnit porovnání. Navíc mohou implantáty těchto houbovitých útvarů způsobit nespecifické imunitní odpovědi, což může samo o sobě vést k angiogenní odpovědi [150].

Metoda za použití matrigelové ucpávky („matrigel plug assay“)

„Matrigel plug angiogenesis assay“ je jednoduchá *in vivo* technika sloužící k detekci tvorby nových krevních cév v transplantovaných gelových ucpávkách - „plugs“ u nahých myší. Matrigelová matrix je odvozena převážně z Engelbroth-Holm-Swarmova myšího sarkomu a její kompozice je podobná proteinům základní membrány. Matrigel může indukovat diferenciaci různých buněčných typů jako prsních epitelových buněk, hepatocytů a endotelových buněk. „Matrigel plug assay“ se stala metodou volby pro mnoho studií zahrnujících *in vivo* testování angiogeneze. Tato metoda umožňuje preciznější vizualizaci

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

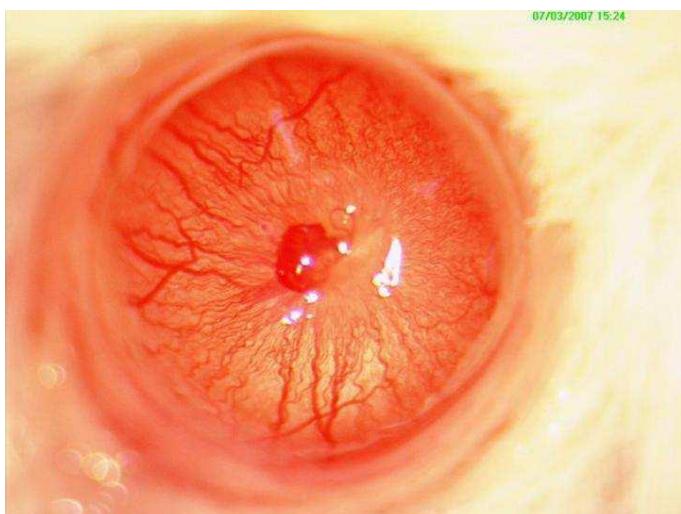
angiogenního procesu a poskytuje přesné informace. Není zapotřebí histologické pozorování a protokoly analýzy obrazu vedou k fotografické dokumentaci (obrázek 13) [150].



Obrázek 13 – „Matrigel plug method.“ Převzato z Khan et al., 2014 [150].

Angienní metoda za použití rohovky („corneal angiogenesis assay“)

Během procesu tvorby nových kapilár může být určena role různých buněk a růstových faktorů použitím „corneal angiogenesis assay.“ Původní metoda byla vyvinuta pro králičí oči, ale později byla upravena pro myši. Základ této metody je zavedení angiogenního induktoru (tumorové tkáně, buněčné suspenze, růstového faktoru) do vaku rohovky k produkci vaskulárního růstu z limbální makulatury v okolí. „Cornea assay“ má výhodu hodnocení nově tvořených krevních cév, protože je rohovka na začátku avaskulární. To je charakteristická vlastnost této metody. Nesprávné použití metody spolu s nedostatkem důkladného hodnocení generuje nesouvisající, matoucí a dokonce špatné výsledky (Obr. 4) [150].



Obrázek 14 – „Corneal angiogenesis assay.“ Převzato z Khan et al., 2014 [150].

Metoda využívající hojení ran („wound healing assay“)

Jednoduchá, méně drahá a první navržená metoda založená na buněčné migraci do rány vytvořené v monovrstvě buněk [150].

Model hrudního vzduchového vaku („dorsal air sac model“)

„The dorsal air sac model“ je používán k hodnocení *in vivo* vlivů látek proti angiogenní odpovědi spouštěné rakovinnými buňkami. Tato myšlenka byla původně prezentována Algirem [163] a postup vyvinut Selyem pomoci monitorování vaskularizace tumorových štěpů [164]. Tato metoda je relativně jednoduchá pro testování, ovšem měl by být dán pozor na to, aby nedošlo k poškození externí vrstvy, ke které je komora umístěna, protože by mohlo dojít k produkci falešných výsledků. Metoda poskytuje kontinuální neinvazivní monitorování vaskulárních sítí *in vivo* po dlouhou dobu a také pomáhá vysvětlit fyziologické vlastnosti nových krevních cév [150].

Metoda za použití ryby „Zebrafish“ („Zebrafish assay“)

„Zebrafish“ (*Danio rerio*) je tropická sladkovodní ryba. Je používána jak modelový systém pro studie vývojové biologie a objevování nových léčiv. Tato ryba se postupně dostává do použití pro studie angiogeneze, z důvodů některých unikátních vlastností vývoje krevních cév, jako například dorsální aorty, zadní kardinální žíly, sub intestinální žíly a vnitřní segmentální cévy v rybím embryu. „Zebrafish“ produkuje tisíce potomků za týden, což zvyšuje dostupnost experimentálních objektů ve velkém měřítku pro důvody výzkumu při nízké ceně [150].

Ischemický model zadní končetiny („hind limb ischemia model“)

Je pozorováno, že se krevní cévy mohou za nepříznivých podmínek či podnětů zlepšit a změnit ke kompenzaci krevního zásobení tkání. Při zachování této teorie vyvinuli různí vědci model ke studiu angiogeneze a arteriogeneze. Pro tento účel používají výzkumníci ischemický model zadní končetiny králíka. Je to zvířecí model, ve kterém je vytvořena ischemie ligací femorální arterie [150].

Model děložního sarkomu („uterine sarcoma model“)

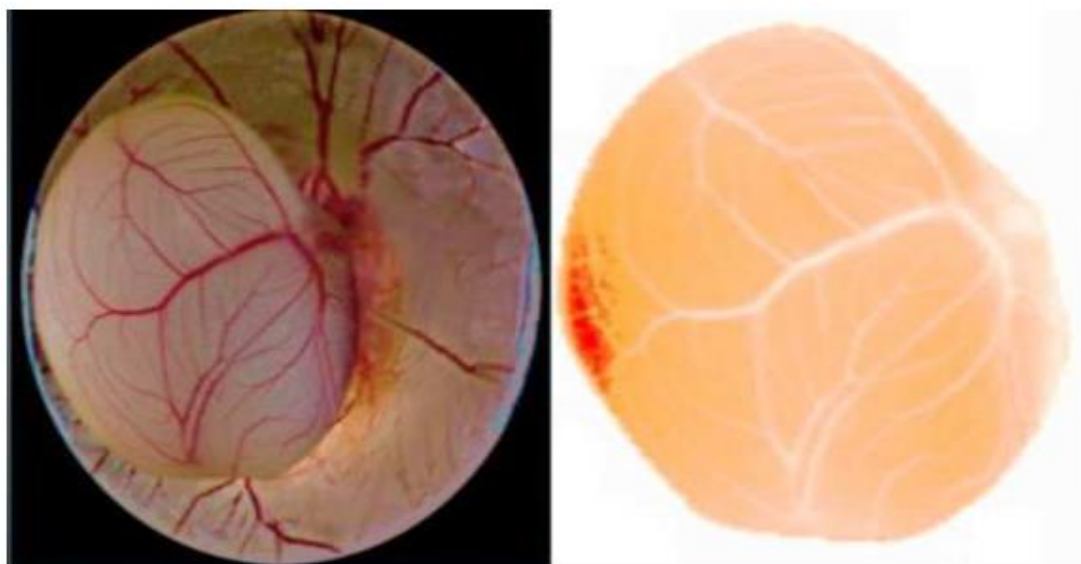
Na základě histologie, mohou být děložní sarkomy rozděleny na 4 subtypy: endometriální stromální sarkomy, karcinosarkomy, adenosarkomy a děložní leiomyosarkomy (ULMS). Děložní karcinomy můžeme v telě nalézt pouze v děloze. Yevgeniya a jeho kolegové vyvinuli geneticky upravený myší tumorový model, kdy jsou u samic myši vytvořeny tumory dělohy. Tento tumor vlastní stejnou histologii jako lidské ULMS. Tato myš je navržena se specifickými

genetickými modifikacemi které mění expresi onkogenů, nebo tumor supresorových genů [165].

2.1.8.1.3 Metody hodnocení *In ovo*

Metoda za použití kuřecí chorioallantoové membrány („chicken chorio-allantoic membrane (CAM) assay“).

Tato metoda je rychlá, technicky jednoduchá a levná. Model používaný v této metodě je velmi nápomocen k pozorování vývoje embrya, protože jeho realizace je nemožná v systémech jakým je systém savčí. Vývoj pohyblivého kuřecího embrya a změny nastávajících ve výživném žloutku jsou za pomoci CAM modelu jednoduché k manipulaci (Obrázek 15). Použití tohoto modelu je tak úspěšné pro výzkumné účely z důvodu tvorby srdce a neurohumorální srdeční kontroly růstu. Základní mechanismy fetální kardiovaskulární kontroly jsou analogické u kuřat i savců [150].



Obrázek 15 – vyobrazení metody CAM. Převzato z Khan et al., 2014 [150].

2.1.8.1.4 Shrnutí k angienním metodám a modelům

Během posledních let se stalo evidentním, že angiogeneze hraje centrální roli v patogenezi různých onemocnění. Může být detegováno mnoho angienních růstových faktorů, obzvláště VEGF. Nicméně, navzdory současným snahám na poli angiogeneze, je zde stále neadekvátní množství znalostí ohledně mechanismů regulujících komplexní dynamický proces vývoje krevních cév. Tato skutečnost může být překonána uvedením sofistikovaných *in vivo* a *in vitro*

modelů. To by umožnilo v budoucnu vyvinout efektivní antiangiogenní léčebné strategie pro různé terapie [150].

Přestože došlo k objevu a pokroku v oblasti léčby angiogenních onemocnění (především rakoviny) u několika látek, slibná inhibiční aktivita v preklinickém hodnocení *in vitro*, *in vivo* a v některých případech dokonce tumorové regresi selhala ve II/III fázi klinických zkoušek. Tento rozpor výsledků mezi preklinickými a klinickými testy demonstruje potřebu náročných preklinických testů jak *in vitro*, tak *in vivo* za použití vhodných modelů [150].

In vitro testy jsou výhodné, protože jsou rychle proveditelné a poskytují dotatečný prostor pro kvantifikaci, ale musí být posuzovány s extrémní opatrností. Přinášejí kritická data a jsou esenciálním prvním krokem pro ověření hypotézy. Pro získání všech benefitů z *in vitro* testování by v rámci jednoho experiment mělo být provedeno různých testů. *In ovo* „angiogenesis assay model“ („CAM assay“) je převážně používán jako pilotní metoda pro většinu studií hodnotících angiogenezi [150].

Pro pochopení a interpretaci vlivů konkrétního testovaného materiálu na proces angiogeneze je povinné použít více než jeden typ *in vitro* metody k vyřešení odlišných kroků angiogenní dráhy, využití odlišných zdrojů EB a poté více než jedna *in vivo* metoda k ujištění, že výstupy získané *in vitro* jsou v souladu s výsledky *in vivo*, kde mají určitý podíl v procesu angiogeneze i další buňky a proteiny ECM [150].

2.2 Apoptosa

Apoptosa je aktivní formou buněčné smrti nastávající jako odpověď na různé látky, včetně protirakovinných chemoterapeutik [166].

Je to organizovaný proces [167], jehož rozhodujícími faktory jsou jednak proteiny rodiny kaspas, a také zástupci Bcl-2 rodiny [168, 169]. Je charakterizovaná typickými změnami v morfologii buňky, jako je kondenzace chromatinu, fragmentace jádra a pyknóza (zmenšení buněčného objemu) [170].

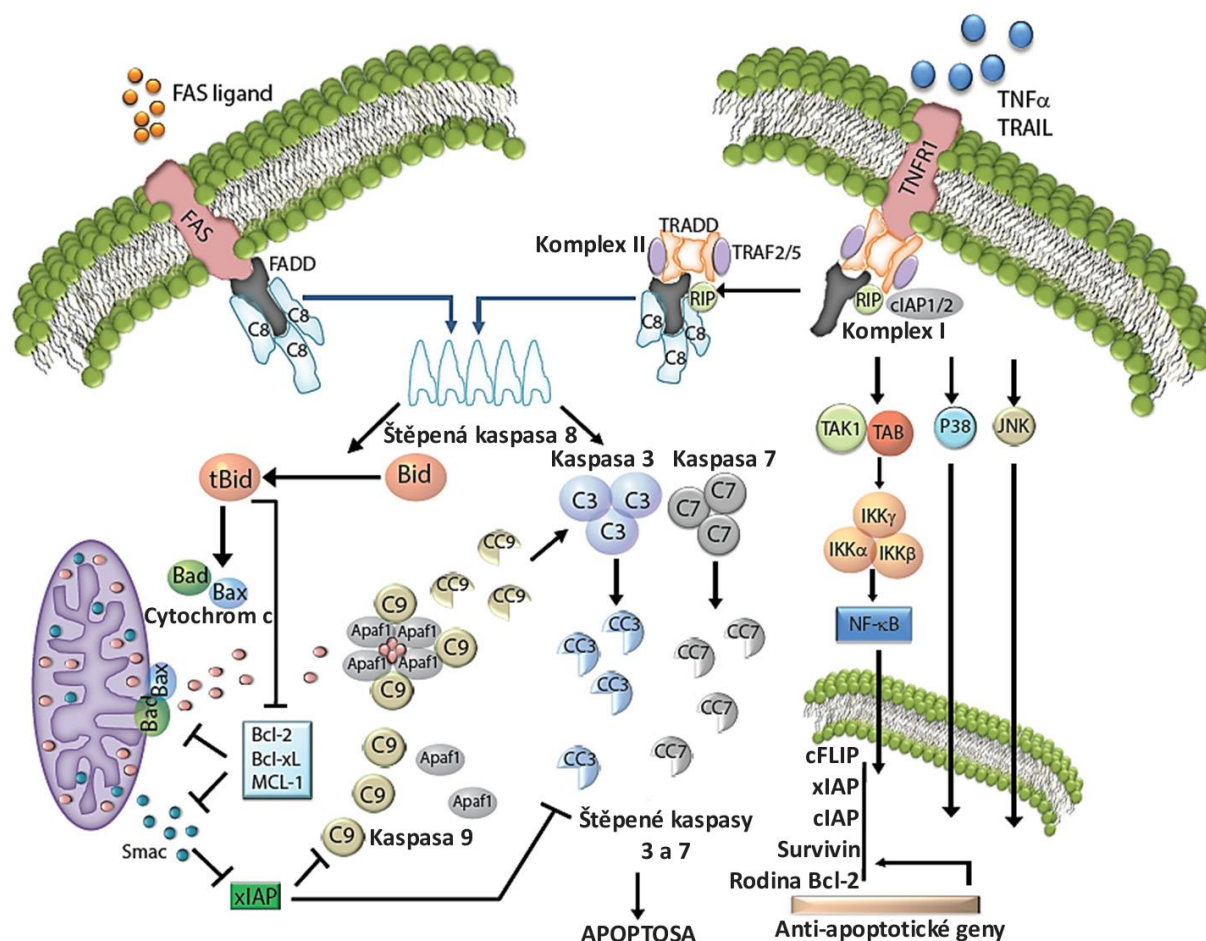
Procesy jako aktivace kaspas, štěpení DNA a proteinů a modifikace povrchu membrány, vedoucí k rozpoznání apoptotické buňky a jejímu pohlcení fagocyty, patří ke změnám biochemickým [171].

Apoptotické buňky jsou naprogramovány tak, aby po přijetí specifického podnětu došlo k jejich destrukci [167]. Jejím narušením dochází k nerovnováze mezi přežitím a smrtí buněk, což může mít za následek vznik rakoviny [172].

Rakovinné buňky jsou schopny se určitými mechanismy apoptose vyhnout a cílení za účelem spuštění apoptosy rakovinných buněk má terapeutický význam [172].

2.2.1 Dráhy vedoucí k apoptose

Apoptosa může být spuštěna dvěma hlavními mechanismy – vazbou „death“ ligandů na „death“ receptory ve vnější („extrinsic“) dráze, či mitochondriálními molekulami s cytotoxickými účinky, které spouští vnitřní („intrinsic“) „mitochondriální“ dráhu [173]. Tyto dráhy se sbíhají k aktivaci řady cystein aspartyl-specifických proteas (kaspas), které štěpí klíčové buněčné proteiny a zničí tak buňku (Obr. 16). Vzhledem k nežádoucím účinkům aktivace kaspas je důležité, že tyto dvě dráhy zůstávají v každém kroku úzce regulovány [172].



Obrázek 16 – Apoptotické dráhy u rakoviny. Upraveno dle Koff et al., 2015 [172].

FAS, TRAIL nebo TNFα aktivují „death“ receptorovou dráhu. Jsou možné dva signalizační mechanismy. Ligandy TRAIL nebo FAS podněcují interakci receptoru FAS s FADD a kaspasou-8, čímž dochází k vytvoření komplexu DISC. TNFα podporuje přechodné navázání TNF receptoru 1 (TNFR1) s TRADD, TRAF2, TRAF5, cIAP1/2 a RIP, které tvoří signální

komplex I. Tento komplex spouští mnoho „downstreamových“ signálů, jako je NF- κ B, JNK a p38, které podporují přežití indukci exprese antiapoptotických genů, což je například cFLIP, běžný inhibitor TNFR signalizace. Nicméně, postranlační modifikace komplexu I, jako je například deubikvitinace RIP, může podporovat oddělení RIP1 a TRADD z komplexu. Ty se pak váží k FADD a kaspase-8/-10, čímž se vytvoří apoptotický komplex II. Tvorba DISC, nebo komplexu II vyvolává dva mechanismy vedoucí k buněčné smrti: přímou indukci popravních (executioner) kaspas-3 a -7 v typu I buněk a štěpení Bid (tBID), který zapojí vnitřní apoptotickou dráhu. V té pak podněty, jako poškození DNA, nebo přítomnost tBID, vyvolají interakci mezi BAX a BAKk a navodí permeabilitu vnější mitochondriální membrány (MOMP). Výsledné zvýšení MOMP vede k uvolnění cytochromu c a Smac do cytoplazmy. K podpoře auto-aktivace kaspasy-9 a následné aktivaci popravních kaspas rekrutuje cytochrom c APAF1 a kaspasu-9. K zamezení inhibice kaspasy-9 a -3 interaguje Smac s XIAP [172].

2.2.2 Resistence nádorových buněk vůči apoptose

Nepatřičné spuštění apoptosy ohrožuje přežití buňky, proto je v případě eukaryotických buněk vysoce regulovaným procesem. U rakoviny může dojít k dysregulaci, a to jak ve vnitřní, tak ve vnější dráze. Rakovinné buňky vyvíjejí za účelem vyhnoutí se tomuto úzce regulovanému programu buněčné smrti různé mechanismy kontrolou hladiny anti-apoptotických molekul, nebo inaktivací proapoptotických „cell death“ součástí. Některé mechanismy jsou specifické jen pro konkrétní typy tumorů, zatímco jiné jsou využívány různými typy rakovinných buněk. K pochopení toho, jak se rakovinné buňky vyhýbají buněčné smrti, došlo s rozmachem genomových analýz, které umožnily zkoumat mutace přispívající k této resistenci [172, 174].

2.3 Buněčný cyklus

Buněčné dělení se skládá ze dvou následných procesů, charakterizovaných především replikací DNA a segregací replikovaných chromozomů do dvou separovaných buněk. Původně bylo buněčné dělení rozděleno do dvou částí: mitózy (M), což je proces dělení jádra; a interfáze, která je vsuvkou mezi dvěma M fázemi. Mitóza se skládá z profáze, metafáze, anafáze a telofáze. Pod mikroskopem je možné vidět jak se interfázové buňky jednoduše zvětšují, ovšem rozdílnými technikami je možné odhalit, že se interfáze skládá z fází G1, S a G2 (zhodnoceno v publikaci Norbury and Nurse, 1992 [175]). S fáze je specifickou částí interfáze kdy dochází k replikaci DNA. Předchází jí fáze G1, během které se buňka připravuje na syntézu DNA, G2 fáze, která po S-fázi následuje, je přípravou pro vlastní mitózu. Rozdělení

na G1, S, G2 a M fázi je tedy obvyklým členěním standartního buněčného cyklu. Buňky v G1 fázi mohou před DNA replikací vstoupit do stavu dormance označovaného jako fáze G0. G0 fázové buňky zahrnují hlavní část nerostoucích, neproliferujících buněk lidského těla [176].

Buněčný cyklus je důležitý biologický děj. V normálních buňkách probíhá pod řízenou regulací, zatímco u transformovaných a neoplastických buněk dochází k aberacím či deregulaci. Cílení deregulovaného buněčného cyklu a jeho modulace různými přírodními i syntetickými látkami je zajímavou oblastí, jejímž cílem je kontrola neomezeného růstu a proliferace rakovinných buněk. Obrovské množství experimentálních studií přesvědčivě ukázalo, že mnoho fytochemikálií zastavuje nekontrolovaný průběh buněčného cyklu u nádorových buněk [177].

2.4 Detekce apoptosy a buněčného cyklu

Porozumění mechanismu apoptosy je důležité vzhledem k její roli během lidského vývoje a při onemocněních, jako jsou například choroby srdce a rakovina. Výběr metod pro studium apoptosy závisí na daném experimentu. Při studiu morfologie apoptotických buněk je nejvíce informativní metodou elektronová mikroskopie. Může být ale použita i mikroskopie fluorescenční, nebo mikroskopie využívající bílého světla. Je-li však zapotřebí měření velkého počtu buněk, je nejlepší metodou detekce průtokovou cytometrií. Světelná mikroskopie a mikrofluidní zařízení jsou snadnými a všestrannými metodami pro potřeby monitorování buněk po dlouhou dobu. Pomocí Western blottingu může být sledována přítomnost proteinů v apoptotických buňkách. Pokud je objektem studia DNA, „DNA ladder assay“ může poskytnout informace o rozsahu degradace DNA [178].

DNA fragmentace mezi nukleosomy je jedním z charakteristických rysů apoptosy. Protože jsou během barvení buněk ve vodném roztoku DNA fragmenty o nízké molekulové hmotnosti extrahovány, mohou být apoptotické buňky určeny z histogramů četnosti obsahu DNA jako buňky se zlomkovitým („sub-G1“) obsahem DNA [179].

Průtoková cytometrie je technikou vhodnou k buněčné analýze, jelikož umožňuje měřit velká množství buněk a parametrů [178]. Zároveň existuje soubor průtokově cytometrických technik pro pozorování změn v buňkách podstupujících apoptosu [180-183]. Navíc může být použita, mimo jiné, k testování aktivity kaspas, štěpení DNA či membránové dynamiky [178].

Protože jsou některé přístupy indukující apoptosu „cell cycle“ specifické a všechny určitým způsobem buněčný cyklus rozruší, hodnocení vztahu mezi buněčným cyklem a apoptosou může mít velkou výhodu. Lze totiž přímo určit fázi buněčného cyklu, ze které byla apoptosa spuštěna [184].

2.4.1.1 Metoda Riccardiho a Nicolettiho

Metoda Riccardiho a Nicolettiho z roku 2006 využívá propidium jodid (PI) pro barvení jádra. PI je fluorogenní látka schopná vázat se stechiometricky na nukleové kyseliny [185-187]. Emise fluorescence je úměrná obsahu DNA v buňce za předpokladu, že byla odstraněna RNA. Apoptotické buňky barvené PI vytvářejí při analýze na průtokovém cytometru široký hypodiploidní (sub-G1) pík. Tento pík může být snadno rozlišen od úzkého píku buněk s normálním (diploidním) obsahem DNA v červených fluorescenčních kanálech [188].

2.5 Přírodní látky

Sekundární metabolity mohou být na základě jejich chemické struktury a drah, kterými jsou syntetizovány, rozděleny do různých skupin. Spolu s alkaloidy a terpenoidy tvoří největší a nejvíce studovanou skupinu bioaktivních přírodních látek fenolické sloučeniny [189].

Obrovská strukturní rozmanitost biologických zdrojů a přírodních sloučenin, které produkují, je velkou výhodou při objevování nových terapeutických přístupů [190].

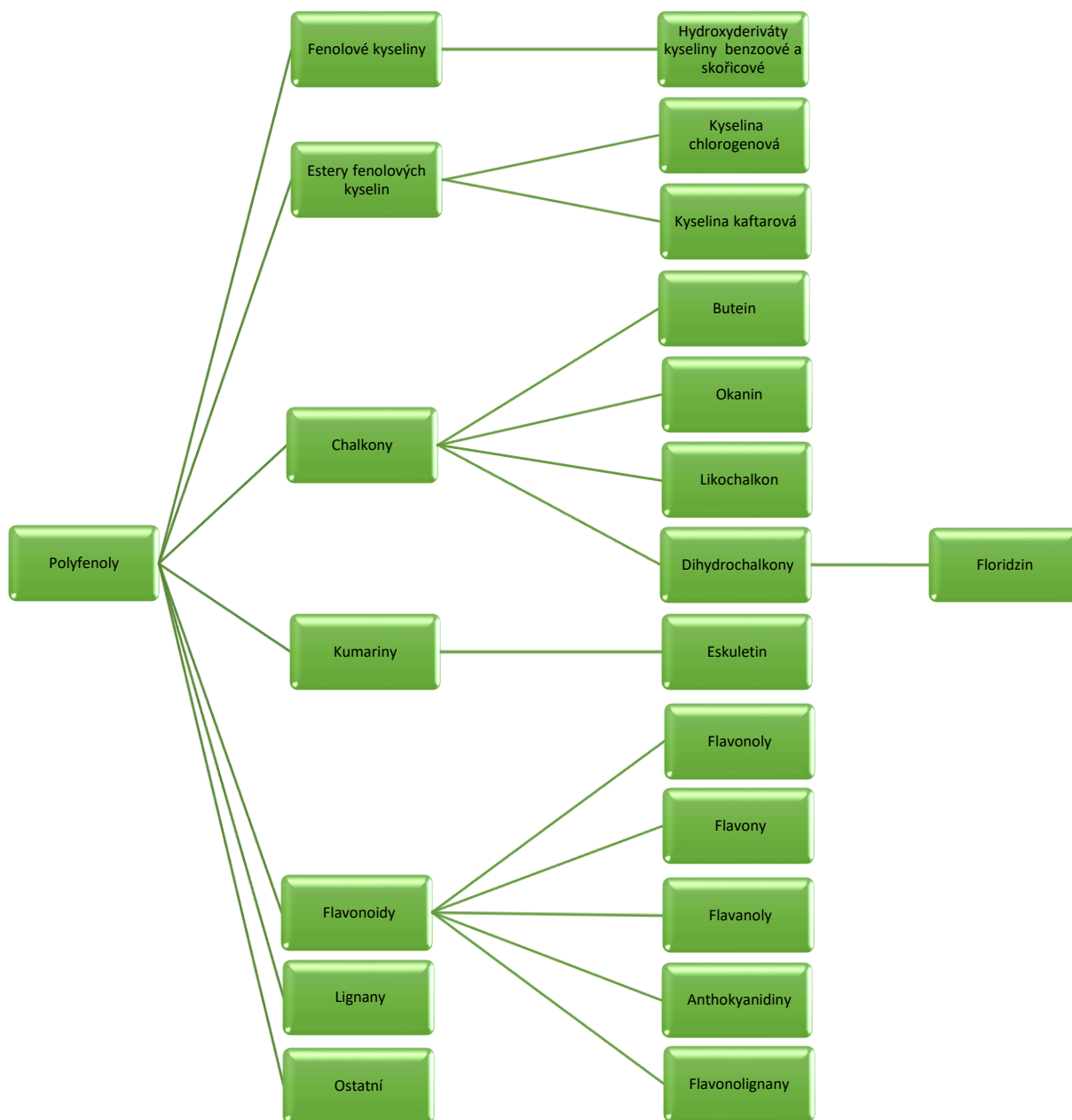
2.5.1 Polyfenoly

2.5.1.1 Vznik, struktura a klasifikace polyfenolických látek

Mezi fenolické látky se řadí velké množství sloučenin. V lidské stravě – ovoci, zelenině, obilovinách či nápojích – bylo identifikováno více než 8000 těchto látek [191]) odvozených především z prekurzorů tvořených fenolopropanoidovou drahou [192].

Polyfenoly jsou polyhydroxylované fytochemikálie sdílející společné chemické struktury jako jsou například konjugované uzavřené kruhy a hydroxylové skupiny [193]. Pro polyfenoly je typický výskyt více než jednoho aromatického kruhu (fenolová jednotka), nebo stavebního kamene v molekule [194]. Na základě jejich chemické struktury a orientace řady navzájem vázaných fenolových kruhů mohou být klasifikovány do různých skupin [195]. Obecně mohou být fenolové látky rozděleny na jednoduché fenoly a polyfenoly.

V obrázku 17 je uveden přehled nejvýznamějších polyfenolů nacházejících se v rostlinách [194].



Obrázek 17 - Přehled nejvýznamějších rostlinných polyfenolů. Upraveno dle Vacek, et al. 2010 [194].

2.5.1.2 Výskyt polyfenolů

V rostlinných zdrojích se mohou polyfenoly vyskytovat v podobě volných molekul (aglykony), ve formě konjugátu (obvykle jako glykosidy), nebo dokonce jako oligomery a polymery – například proanthokyanidiny, lignany či lignin [194].

2.5.1.3 Biologické vlastnosti polyfenolů

Fenolické sloučeniny mají široký rozsah biologických vlastností a důvodem je velká strukturální rozmanitost [196, 197].

Díky schopnosti modulovat metabolické a buněčné signální dráhy vlastní fenolické sloučeniny antioxidantní [198, 199], anti-proliferativní [200, 201], pro-apoptotické [202, 203], anti-angiogenní [204, 205] a protizánětlivé vlastnosti [206, 207].

Také mohou ovlivnit aktivitu různých enzymů a dalších funkčních proteinů [208].

Biologické vlastnosti polyfenolů jsou připisovány především antioxidantním vlastnostem jejich fenolických skupin. Zatímco zablokování fenolické/fenolických skupin(y) vede k pozměnění aktivity, prokonjugování systému nenasycenými vazbami, vhodná esterová vazba, nebo přítomnost většího množství propojených kruhů jsou spojeny s výraznějšími aktivitami [209-211].

Polyfenoly se řadí mezi antioxidanty a vykazují mnohé protektivní účinky: působí proti reaktivním formám kyslíku a dusíku (ROS a RNS) [195], chrání před UV zářením a vlivem různých environmentálních emisí či patogenů [191, 212]. V epidemiologických studiích byl prokázán pozitivní vliv dlouhodobé konzumace pokrmů bohatých na polyfenoly u kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění, diabetu, rakoviny, ale i mnoha dalších nemocí, například diabetu, hypertenze, astmatu a rovněž pozitivní vliv proti infekcím a stárnutí [195].

Polyfenoly obsažené ve stravě mají mnoho známých buněčných, molekulárních a biochemických typů působení – například imunosupresivní, antivirotické, antiangiogenní či protizánětlivé. Dále mají schopnost inhibovat lékovou resistenci, indukovat apoptosu, zastavují buněčný cyklus a mají vliv na genomovou stabilitu [195].

Tyto látky cílí na signální molekuly, zahrnující růstové a transkripční faktory, cytokiny, enzymy a geny regulující apoptosu a významně tak ovlivňují zánět, apoptosu, angiogenezi a autoimunitní onemocnění [195].

Díky apoptose jsou odstraňovány potenciálně zhoubné, mutované buňky a tento proces je tak jedním z nejsilnějších způsobů ochrany před rakovinou [213]. Indukce apoptosy rakovinných buněk je tedy nesmírně důležitým terapeutickým cílem v léčbě rakoviny [190].

Je známo, že polyfenoly jsou schopny potlačovat tvorbu nádoru částečně spuštěním apoptosy [214, 215]. Polyfenolové sloučeniny jako například resveratrol, epigallokatechin

gallát (EGCG) či vanilloidy, mezi které patří kapsaicin a kurkumin, mohou apoptosu vyvolat u různých buněčných typů, například leukemických, rakoviny tlustého střeva, epidermoidních, prostatických, transformovaných průduškových epitelových a gliomových [216-219].

Různými způsoby v závislosti na jejich koncentraci, buněčném systému, typu či stádiu patologického procesu jsou polyfenoly schopny přímo interagovat se specifickými kroky a/nebo proteiny regulujícími apoptosu a výsledný efekt tak může být jak pro- tak antiapoptotický [220].

2.5.1.4 Flavonoidy

2.5.1.4.1 Struktura a třídění flavonoidů

Mezi flavonoidy, nejzastoupenější a nejrozmanitější skupinu polyfenolů, je řazeno okolo 6000 látek sdílejících společnou základní strukturu tvořenou dvěma šestiuhlíkatými aromatickými kruhy spojenými tříuhlíkatým můstkem, často vytvářejícím další kruh. Jsou nejvíce zastoupenými polyfenoly lidské stravy a na základě změn základní struktury mohou být rozděleny do několika podskupin – viz Obr. 18 [221-223].

2.5.1.4.2 Biologické vlastnosti flavonoidů

Sekundární metabolity ze skupiny flavonoidů jsou dnes hojně zastoupeny ve stravě a mají potenciálně prospěšné biologické vlastnosti [224].

Nízkomolekulární flavonoidy jsou v přírodě široce distribuovanou různorodou skupinou látek [166] s již poměrně dlouho známými protizánětlivými, antioxidačními, antialergickými, antivirovými či protirakovinnými vlastnostmi [222, 225, 226]. Protirakovinná aktivita byla u těchto látek prokázána v nedávných studiích pro mnoho lidských rakovinných buněčných linií i tumorových štěpů [166]. Další významné biologické aktivity flavonoidů zahrnují schopnost navodit apoptosu, zastavit buněčný cyklus či antiproliferační, antiangiogenní a antioxidační účinky [227].

2.5.1.5 Lignany

2.5.1.5.1 Struktura a třídění lignanů

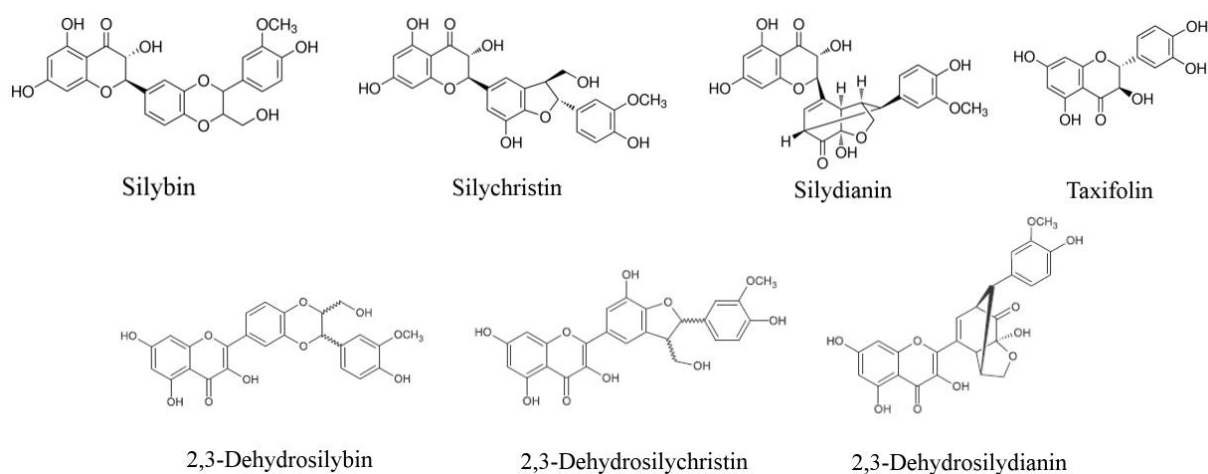
Lignany jsou přírodní látky tvořené dvěma fenyylpropanoidovými jednotkami (C_6C_3) spojenými oxidativním spážením. Můžeme je rozdělit na tzv. konvenční a nekonvenční. Tyto skupiny

jsou biogeneticky příbuzné, ovšem nekonvenční lignany nesou rysy, které u konvenčních nebyly pozorovány. Mezi nekonvenční lignany patří například již zmíněné flavonolignany [228], které jsou z nekonvenčních lignanů nejvíce studovány, především z důvodu jejich různorodých farmakologických aktivit [229].

2.5.1.6 Flavonolignany

2.5.1.6.1 Rysy, klasifikace a objasnění struktury flavonolignanů

Flavonolignany tvoří malou podtřídou flavonoidů zahrnující struktury vytvářené spojením flavonoidní části s lignanem (fenylpropanoidem) [230].



Obrázek 18 – Znázornění nejznámějších flavonolignanů obsažených v silymarinu.

Základní struktury flavonolignanů byly určeny brzy po objevení flavonoliganu silybinu a to především díky rozsáhlým chemickým přeměnám a degradačním reakcím. Tyto základní struktury byly později dále modifikovány [228].

K jednoznačnému určení absolutní struktury flavonolignanů vedla společně s klasickými chemickými reakcemi a syntetickými přístupy analýza komplexních spektroskopických dat [231, 232].

2.5.1.6.2 Ostropestřec mariánský a jeho složky

Flavonolignany jsou široce rozšířeny a nejbohatším zdrojem této skupiny látek jsou semena ostropestřce mariánského [*Silybum marianum* (L.) Gaert., Asteraceae]. Ostropestřec mariánský je také prvním známým zdrojem látek z této skupiny a je používán už od starověku v terapii akutních i chronických onemocnění jater [229]. Zdrojem flavonolignanů je i rostlina *Hydnocarpus wightiana* [228, 230].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Flavonolignany izolované ze semen ostropestřce mariánského byly charakterizovány, hodnoceny z hlediska jejich medicínských vlastností a uvedeny na farmaceutický trh pod názvem „Silymarin“ [233].

Nezvyklá struktura flavonolignanů a jejich zajímavé biologické aktivity vedly k důkladnému chemickému zkoumání různých částí rostliny *S. marianum*. Bylo vyizolováno mnoho sloučenin s podobnými strukturálními rysy [228].

Nejstudovanějším flavonolignanem je hlavní biologicky aktivní složka surového extraktu ostropestřce (silymarinu), silybin [230, 234-236]. Vedle silybinu jsou součástí silymarinu i další flavonolignany [isosilybin, silychristin, silydianin, 2,3-dehydrosilybin], či flavonoidy taxifolin a kvercetin a okolo 20–30 % neidentifikovaných polymerních fenolových komponent [235]. V obrázku 19 jsou vyobrazeny sktruktury nejvýznamnějších látek obsažených v silymarinu a 2,3-dehydrosilybin. Šipky vyznačují místa, ve kterých dochází k modifikaci galloylací.

Flavonolignan silybin ($C_{25}C_{22}O_{10}$), izolovaný ze semen *Silybum marianum* Gaertn. byl prvním nekonvenčním lignanem. Poprvé byl prokázán Pelterem a Hänselem v roce 1975 díky obsáhlým spektroskopickým analýzám silybinu, jeho derivátů i různých degradačních produktů [229, 234].

2.5.1.6.2.1 Biologická aktivita flavonolignanů ostropestřce mariánského

V případě několika flavonolignanů byly prokázány hepatoprotektivní a potenciálně chemopreventivní účinky [228].

2.5.1.6.2.1.1 Silymarin a silybin

Při prevenci a léčbě jaterních onemocnění, nebo jako protijed proti hepato- a mykotoxinům se využívá různých přípravků, jejichž aktivními komponentami jsou silybin či silymarin. Silymarin i samotné složky v něm obsažené vykazují mnoho prospěšných aktivit spojených nejen s jejich hepatoprotektivním, ale i antioxidantním působením [235]. *In vitro* studie dokládají jejich cytotoxické [237], chemoprotektivní [238], hypocholesterolemické [239, 240], kardioprotektivní [240, 241], neuroaktivní a neuroprotektivní aktivity [240, 242]. Potenciální protirakovinná aktivita silymarinu a silybinu byla prokázána na základě jejich chemoprotektivního efektu [240].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Silymarin nevykazoval během farmakologického testování a klinického použití žádné nežádoucí vedlejší účinky či škodlivé lékové interakce [243]. Je považován za prostředek alternativní medicíny a v roce 1969 byl formálně schválen jako hepatoprotektivní lék (pod názvy FlavobionTM, LegalonTM). Od té doby se stal pro léčbu jaterních onemocnění komerčně dostupný ve více než 100 zemích [244, 245].

Schopnost silymarinu chovat se jako protijed, jeho antifibrogenní, membránu stabilizující, syntézu proteinů spouštějící a signál vyvolávající vlastnosti mohou být příčinou jeho komplexního hepatoprotektivního působení [244].

Pokud vezmeme v potaz farmakokinetiku, má silymarin nízkou biodostupnost je-li podáván orální cestou a je nedostatečně rozpustný ve vodě. Je to způsobeno jednak neefektivní absorpcí ve střevě a také zvýšeným metabolismem při prvním průchodu játry po jeho absorpci; tyto dva mechanismy snižují krevní koncentraci a následně příchod do cílového orgánu. Nicméně je toto omezení efektivně překonáno díky zavedení komplexace s fosfatidylcholinem, který má vyšší absorpci, a nových silybinin glyko-konjugátů (gluko-, manno-, galakto- a lakto-konjugátů). Komplexy s fosfatidylcholinem i konjugáty mají vysokou rozpustnost ve vodě a jsou silnými antioxidanty. Zvýšená absorpce takovýchto látek vedla k posouzení bezpečnosti silymarinu a jeho terapeutického použití. Jeho zvýšená snášenlivost byla demonstrována toxikologickými studiemi na zvířatech, kterým byl silymarin podáván po dlouhou dobu, zatímco další studie na lidech určily jako nejběžnější vedlejší účinky při dlouhodobém použití a použití ve vysokých dávkách bolesti hlavy a svědění. Při podávání silymarinu nebylo nikdy uvedeno úmrtí, či život ohrožující vedlejší účinky. Přestože je silymarin velmi dobře tolerován, je nezbytné poukázat na několik případů vědeckých důkazů v literatuře, které demonstrují potenciální škodlivé účinky: Když bylo v první fázi klinického testování podáváno pacientům s rakovinou prostaty 13 g silybinu denně, došlo k hyperbilirubinemii a zvýšení alanin aminotransferasy. Navíc by měly být vzaty v úvahu možné vedlejší účinky odvozené z vlivu na estrogenní signalizaci, (funkce potenciálně použitelné dokonce pro terapeutické účely) a na arylové uhlovodíkové receptory [246].

Doposud získané vědecké poznatky dovolují pochopit mechanismus účinku skrze který silybin vykonává svou aktivitu interakcí s různými tkáněmi. U silybinu je jasná jeho schopnost modulovat zánět a apoptosu, což společně s jeho antioxidantní silou tvoří klíčové body vedoucí k jeho použití u různých patologických stavů. Silybin působí skrze vypínání prozánětlivých signálů odvozených z aktivace NF- κ B, interleukinu (IL)-1, IL-6 a granulocytárního-makrofágového kolonii stimulujícího faktoru (GM-CSF). Navíc silybin indukuje apoptosu

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

skrze modulaci cytoplazmatické hladiny bcl-2-like proteinu 4 (Bax) a proteinů B-buněk lymfomu 2 (Bcl-2), uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspasy 3 a 9. Antioxidační aktivita je zprostředkována jeho schopností vychytávat volné radikály a působit jako inhibitor lipidové peroxidace, jak je demonstrováno *in vitro* a *in vivo* [246].

Silymarin je také modulátor estrogenní signalizace, insulinový senzitizer, regulátor intracelulárního transportu léčiv a má účinky antikarcinogenní, antidiabetické (skrze signální regulaci perixosomového proliferací aktivovaného receptoru γ (PPAR- γ)), antifibrotické a choleretické [246].

Velký počet účinků, které silymarin vlastní vysvětluje důvod proč bylo za účelem pochopení efektivity u různých patologických stavů provedeno mnoho vědeckých studií. V případě revmatických onemocnění, jako je revmatoidní artritida působí silymarin protizánětlivě inhibicí migrace a aktivace neutrofilů v kloubech. U různých onkologických onemocnění, jako jsou rakovina prostaty, rakovina děložního hrdla, hepatocelulární karcinom, rakovina močového měchýře a rakovina plic redukuje silymarin buněčnou vitalitu a neovladatelnou buněčnou replikaci. Díky jeho detoxikační síle a rozpustnosti ve vodě, což umožňuje intravenózní podání, je používán jako hepatoprotektivní léčivo u otrav acetaminofenem (paracetamolem), arsenem, chloridem uhličitým, butyrofenony, fenothiaziny a toxiny z *Amanita phalloides*. U hypercholesterolemie, silymarin/silybin inhibuje 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A (HMG-CoA) reduktasu, čímž snižuje syntézu cholesterolu. V případě neurologických a psychiatrických onemocnění působí tato molekula skrze vypínání zánětlivých signálů, což vede k degeneraci dopaminergních neuronů v případě Parkinsonovy nemoci a vylepšuje klinický obraz u obsedantně-kompulzivního onemocnění. Významná je role rostlinných látek v případě chronického onemocnění jater, což v dnešní době reprezentuje jeden z nejdůležitějších zdravotních problémů u zhruba 10 % světové populace. Proto jsou rostlinné látky nejvíce studovaným tématem ve vědecké komunitě. U chronických onemocnění jater účinkuje silymarin skrze rozdílné mechanismy a komplexní biologické interakce, které jsou přínosné u mnoha patologických stavů. Některé z těchto interakcí působí systémově a ovlivňují játra. Výzkumníci po dlouhou dobu studovali biologické vlivy přírodních produktů, mezi něž patří i silymarin, na patologických stavech, jako je například virová hepatitida, alkoholické onemocnění jater (ALD), metabolická hepatitida, nebo na běžných koncových stádiích hepatitidy, což je cirhóza a hepatocelulární karcinom. U všech uvedených nemocí silymarin vykazuje důležitou biologickou aktivitu [246].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Hlavní účinky silymarinu byly dobře shrnuty v publikaci Valenzuely a Garrida z roku 1994. U silymarinu byly zmíněny 3 typy jeho cytoprotektivních a buňky-regenerujících účinků:

- a.) Membránu stabilizující účinek, kam můžeme zařadit jeho schopnost vycytávat volné radikály a GSH-šetrící působení.
- b.) Mikrosomální metabolismus xenobiotik. Zde můžeme zařadit opět jeho vlastnost vycytávající volných radikálů a schopnost reverzibilně inhibovat cytochrom P-450.
- c.) Účinek v jádře a jadérku, kde má vliv na syntézu ribozomální RNA a zvyšuje syntézu proteinů [247].

2.5.1.6.2.1.1.1 Vliv silymarinu a silybinu na apoptosu

Silymarin moduluje nerovnováhu mezi přežitím buněk a apoptosou prostřednictvím zásahu do exprese regulátorů buněčného cyklu a proteinů zapojených v apoptose [248].

U silymarinu bylo zjištěno potlačení proliferace tumorových buněk v případě různých typů rakoviny zahrnujících nádory prostaty [249-252], vaječnicků [253], prsu [254], plic [255], kůže [238] a močového měchýře [256, 257].

Také silybin vykazuje protinádorovou aktivitu vůči různým typům rakoviny: prostaty [258-262] prsu [263, 264], kůže [265], střeva [266], plic [267], ledvin [268, 269] a močového měchýře [257, 270-272]. Zvyšuje se zájem o vysvětlení mechanismu účinku silybinu jako účinné látky pro chemoprevenci a chemoterapii proti různým typům rakoviny. Jedním z hlavních mechanismů účinku silybinu proti rakovinným buňkám je indukce apoptosy [273]. Příkladem může být buněčná linie lidského karcinomu močového měchýře 5637, u které došlo po aplikaci silybinu k inhibici růstu a spuštění na kaspasach závislé i nezávislé apoptosy [274].

2.5.1.6.2.1.1.2 Vliv silymarinu a silybinu na buněčný cyklus

Průběh buněčného cyklu závisí na fosforylaci určitých substrátů prostřednictvím aktivního komplexu cyklinů s cyklin-dependentními kinasami (CDKs) [275]. Buněčný cyklus může být v G1, S, nebo G2/M fázi zastaven mnoha DNA-poškozujícími a cytotoxickými činidly [276, 277].

Silymarin potlačuje proliferaci nádorových buněk řadou mechanismů: zastavením buněčného cyklu v G1/S fázi, indukci inhibitorů CDKs, sníženou regulací produktů antiapoptotických genů, inhibicí kinas zajišťujících buněčné přežití a inhibicí zánětlivých

transkripčních faktorů. Předpokládá se, že toto potlačení proliferace je mechanismem jeho protirakovinné aktivity. Studie na silymarinu dále prokázaly sníženou regulaci genových produktů spojených s proliferací tumorových buněk, invazí, angiogenezí a metastázemi [278].

Potlačením průběhu buněčného cyklu v jeho různých stádiích inhibuje silymarin proliferaci buněk. V případě lidských buněk rakoviny prostaty LNCaP, PC3 a DU145 bylo u silymarinu prokázáno zastavení buněčného cyklu v G1 a/nebo G2/M fázi [248].

V případě buněk přechodného buněčného karcinomu močového měchýře („bladder transitional cell carcinoma, TCC“), tumoru vysokého stupně („high-grade tumor“) T-24 a invazivního tumoru vysokého stupně („high-grade invasive tumor“) TCC-SUP, byla po aplikaci silybinu popsána inhibice růstu zastavením buněčného cyklu v G1 fázi s časovou a koncentrační závislostí. Navíc, ve vysokých koncentracích vyvolal silybin u TCC-SUP buněk zastavení i v G2/M fázi [257].

Také protirakovinná aktivita dvou čistých látek ze silymarinu – isosilybinu A a isosilybinu B – v případě buněk lidského karcinomu prostaty LNCaP a 22Rv1 byla zprostředkována zastavením buněčného cyklu a vyvoláním apoptosy [279].

2.5.1.6.2.1.2 2,3-Dehydrosilybin

Z hlediska pro-apoptotických [280-282], antioxidantních [283, 284] a cytoprotektivních [285] aktivit *in vitro* byl ve srovnání se silybinem popsán jako účinnější 2,3-dehydrosilybin (DHS) – minoritní složka extraktu semen *S. marianum* subsp. *anatolicum* [286]. Z důvodu nízkého obsahu v přírodním materiálu je 2,3-dehydrosilybin získáván chemickou syntézou ze silybinu [229].

2,3-dehydrosilybin je 25× účinnější antioxidant a vychytavač volných radikálů než silybin, což ukazuje na důležitost přítomnosti dvojně vazby v C-kruhu molekuly flavonolignanů. DHS je rovněž 10× silnější inhibitor peroxidace lipidů [283].

2.5.1.6.2.1.3 Analoga silybinu a 2,3-dehydrosilybinu

Z důvodu zvýšení orální biodostupnosti silybinu a jeho kongenerů byly za použití fosfatidyl cholinu (SiliphosTM) a liposomů obsahujících různá množství cholesterolu a fosfolipidů, lipidových mikrosfér či surfaktantů připraveny rozdílné preparáty [287]. Série analogů jako jsou silybin bis-hemisukcinát (Legalon-SILTM), silybin karboxyláty [283], silybin glykosidy [288, 289] a silybin 23-*O*-fosfát [288] měla vylepšenou rozpustnost ve vodě a důsledkem toho lepší terapeutickou efektivitu. V případě *O*-alkyl (methyl a benzyl) a *C*-alkyl (prenyl

a geranyl) analog silybinu a 2,3-dehydrosilybinu byla nalezena významná inhibiční aktivita vůči P-glykoproteinu [288, 290-292].

2.5.1.7 Polyfenoly a jejich galloylderiváty

Přírodní produkty a jejich deriváty, které jsou schopny zeslabit vedlejší efekty nastávající při léčbě rakoviny [166], jsou i významným zdrojem pro vývoj nových léků. Pro zlepšení jejich fyzikálně-chemických vlastností jsou různě modifikovány [293]. Jednou ze slibných modifikací je galloylace.

2.5.1.7.1 Výskyt a biologické vlastnosti galloylovaných polyfenolů

Esterifikace polyfenolů s kyselinou gallovou způsobuje integraci nových fenolových skupin do jejich struktury. Galloyl estery, obzvláště gallotanniny a ellagitanniny, se vyskytují v přírodě v primitivních dikotydelonech rodin *Hamamelididae*, *Dilleniidae* a *Rosidae* [294], ovšem různé galloylované polyfenoly jsou také připravovány synteticky (viz kapitola 2.5.1.7.4). Komplexní posouzení současných znalostí o přírodních a semisyntetických gallátech se zaměřením na jejich biologické aktivity a toxikologické vlastnosti bylo provedeno v review Karas et al. 2017 [295].

Galloylová skupina může ovlivnit specifickou aktivitu některých polyfenolů. Dochází například ke snižování hladiny lipidů [296, 297], či antiproliferačních účinků [298]. V souvislosti s angiogenezí bylo zjištěno, že EGCG (epigallokatechin gallát) a ECG (epikatechin gallát) obsahující galloylovou skupinu ve struktuře mají lepší biologické aktivity v porovnání se základními látkami bez galloylové skupiny v molekule (epigallokatechinem (EGC) a epikatechinem (EC)) [299].

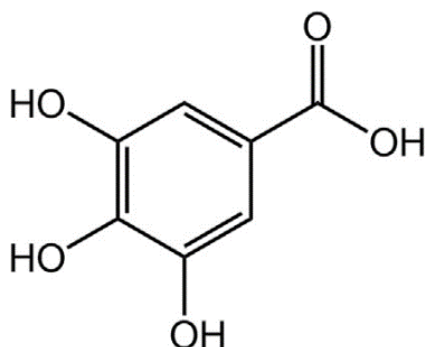
Předpokládá se, že přítomnost galloylové skupiny ve struktuře flavonoidů vylepšuje antioxidační a chemoprotektivní vlastnosti molekuly [300], a je také důležitá pro vylepšení antiangiogenní aktivity [299, 300].

Aktivity polyfenolů mohou být ovlivněny přítomností galloylové skupiny v jejich struktuře. Tyto galloylované polyfenolické sloučeniny se přirozeně vyskytují v rostlinách, ale z důvodu možného ovlivnění jejich vlastností jsou vytvářeny syntetické galloylderiváty [295].

2.5.1.7.2 Kyselina gallová a galloylace

2.5.1.7.2.1 Kyselina gallová

Kyselina gallová (GA, Obr. 20) je jedním z nejjednodušších rostlinných fenolů. V rostlinách se nachází buď volně, nebo ve formě esterů (např. pentagalloylglukosa) – taninů. Kyselina gallová se vyskytuje například v hroznech či čaji a vlastní antioxidační, protizánětlivé a protirakovinné vlastnosti. Díky svým vlastnostem je kyselina gallová využívána například v medicíně, či kosmetice [295].



Obrázek 20 – kyselina gallová.

Silné antioxidační aktivity kyseliny gallové byly předmětem několika studií. GA poskytuje efektivní ochranu proti oxidačnímu poškození například hydroxylovým ($\text{HO}\cdot$), superoxidovým ($\text{O}_2\cdot^-$) či peroxylovým radikálem ($\text{ROO}\cdot$), stejně jako peroxidem vodíku (H_2O_2) či kyselinou chlornou (HOCl) [295].

Kyselina gallová byla také identifikována jako hlavní antioxidační komponenta odpovědná za antiradikálové a protirakovinné aktivity různých rostlinných extraktů. Je schopna inhibovat proliferaci, migraci a invazivnost rakovinných buněk a vyvolat u nich apoptosu ovlivněním různých kinas, regulací signálních transdukčních drah a indukci zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M. Díky velkému množství různých biologických aktivit může být kyselina gallová považována za molekulu vhodnou pro esterifikaci jiných bioaktivních látek [295].

2.5.1.7.2.1.1 Deriváty kyseliny gallové a galloylace

Deriváty kyseliny gallové jsou přítomny v různých rostlinných přípravcích s významnými biologickými vlastnostmi (např. vychytávání radikálů, ovlivnění buněčných signálních drah, nebo indukce apoptosy rakovinných buněk) [295].

Kyselina gallová a její deriváty obvykle vykazují výraznější cytotoxicitu proti rakovinným buňkám ve srovnání s normálními buňkami, což naznačuje slibnou selektivní cytotoxicitu [295].

Galloylace polyfenolů výrazně modifikuje jejich biologické vlastnosti. Obvykle je u galloylovaných polyfenolů aktivita oproti parentní molekule zvýšena, může však dojít i ke snížení aktivity. Dříve bylo ukázáno, že galloylace ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti polyfenolů, což je důležité pro mechanismus jejich antioxidačních aktivit. Přesněji přítomnost galloylové skupiny ovlivňuje schopnost darovat elektrony, chelátovat železo, regenerovat tokoferol a také ovlivnit lipofilitu [295].

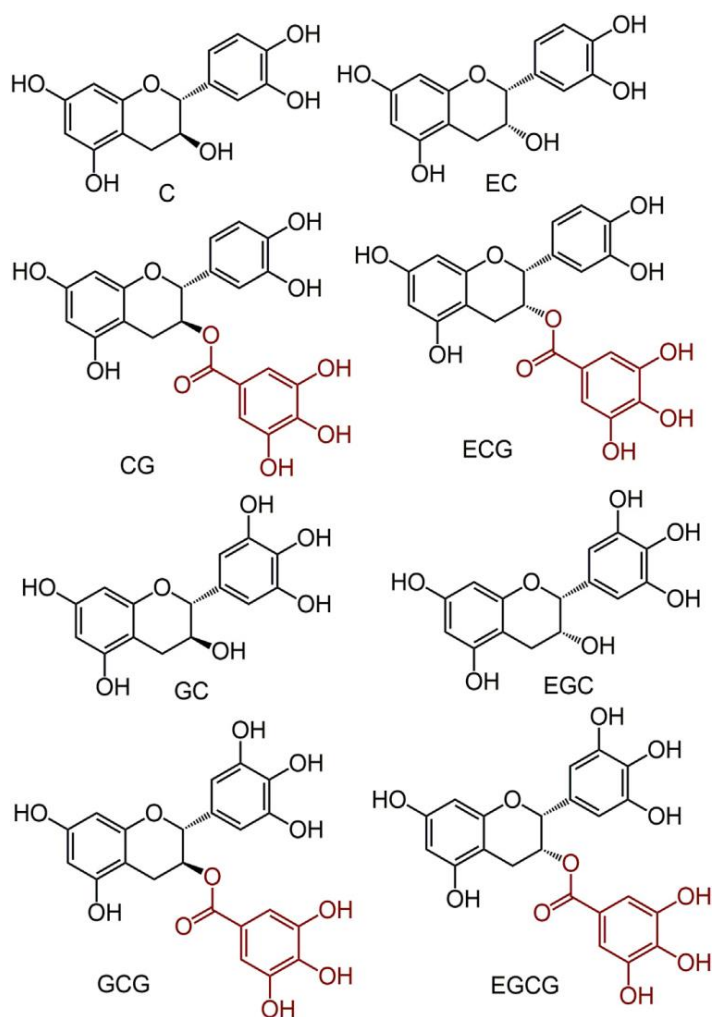
2.5.1.7.3 Galloyl estery nacházející se v přírodě

Kyselina gallová a různé galloyl estery se nacházejí v různých rostlinách rodu *Hamamelididae*, *Dilleniidae* a *Rosidae*. Většina galloylovaných polyfenolů může být klasifikována do tří tříd: a) galloylované katechiny (flavan-3-oly), theaflaviny a proanthocyanidiny, b) penta-*O*-galloyl- β -D-glukosa (PGG) a gallotaniny a c) kyselina ellagová a ellagitaniny. Vedle těchto hlavních tříd se v přírodě nachází také malá skupina galloylovaných flavonolů [295].

2.5.1.7.3.1 Katechiny, theaflaviny a procyanidiny

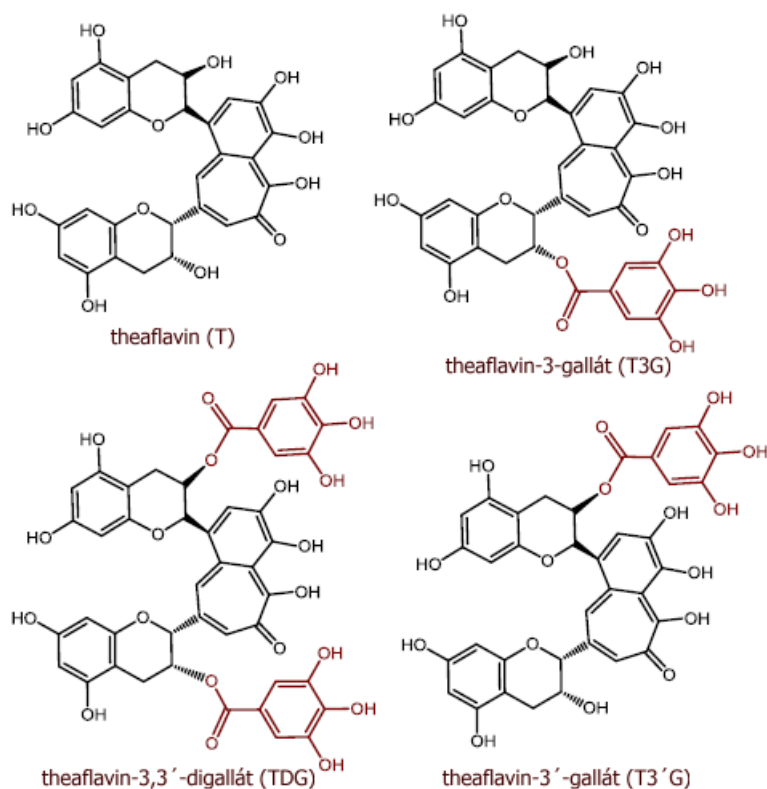
Bohatým zdrojem monomerních flavan-3-olů a obzvláště galloylovaných katechinů je čajovník (*Camelia sinensis*, (L.) Kuntze.). Důležitou chemickou vlastností se zdá být galloylace katechinů umožňující výskyt gallokatechinových skupin v přírodních extraktech. Galloylované katechiny se vyskytují především v zeleném a černém čaji a jejich deriváty představují velmi důležitou skupinu galloylovaných polyfenolů. Nejrozšířenějším katechinem je epigallokatechin gallát (EGCG), který se spolu s epigallokatechinem (EGC), epikatechin gallátem (ECG), nebo epikatechinem (EC) nachází v extraktu ze zeleného čaje (Obr. 21). Biodostupnost katechinů *in vivo* je stejně jako u ostatních polyfenolů nízká. Katechiny byly po perorálním podání rychle absorbovány a detekovány v plazmě – především volný EGCG a konjugované a metylované EGC a EC. Návratnost v moči byla u intaktních katechinů menší než 10 % pro EGC a EC. EGCG byl přítomen pouze stopově. Galloylová skupina ECG a EGCG je během metabolismu u savců vyjmuta esterasou jako kyselina gallová, která je dekarboxylována na pyrogallol. Páteř katechinů je zpracována především díky intestinálnímu mikrobiálnímu metabolismu, který zahrnuje štěpení C-kruhu a tvorbu různých valerolaktonů [295].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY



Obrázek 21 – Struktury (galloylovaných katechinů). C – Katechin, CG – katechin gallát, EC – epikatechin, ECG – epikatechin-3-gallát, EGC – epigallokatechin, EGCG – epigallokatechin-3-gallát, GC – gallokatechin, GCG – gallokatechin-3-gallát. Převzato z Karas et al., 2017 [295].

Oxidací a dimerizací katechinů vznikají theaflaviny. Mezi hlavní theaflaviny patří theaflavin (T), theaflavin-3-gallát (T3G), theaflavin-3'-gallát (T3'G) a theaflavin-3,3' digallát (TDG, Obr. 22). Přestože jsou theaflaviny konzumovány ve velkém množství, je o jejich absorpci a metabolismu publikováno velmi málo. V jedné studii na lidech bylo zjištěno, že je vyloučeno pouze 0,001 % theaflavinů, z čehož vyplývá, že jsou theaflaviny značně metabolizovány lidskou střevní mikroflórou. TDG byl transformován na T, T3G, T3'G, kyselinu gallovou a pyrogallol a jak T3G, tak T3'G na TF, kyselinu gallovou a pyrogallol [295].



Obrázek 23 – struktura theaflavinů. Převzato a upraveno dle Karas et al., 2017 [295].

V různém ovoci, zelenině a rostlinných nápojích jako je zelený čaj, červené víno či kakao mohou být nalezeny oligomerní a polymerní flavan-3-oly (procyanidiny či kondenzované taniny [295].

U oligomerních procyanidinů, dimerů až pentamerů, bylo zjištěno, že jsou silnějšími cytotoxickými činidly vůči rakovinným buňkám než monomerní flavanoly. Biodostupnost proanthocyanidinů je ovlivněna především stupněm polymerizace – intaktní polymerní molekuly se dostávají především do tlustého střeva a poté jsou degradovány střevní mikroflórou na fenylvalerolaktony a fenolové kyseliny [295].

2.5.1.7.3.2 PGG a gallotanniny

PGG a kyselina tannová (Obr. 23) jsou dvě hlavní molekuly v biosyntetické dráze hydrolyzovatelných poly/oligomerních gallo-ellagitanninů. PGG je přítomna v bylinných čajích nebo tradičních lécích vyráběných z řady rostlin, například *Rhus chinensis* Mill, *Paeonia lactiflora* Pall a *Acer truncatum* Bunge, a vykazují mnoho biologických aktivit [295].

V přírodě se v několika rostlinách nacházejí různé galloyl-glukopyranosy (mono-*O*-galloyl- β -D-glukopyranosa, di-*O*-galloyl- β -D-glukopyranosa, tri-*O*-galloyl- β -D-glukopyranosa, tetra-*O*-galloyl- β -D-glukopyranosa). Takovéto „gallotanniny“ mají schopnost

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

vychytávat volné radikály, vykazují antioxidační vlastnosti, precipitují proteiny a inhibují různé enzymy. Do značné míry závisí tyto vlastnosti na počtu galloylových skupin a jejich pozici. Větší počet galloylových skupin je spojen s vylepšenou interakcí s proteiny a zvýšenou schopností vychytávat 1,1-difenyl-2-pikryl-hydrazyl (DPPH) radikály [295].

Hydrolyzovatelné gallotanniny jsou obvykle považovány za kompletně degradované střevní mikroflórou a mají tak velmi omezenou systémovou biodostupnost. Dokonce množství PGG v plazmě po perorální aplikaci bylo pod limitem detekce [295].

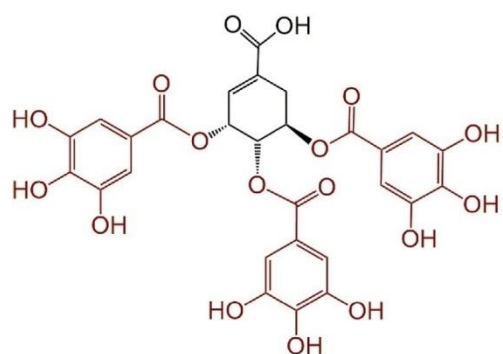
Gallotanniny mají protirakovinné, antiangiogenní, antioxidační, protizánětlivé a antiulcerózní vlastnosti a inhibují P-glykoprotein [295].

Existují ještě další typy gallotanninů tvořené esterifikací kyseliny šikmové a jejího hydrátu (kyseliny chinové) s kyselinou gallovou, které jsou přítomny v komerčních přípravcích kyseliny tannové. Galloylchinové kyseliny (GQAs) jsou odvozeny od kyseliny chinové, jejíž hydroxylové skupiny mohou být do určitého rozsahu esterifikovány kyselinou gallovou a tvoří tak široký rozsah mono- až poly-substituovaných chinových kyselin [295].

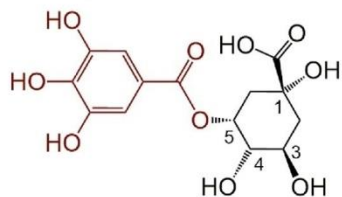
Společně s kyselinami caffeoylchinovými patří galloylchinové kyseliny mezi farmakologicky neaktivnější přírodní látky přítomné v různých rostlinách a jsou známé pro své biologické aktivity. Galloylestery kyseliny chinové byly už více než před 20 lety považovány za důležité pro vývoj budoucích léčiv [295].

Galloylchinové kyseliny jsou známé pro své anti-HIV, anti-herpes simplex virus 1 a antialergenní bioaktivity [295].

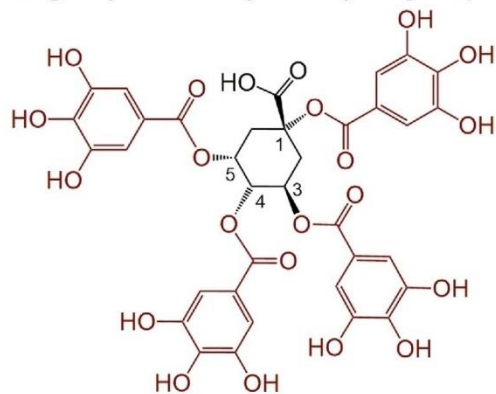
Galloylchinové deriváty jsou schopny efektivně vychytávat volné radikály jako DPPH, superoxidový a hydroxylový radikál. 5-*O*-galloylchinová kyselina (která je také známá jako theogallin, Obr. 24), nacházející se v zeleném čaji i dalších rostlinách je antioxidantem a působí proti leishmanii. 3,4,5-Tri-*O*-galloylchinová kyselina z listů *Myrothamnus flabellifolius* byla schopná chránit umělé membrány proti desikaci a oxidaci indukovanou volnými radikály. 1,3,4,5-Tetra-*O*-galloylchinová kyselina (TGQA, Obr. 24) je silným antioxidantem, a inhibitorem reverzní transkriptasy s anti-HIV potenciálem. Rovněž bylo prokázáno, že vykazuje anti-astmatické a anti-alergické aktivity. TGQA společně s třemi isomerickými tetragalloylchinovými kyselinami (3,5-di-*O*-galloyl-4-*O*-digalloylchinovou, 3,4-di-*O*-galloyl-5-*O*-digalloylchinovou a 3-*O*-digalloyl-4,5-di-*O*-galloylchinovou kyselinou) byly charakterizovány v roce 1989 jako nová třída inhibitorů HIV reverzní transkriptázy [295].



trigalloylšikimová kyselina

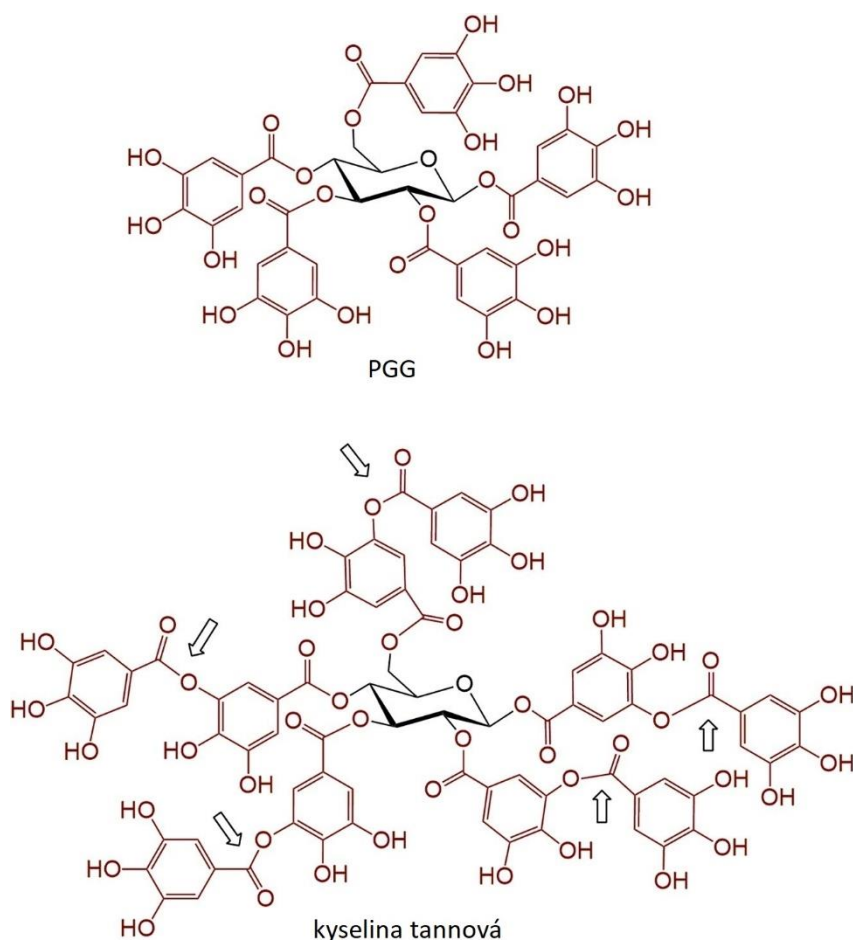


5-*O*-galloylchinová kyselina (theogallin)



1,3,4,5-tetra-*O*-galloylchinová kys. (TGQA)

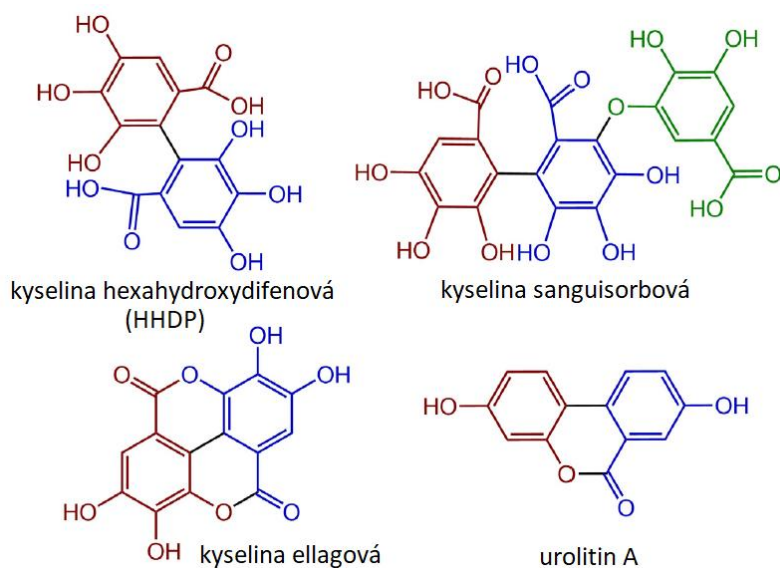
Obrázek 24 – Struktury kyseliny trigalloylšikimové, theogallinu a TGQA. Převzato a upraveno dle Karas et al., 2017 [295].



Obrázek 25 – struktura PGG a kyseliny tannové. Šipkami jsou znázorněny depsidové vazby, které vznikají navázáním kyseliny gallové na hydroxylovou skupinu další molekuly kyseliny gallové.

2.5.1.7.3.3 Ellagitanniny a kyselina ellagová

Ellagitanniny jsou tvořeny oxidativním spojením galloylových skupin v PGG. Tak jsou galloylové skupiny v těchto molekulách spojeny ne pouze esterovými, ale také C-C vazbami a obsahují různá množství galloylových, hexahydrodiphenoylových (HHDP) a/nebo sanguisorboyllových jednotek (Obr. 25) vázaných na cukernou složku [295].



Obrázek 26 – struktury hexahydroxydifenové, sanguisorbové a ellagové kyseliny a urolitinu A, hlavních komponent a degradačních produktů ellagitanninů. Jednotlivé galloylové zbytky jsou znázorněny různými barvami.

Kyselina ellagová je tvořena rostlinami během hydrolýzy ellagitanninů jako vysoce termostabilní molekula (bod tání 350 °C), pouze mírně rozpustná ve vodě, alkoholu, či etheru, ovšem vysoce rozpustná v hydroxidu draselném. Biodostupnost ellagitanninů a kyseliny ellagové jak u zvířat, tak u lidí je kvůli jejich hydrofobním vlastnostem nízká. Ellagitanniny jsou hydrolyzovány v gastrointestinálním traktu střevní mikroflórou na kyselinu ellagovou, která je částečně absorbována a metabolizována skrze eliminaci jedné laktonové skupiny a následnou dekarboxylací a dehydroxylací na urolitiny (deriváty dibenzo-6-onu, Obr. 26) [295].

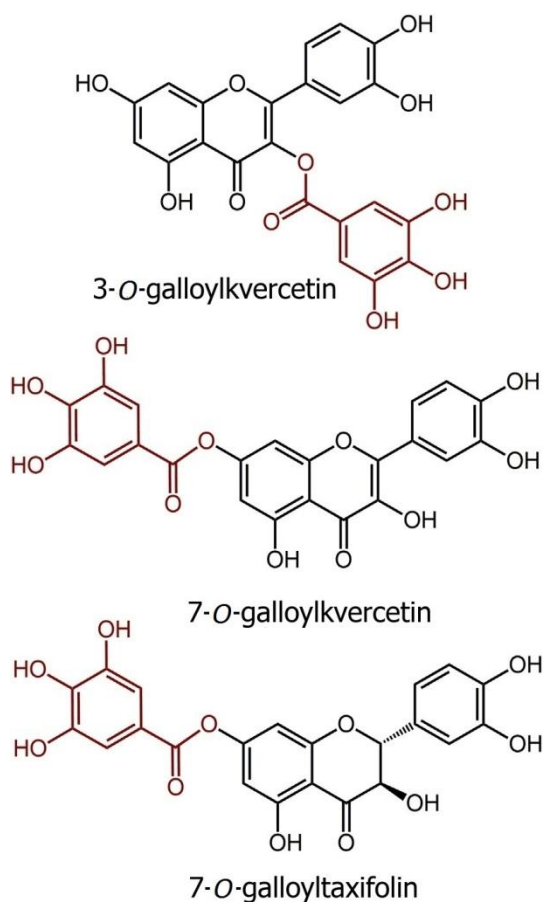
2.5.1.7.3.4 Flavonoly

Kvercetin je známý vylučovač radikálů a jeho antioxidační vlastnosti, které jsou připisovány především přítomnosti pěti hydroxylových skupin spojených do vysoce konjugovaného systému, byly hodnoceny ve velkém množství různých studií. Zatímco z rostlinného materiálu bylo izolováno mnoho derivátů kvercetinu včetně galloylovaných, bylo dosud provedeno pouze několik studií studujících vztah mezi strukturou a vlastnostmi. Z rostlin byly izolovány také galloylované glykosidy flavonolů. Galloylová skupina je obvykle spojena s cukernou složkou a ovlivňuje biologickou aktivitu těchto látek [295].

2.5.1.7.4 Semi-syntetické galloyl estery polyfenolů

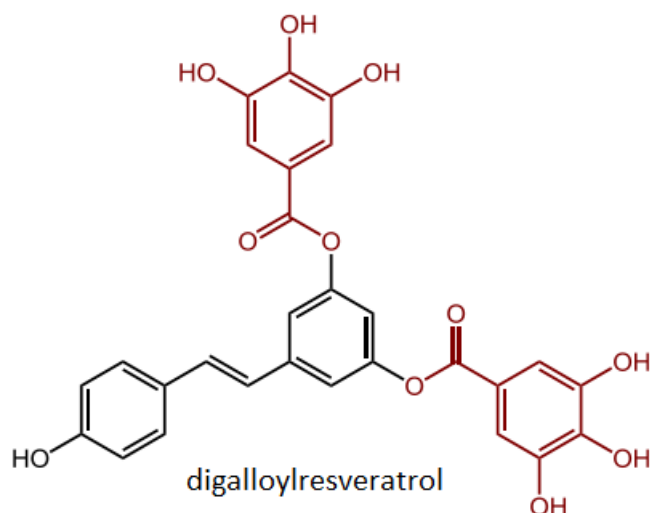
Zájem o fytochemikálie obsažené v jídle a nápojích se výrazně zvýšil v posledních několika desetiletích. Tyto přírodní látky jsou často vynikajícími výchozími molekulami pro tvorbu nových farmak a existují různé strategie pro jejich využití ve vývoji léčiv. Použití nativních polyfenolů v terapii je vystaveno četným problémům souvisejícím s jejich nízkou systémovou biodostupností a membránovou permeabilitou, fyziologickou nestabilitou, oxidativní degradací a metabolickou transformací. Farmaceutický potenciál nemodifikovaných flavonoidů je tedy z důvodu jejich nízké efektivity a biodostupnosti spíše omezen [295].

Zvýšené koncentrace polyfenolů v cílové tkáni může být dosaženo použitím konceptu mikronizace, liposomové enkapsulace, fytosomů, cyklodextrinů, implantátů, nanodisků či nanovláken, ale také objevováním syntéz nových derivátů a strukturálních analog s vylepšenými farmakologickými a farmakokinetickými vlastnostmi. V posledních letech se do popředí zájmu vědců dostává studium semi-syntetických derivátů s prospěšnými biologickými vlastnostmi. V souvislosti s tím byly syntetizovány například monogalloylestery flavonolu kvercetin a jeho dihydroderivátu taxifolinu – jmenovitě 3-*O*-galloylkvercetin, 7-*O*-galloylkvercetin a 7-*O*-galloyltaxifolin (Obr. 26) [295].



Obrázek 26 – Struktury galloylovaných derivátů kvercetinu a taxifolinu. Převzato a upraveno dle Karas et al., 2017 [295].

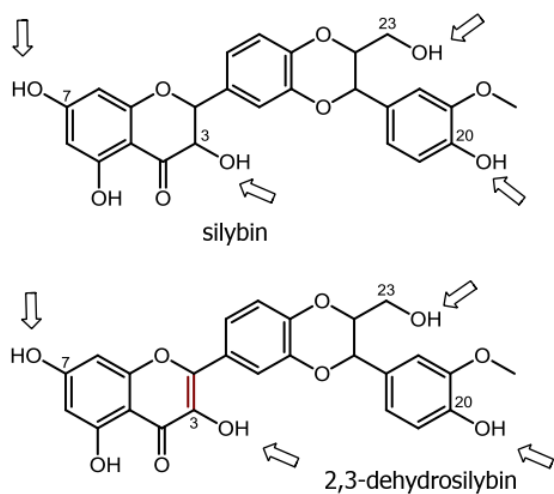
Za účelem propojit prospěšné vlastnosti kyseliny gallové a známého stilbenoidu resveratrolu (trans-3,5,4'-trihydroxystilben) byla připravena nová sloučenina obsahující dvě galloylové skupiny a jeden resveratrolový zbytek (digalloylresveratrol, DGR – Obr. 27) [295].



Obrázek 27 – Struktura DGR. Převzato a upraveno dle Karas et al., 2017 [295].

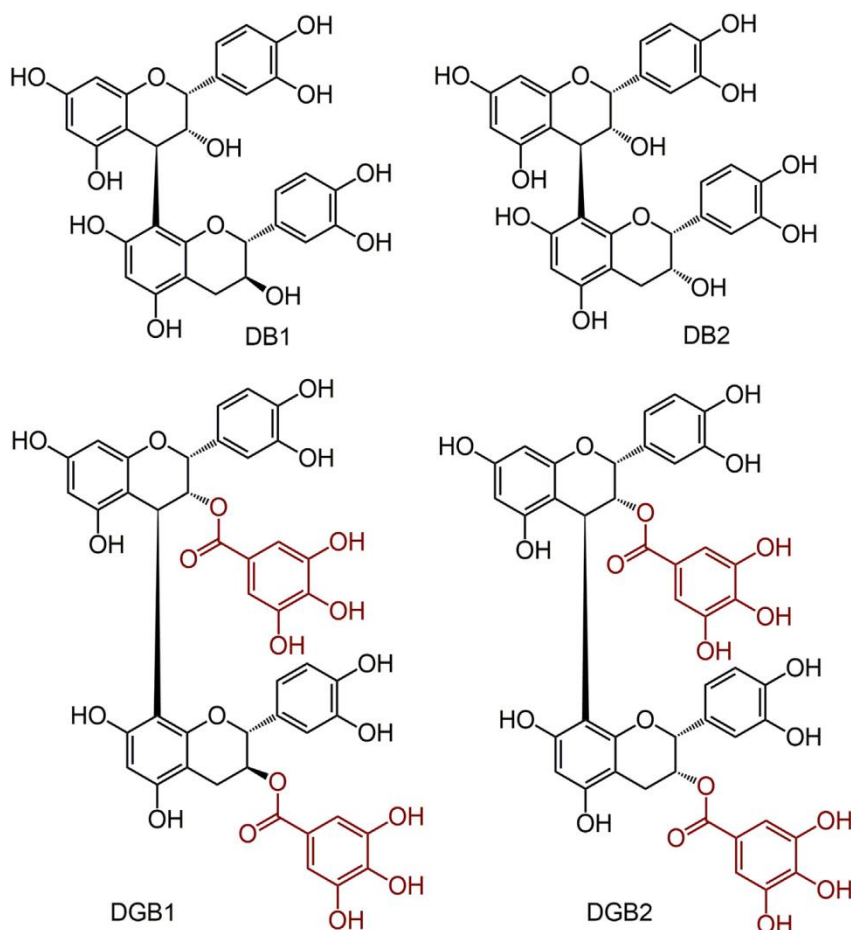
DGR vykazuje cytotoxickou aktivitu, indukuje apoptosu a zastavení buněčného cyklu v případě buněk tlustého střeva HT-29, buněk rakoviny slinivky břišní a leukemických HL-60 buněk [295].

Důležitou skupinou semisyntetických gallátů jsou galloylestery silymarinu (extraktu ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* (L.) Gaertn. Asteraceae), flavonolignany silybin (SB) a 2,3-dehydrosilybin (DHS), navržené tak, aby napodobovaly molekulu EGCG. Kompletní série derivátů na různých pozicích (C-3 OH, C-7 OH, C-20 OH a C-23 OH) obou molekul, které se liší v přítomnosti 2,3-dvojně vazby (Obr. 28) umožňuje provést detailní studii vztahu struktury a aktivity, která je více diskutována v kapitole 7 – „The effect of galloylation on angiogenesis“ článku Karas et al., 2017 [295].



Obrázek 28 – Struktury silybinu a 2,3-dehydrosilybinu. Šipkami jsou vyznačena místa galloylace. Převzato a upraveno dle Karas et al., 2017 [295].

K otestování hypotézy, že dimery galloyl procyanidinů mají vyšší cytotoxický potenciál, než nugalloylované dimery DB1 (procyanidin dimer B1) a DB2 (procyanidin dimer B2) a galloylované monomerní katechiny, byly syntetizovány flavanolové digalloylované dimerní estery DGB1 ([3-*O*-galloyl]-(-)-epicatechin-(4 β ,8)-(+)-catechin-3-*O*-gallát) a DGB2 ([3-*O*-galloyl]-(-)-epicatechin-(4 β ,8)-(+)-catechin-3-*O*-gallát) (Obr. 29) [295].



Obrázek 29 – struktury galloylovaných katechinových dimerů. Převzato a upraveno dle Karas et al., 2017 [295].

2.5.1.7.5 Průmyslové a další použití derivátů látek s kyselinou gallovou

Několik galloyl esterů (propyl gallát, oktyl gallát a lauryl gallát) je široce rozšířených v kosmetice, potravinářství a v oblasti balení potravin k inhibici žluknutí a kažení potravin. Propyl gallát, který je schopen vychytávat volné radikály, chrání před ultrafialovým (UV) zářením a vykazuje antimikrobiální, antinociceptivní, protirakovinné, antimutagenní účinky je využíván v produktech používaných k čištění/ochraně pokožky, do make-upů či opalovacích krémů. Také široká škola protirakovinných výrobků (např. kombrestatin A4, podofylotoxin

a kolchicin) obsahuje modifikovaný zbytek kyseliny gallové – její 3,4,5-trimethoxyfenolovou jednotku [295].

2.5.1.7.6 Vliv galloylace na biologické vlastnosti polyfenolů

V našem článku jsme se zabývali porovnáním vlivu přírodních látek a jejich galloylovaných derivátů na různé biologické vlastnosti. Výsledkem bylo, že syntetické polyfenoly obsahující jednu či více galloylových skupin ve struktuře mají výraznější biologické aktivity v porovnání s jejich negalloylovanými parentními molekulami [295].

2.5.1.7.7 Vliv galloylace na angiogenezi

Existují různé přístupy jak cílit angiogenezi. Nejslibnějším se zdálo být použití monoklonálních protilátek pro VEGF a inhibitorů receptorových tyrosin kinas pro VEGF, nicméně jejich terapeutické použití odhalilo určitá klinická omezení. Proto se hledají nové cíle a léčiva využitelná pro léčbu nádorové angiogeneze, kam lze řadit přírodní polyfenoly. Díky tomu, že se tyto látky vyskytují ve velkém množství v přírodních potravinách, jsou považovány za bezpečné a jednodušší pro použití než farmaceutika. U různých polyfenolů, jako jsou například kvercetin, luteolin, apigenin, kurkumin, silybin, resveratrol, či EGCG byla nalezena schopnost inhibice různých kroků v angiogenní kaskádě [295].

Galloylované látky vykazují oproti svým negalloylovaným parentním molekulám silnější antiangiogenní aktivitu. Tato skutečnost platí jak pro látky přírodní, tak pro látky semi-syntetické.

V případě flavonolignanů silybinu a 2,3-dehydrosilybinu (Obr. 28) byly specificky navrženy jejich galláty, a to k vylepšení antiangiogenního potenciálu silybinu, přípravě analog EGCG a studiu jak galloylace v různých pozicích molekuly ovlivňuje antiangiogenní aktivitu parentní molekuly [295].

2.5.1.7.8 Toxicita/bezpečnost přírodních a semi-syntetických gallátů

Monomerní galloylované katechiny jako EGCG jsou obecně považovány za bezpečné a není u nich známá toxicita. Toxicita byla uvedena pouze *in vitro*. Například u krysích skeletálních myoblastů (L6 buněk), kdy GCG a EGCG byly cytotoxické s IC_{50} 14,8 respektive 14,7 μ M na rozdíl od negalloylovaných CG a ECG, u kterých nebyla cytotoxicita pozorována [301].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Zatímco (+)-katechin může být metabolizován tyrosinásou na cytotoxický *o*-chinon, EGCG je biotransformován metylací, glukuronidací a sulfatací. Při toxických dávkách EGCG mohou být tyto dráhy saturovány a nadbytečné množství EGCG oxidováno na reaktivní EGCG chinon, který může tvořit thiolové konjugáty s glutationem, nebo cysteinem. Nicméně, v případě části „lipofilních čajových polyfenolů“ bylo prokázáno, že u myší mají LD₅₀ 5,0 > g/kg a a negativní byl i Amesův test [302]. V několika studiích byly uvedeny některé vedlejší účinky extraktu ze semen hroznů, ať už použit samostatně, nebo v kombinaci s dalšími suplementy. Palmitoyl estery čajových polyfenolů, obzvláště EGC palmitátu, byly v koncentracích pro orální podání nižších než 0,6 g/kg schváleny jako netoxické přísady do jídla v Číně [302]. U nápoje obsahujícího galloylované čajové katechiny, který byl podáván kontinuálně po dobu 12 týdnů zdravým mužům a ženám s nadváhou bylo prokázáno, že je bezpečný, pokud je podáván v dávce do 665,9 mg/den [303]. V další studii byly katechiny ze zeleného čaje podávány 60 dobrovolníkům s prostatickou intraepiteliální neoplazií ve vysokém stádiu (HG-PIN) v dávce 600 mg/den po dobu jednoho roku bez významných vedlejších, či nežádoucích účinků [304]. Na druhou stranu, u 44 pacientů s androgen-nezávislým karcinomem prostaty ve II. fázi klinického testování, kterým bylo orálně podáváno 6 g prášku zeleného čaje každý den, byl pozorován stupeň toxicity 1 a 2 u 69 % pacientů, v šesti případech byl pozorován stupeň 3 a v jednom případě dokonce stupeň 4 [305]. Toto zřejmě souvisí s použitou dávkou [295].

Také gallotanniny jsou obvykle považovány při nízkém příjmu ve stravě za bezpečné, ovšem ve vyšších koncentracích v kombinaci s vysokoproteinovou dietou snižují schopnost trávení proteinů. Pravděpodobně to souvisí s jejich interakcemi s proteiny, což ovlivňuje vodíkové vazby, van der Waalsovy síly a hydrofobní interakce, ale také kovalentní síťování, které je odpovědné za samoopalovací vlastnosti těchto látek. Přizpůsobení se dietě s vysokým množstvím tanninů zahrnuje produkci slinných proteinů bohatých na prolin (PRPs), které jsou konstitutivně exprimovány u lidí a inducibilně pomocí PGG u krys. PRPs se vážou na tanniny a neutralizují jejich negativní efekty. Na druhou stranu byla v několika studiích uvedena akutní toxicita PGG u zvířat. U krys vedly dávky 250 – 300 mg/kg k rychlému a letálnímu poklesu krevního tlaku během 30 minut, zatímco dávka 150 mg/g neměla vliv ani na krevní tlak, ani na hladinu krevní glukosy [306]. Dávky 5-25 mg/kg (intraperitoneálně) způsobily signifikantní snížení množství krevního dusíku v močovině ([307] citováno v [308]). Jiné gallotanniny (tri-, tetra-, hexa-, hepta-, okta-, nona- a deka-galloylglukosa) měly podobné vlivy. Podání kyseliny tannové bylo spojeno s hepatotoxicitou, anti-nutriční aktivitou a kancerogenezí s rostoucím výskytem a závažností při vyšších molárních hmotnostech [309]. Tanniny s nižší molární

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

hmotností mají méně silné anti-nutriční efekty a mohou být snadněji absorbovány. PGG se při perorálním příjmu projevovala trpkostí a inhibovala lidskou slinnou α -amylasu. Měla by proto být přísně zhodnocena dlouhodobá bezpečnost galloytanninů zahrnující jejich potenciální vliv na trávení škrobu a chuť jídla. Podobně konfliktní data existují také pro ellagitanniny, kyselinu ellagovou či extrakty obsahující ellagitanniny. Běžný příjem z vyvážené zdravé stravy obvykle není spojen s toxickými efekty, zatímco zvýšený příjem skrze tzv. doplňků stravy může snadno vést k nechtěným vedlejším účinkům. Kyselina tannová je obecně FDA uznávána jako bezpečná v dávkách 0,01 – 0,15 % (FDA, revidováno 2016) [295].

Bylo provedeno mnoho studií s komplexním rostlinným materiálem (extrakty, infuze atd.) obsahujícím galláty v kombinaci s dalšími látkami. V takovýchto studiích je extrémně obtížné popsat potenciální toxické efekty jedné látky. Extrakt ze dřeviny *Cotinus coggygria* obsahující zejména PGG neprokázal žádnou toxicitu v játrech krys při podání pomocí žaludeční sondy. Methanolový extrakt z *Byrsonima intermedia*, obsahující mimo jiné methyl gallát, kyselinu gallovou, kvercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl- β -galaktopyranosid) a kvercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl- β -arabinopyranosid) vykazoval znaky mutagenity pro kmeny *Salmonella typhimurium* TA98 a TA100 v Amesově testu. Nicméně tato aktivita byla převážně připsána amentoflavonu a kvercetinu přítomným v extraktu a mutagenita nebyla pozorována u myši při testu na mikrojádrech. Byla také popsána hepatotoxicita, nefrotoxicita a embryonální toxicita pro extrakt z *Polygonum miltuflorum* obsahující galloylované stilbenoidy, a je přisuzována emodinu a rheinu. U esenciálního oleje z *Pistacia lentiscus* nebyly u myši demonstrovány známky toxicity [295].

V případě semi-syntetických gallátů u lidí, či zvířat existuje omezená znalost jejich toxicity. Je zde indikace pro kožní dráždění, nebo senzitivizaci propyl gallátem u kosmetických preparátů. Pro většinu semi-syntetických látek jsou známy pouze *in vitro* data z ne-transformovaných buněčných kultur, nicméně ty často umožňují přímé porovnání gallátů s jejich parentními sloučeninami. Na rozdíl od kvercetinu a taxifolinu, 3-*O*-galloylkvercetin, 7-*O*-galloylkvercetin, 7-*O*-galloyltaxifolin, či kyselina gallová signifikantně snižovaly buněčnou viabilitu myšských RAW264.7 buněk. Překvapivě, 7-*O*-galloylkvercetin nebyl u RAW264.7 buněk degalloylován na kvercetin, ale byl konjugován s kyselinou glukuronovou a/nebo methylován. Také galloylované flavonolignany vykazovaly signifikantně vyšší cytotoxicitu u buněk HUVEC než silybin a 2,3-dehydrosilybin. Nicméně, *in vitro* toxicita nevedla vždy k systémovým toxickým efektům (srovnej Galloylované katechiny – viz kapitola

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

2.5.1.7.3.1). Je tedy zapotřebí více dat pro důkladnější hodnocení možných vedlejších vlivů těchto prospektivních sloučenin *in vivo* [295].

3 Cíle disertační práce

Cíli této disertační práce bylo i) studium vlivu 2,3-dehydrosilybinu (DHS) a jeho galloyl derivátů (3-, 7-, 20- a 23-G-D) na endotelové buňky (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells – endotelové buňky lidské pupečnickové žíly) pomocí vybraných *in vitro* testů; ii) hodnocení antiangiogenních vlastností těchto látek na buněčné linii endotelových buněk (HMEC-1, human microvascular endothelial cells – lidské mikrovaskulární endotelové buňky) *in vitro*; iii) sledování vlivu galloyl derivátů DHS a jejich parentní molekuly na vyvolání apoptosy vybraných lidských rakovinných buněčných linií pomocí průtokové cytometrické analýzy – tato část práce byla vypracována v rámci studijního pobytu ve Francii.

Konkrétní cíle:

- 1) Sledování účinků DHS a jeho čtyř galloyl esterů na endotelové buňky lidské pupečnickové žíly
 - A) Stanovení cytotoxického účinku látek vůči buňkám HUVEC
 - B) Vliv látek na proliferaci HUVEC
 - C) Sledování ovlivnění migračních schopností HUVEC látkami
- 2) Sledování antiangiogenních vlastností DHS a jeho galloyl derivátů vůči buněčné linii HMEC-1
 - A) Stanovení cytotoxicity, antiproliferačních, antimigračních a antidiferenciačních schopností látek na buňkách HMEC-1
 - B) Studium vlivu látek na buněčný cyklus HMEC-1 pomocí průtokové cytometrie
 - C) Mechanistické studium působení látek na expresi Akt a ERK1/2 proteinů
- 3) Stanovení vlivu DHS a jeho galloyl derivátů na apoptosu lidských buněčných rakovinných linií – linie lidské akutní monocytární leukémie – THP-1 (ATCC® TIB-202™), linie nádorových kmenových buněk – NTERA-2 cl.D1 [NT2/D1] (ATCC® CRL-1973™) a linie normálních lidských fibroblastů BJ (ATCC® CRL-2522™)
 - A) Určení schopnosti vyvolat apoptosu THP-1, NTERA-2 a BJ buněk látkami za použití mikrokapilární průtokové cytometrie

CÍLE PRÁCE

B) Stanovení vlivu látek na akumulaci THP-1 buněk v sub-G1 fázi buněčného cyklu mikrokapilární průtokovou cytometrií

4 Experimentální část

4.1 Materiál a chemikálie

4.1.1 Biologický materiál

4.1.1.1 Lidský biologický materiál pro izolaci HUVEC

Endotelové buňky z lidské pupečnickové žíly (HUVEC) byly získány izolací z lidského pupečnicku zdravých nekuřáček ve věku 18 až 35 let. Pupečník byl poskytnut Gynekologicko-porodnickou klinikou LF UP a FN Olomouc. Dobrovolnice souhlasily s použitím pupečnicku pro studijní účely a podepsaly informovaný souhlas. Jejich výběr byl v souladu s principy Mezinárodního etického výboru pro biomedicínský výzkum (CIOMS, Ženeva 1993) a studie byla schválena Etickou komisí Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc (protokol číslo 39/05). Při izolaci endotelových buněk byla alespoň 100 mm dlouhá část pupečnicku nejprve ponořena do Earlova solného roztoku EBS o teplotě 4 °C doplněného antibiotiky a do dvaceti hodin po vyjmutí byla provedena digesce kolagenasou. Po promytí roztokem EBS byl pupečník naplněn roztokem kolagenasy, následovala 10–15 minutová inkubace při 37 °C a poté promytí Hankovým puřem bez obsahu iontů Ca^{2+} a Mg^{2+} pro získání endotelových buněk, následně kultivovaných v endotelovém růstovém médiu a používaných do 8. pasáže.

4.1.1.2 Buněčný materiál

4.1.1.2.1 Buněčná kultura HMEC

Lidské mikrovaskulární endotelové buňky (HMEC, buněčná linie CDC/EU.HMEC-1), poskytnuty Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers for Disease Control and Prevention) (Atlanta, USA), byly pěstovány v endotelovém růstovém médiu s 10 % inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS), heparinem (0,004 mg/ml) a růstovými faktory (bazický fibroblastový růstový faktor 1,0 ng/ml a epidermální růstový faktor 0,1 ng/ml). M199 médium bylo použito jako médium pro hladovění („starvation medium“). Neošetřené buňky (buňky bez látek) sloužily jako kontrola.

4.1.1.2.2 Buněčné kultury NTERA-2 a BJ

Buněčné linie NTERA-2 (CRL-1973) a BJ (CRL-2522) byly zakoupeny z ATCC (LGC Standards, Molsheim, Francie) a kultivovány ve fyziologickém, na nutrienty bohatém a na DMEM-založeném médiu (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) doplněném 10 % (v/v) fetálního bovinního séra (BioWhittaker, Verviers, Belgie), 2 mM glutaminem, 50 μ M neesenciálními aminokyselinami, 50 U/ml penicilinem a 50 μ g/ml streptomycinem (Sigma-Aldrich).

4.1.1.2.3 Buněčná kultura THP-1

THP-1 (TIB-202) buňky byly pěstovány v médiu RPMI 1640 s 2 mM L-alanyl-L-glutaminem dodatečně doplněným 10 % (v/v) fetálního bovinního séra a 50 U/ml penicilinem a 50 μ g/ml streptomycinem (Sigma-Aldrich).

BJ, NTERA-2 a THP-1 buňky byly před použitím ponechány růst do 80% konfluence při 37 °C a 5 % CO₂.

4.1.2 Chemikálie

4.1.2.1 Studované látky

Silybin, 2,3-dehydrosilybin, jejich stereoisomery a galloyl estery 2,3-dehydrosilybinu byly poskytnuty prof. V. Křenem (Mikrobiologický ústav AV ČR) v čistotě > 95% v rámci společných grantových projektů. Syntéza galloyl esterů byla popsána v publikaci Karas et al., 2016 [310]. Zásobní roztoky testovaných látek (10 mM) byly připraveny v DMSO a skladovány při -20°C. Tyto roztoky byly pro použití v experimentech dále ředěny v růstovém médiu pro endotelové buňky EGM a konečný obsah DMSO byl pod 1 %.

4.1.2.2 Ostatní chemikálie

DMSO pro buněčné kultury, 2% roztok želatiny, MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid), tetracyklin, penicilin/streptomycin, Triton X-100 a trypsin byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF), heparin, epidermální růstový faktor (EGF), propidium jodid, Tris-HCl, NaCl, NaF, Nonidet P-40, PMSF, SDS, deoxycholová kyselina, Tween-20, methanol a ethanol byly zakoupeny z firmy Sigma-Aldrich (USA). Fetální bovinní sérum bylo zakoupeno

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

od firem BioTech (Praha, Česká republika) a Sigma-Aldrich (USA), gentamicin od firmy Sandoz (Praha, Česká republika). Kolagenasa byla od firmy SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Německo). Krystalová violeť od firmy BDH Chemicals (Londýn, Spojené království) a médium pro endotelové buňky se suplementy („endothelial cell basal medium + endothelial cell growth medium supplement pack (EGM)“) od firmy PromoCell GmbH (Heidelberg, Německo). DMEM („Dulbecco's modified Eagle's medium“) bylo od firmy Gibco (Waltham, MA, USA). M199 médium bylo zakoupeno z firmy PAN Biotech (Německo). Ibidi μ -slidy (15-jamkové) byly zakoupeny z firmy Ibidi GmbH (Německo). Matrigel[®] byl zakoupen od firmy Corning GmbH (Německo). Nitrocelulosevé membrány byly zakoupeny z firmy Bio-Rad Laboratories (USA). Specifické primární protilátky (β -tubulin, p42/44 MAPK protilátka, fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) protilátka, Akt protilátka a fosfo-Akt (Ser473) protilátka) byly zakoupeny z firmy Cell Signaling Technology (USA). Anti- β -aktin monoklonální protilátka byla zakoupena od firmy Millipore (USA). Sekundární protilátka (kozí proti-myši) IgG1-HRP byla zakoupena z firmy Biozol (Německo) a sekundární protilátka (kozí proti-králíci) IgG1 z firmy Jackson ImmunoResearch (USA). Celastrol byl obdržen jako dárek od Pr. A. C. Allisona (Alavita Pharmaceuticals Inc., CA, USA). Barvicí roztok PI/RNasa („FxCycle PI/RNase Staining Solution“) byl zakoupen od firmy Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc. (USA). Annexin V značený FITC („Annexin V-FITC“) byl obdržen od firmy ImmunoTools (Německo) a propidium jodid (PI) z firmy MiltenyiBiotec Inc. (USA). Další chemikálie byly zakoupeny od firmy Lach-Ner (Neratovice, ČR).

4.1.3 Roztoky

4.1.3.1 Fosfátový isotonický pufr

Koncentrovaný PBS (10x): 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 8,96 mM Na₂HPO₄·12H₂O; 1,47 M KH₂PO₄.

Tento koncentrovaný roztok byl pro experimenty používán po desetinasobném zředění destilovanou vodou.

4.1.3.2 Roztoky pro izolaci endotelových buněk (HUVEC) a jejich kultivaci

EBS – Earlvův solný roztok: 5,37 mM KCl; 26 mM NaHCO₃; 116 mM NaCl; 1,02 mM NaH₂PO₄·H₂O; 5,56 mM glukosa.

0,2% želatina: 2% zásobní roztok želatiny byl při experimentech používán po desetinásobném zředění PBS.

Kultivační médium: EGM médium pro endotelové buňky s aditivy (Promocell): 20 µl/ml FBS; 4 µl/ml ECGS/H; 1 ng/ml lidský rekombinantní FGF; 0,1 ng/ml lidský rekombinantní EGF; 1 µg/ml hydrokortison; 90 µg/ml heparin; 2 µl/ml gentamicin; 2 µl/ml tetracyklin.

Hankův pufr bez Ca²⁺ a Mg²⁺: 5,4 mmol.l⁻¹ KCl; 0,44 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄; 4,2 mmol.l⁻¹ NaHCO₃; 0,137 mol.l⁻¹ NaCl; 0,34 mmol.l⁻¹ bezvodého Na₂HPO₄ (0,24 mmol⁻¹ Na₂HPO₄·12 H₂O) ; 5,6 mmol.l⁻¹ D-Glukosy

4.1.3.3 Roztoky pro stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

Činidlo Bradfordové: 0,5% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G250, methanol (25%), 85% kys. fosforečná (50%), deionizovaná voda (24,5%).

4.1.3.4 Roztoky používané při SDS-PAGE a Westernově přenosu

Lyzační (RIPA) pufr: 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, (pH 7,5); 1% (v/v) Nonidet P40; 0,25% (m/v) deoxycholová kyselina; 0,1% (m/v) SDS.

Těsně před použitím byl pufr doplněn proteasovými inhibitory - jednou tabletou Complete™;

0,5 mM PMSF a 2 mM neovanadátem.

Vzorkovací pufr (5×): 312,5 mM Tris-Base (pH 6,8); 50% (v/v) glycerol; 25% (v/v) SDS (20%); 12,5% (v/v) DTT (16%); 0,5% (v/v) Pyronin Y (5%).

Separáčnı pufr: 1,5 M Tris-Base, pH = 8,8.

Separáčnı gel: 10% SDS polyakrylamidovı gel: 30% akrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (=AA+Bis), 33,1% v/v); separáčnı pufr (24,9% v/v); destilovaná voda (40,4% v/v); 10% SDS (1% v/v); 10% APS (0,5% v/v); TEMED (0,1% v/v).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Zaostřovací pufr: 1,25 M Tris-Base; pH = 6,8.

Zaostřovací gel: 4% SDS polyakrylamidový gel: 30% akrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (=AA+Bis), 17,1% v/v); zaostřovací pufr (10,1% v/v); destilovaná voda (70,6% v/v); 10% SDS (1% v/v); 10% APS (1% v/v); TEMED (0,2% v/v).

Migrační SDS pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycin, SDS (0,1% m/v) (Bio Basic Inc., Kanada).

Transferový pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycin, methanol (20% v/v); pH = 8,3–8,7 (Bio Basic Inc., Kanada).

Isotonický Tris pufr (Tris-buffered saline - TBS): 100 mM Tris; 137 mM NaCl; pH = 7,5.

TBS + Tween-20 (TBS/T): Tween 20 (0,05% m/v) v TBS; pH = 7,5.

TBS/T + mléko: Tween 20 (0,05% m/v); sušené mléko (5% m/v) v TBS.

4.1.4 Přístroje

Analytické váhy TOLEDO AX105 DeltaRange®, Centrifuga Labofuge 400 Function Line (Heraeus INSTRUMENTS, Německo), Centrifuga miniSpin (Eppendorf, Německo), Elektromagnetická míchačka IKA RH basic KT/C (Slabo, ČR), Hlubokomrazicí box Jouan VX570F Thermo ELECTRON CORPORATION, Inkubátor Sanyo Co Incubator (Schoeller, ČR), Laminární box Clean Air (Schoeller, ČR), Mikrokapilární průtokový cytometr Guava EasyCyte™ (Millipore/Merck, CA, USA), Mikroskop NIB – 100 (Novel Optics, Čína), Odsávačka Aspiration Station (Gilson Safe, Švýcarsko), pH-metr inolab Level 1 (Schoeller Instruments, ČR) s elektrodou SenTix41 (WTW, Německo), Počítací komůrka Bürker Marienfeld Germany, Průtokový cytometr FACSCALibur (BectonDickinson, Německo), Souprava na SDS-PAGE/Western blotting Trans-Blot® TURBO™ Transfer System (BioRad, USA), Spektrometr Infinite M200 Pro (Tecan, Rakousko), Termomixer Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo), TILLvisiON-systém (Lochham, Německo) ve spojení s mikroskopem AXIOVERT 200 (Zeiss, Německo), Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo), Ultrazvuk ULTRASONIC COMPACT CLEANER UCC4 POWERSONIC, Váhy Instrument ACB 600H (Schoeller, ČR), Vířivá třepačka Reax Top (Heidolph, Německo), Vodní lázeň GRANT OLS200 (Grant, Anglie), Zdroj napětí PowerPac™ HC (Bio-Rad, USA), Fluorescenční mikroskop Axiovert 40 CFL (Zeiss, Německo).

4.1.5 Ostatní použitý materiál

Při experimentech byly rovněž použity zamrazovací lahvičky (NUNC™ CryoTube™ vials), 25 a 75 cm² kultivační lahve (Nunc™), kultivační desky (6, 24 a 96-jamkové), Petriho misky různých průměrů, filtry pro filtrování roztoků a centrifugační zkumavky (Nunc, Dánsko). Dále byly použity 16-jamkové desky XCELLigence E-Plate (ACEA biosciences, USA), plastové injekční stříkačky různých objemů (B. Braun, Německo), škrabka na sběr buněk (Biologix cell scraper) (Corning Incorporated, Mexiko), destičky μ -Slide Angiogenesis (Ibidi, Německo), sterilizační filtry 0,22 μ M Millex®-GS (Millipore, USA) a filtry Cell Strainer (I.T.A.-Intertact, Česká republika), fotografický papír Kodak X-Omat AR Film XAR5 (Kodak, Česká republika) a PVDF membrána Immun-Blot™ (0,2 μ M, BioRad Laboratories, USA). Dále byly použity pipety (včetně multikanálové pipety Multipette® plus), špičky a plastové mikrozukavky (Eppendorf, Německo) a pinzety Extra fine Graefe Forceps-0.5 mm Tip (Fine Science, Německo). Při práci s buněčnými kulturami byl používán plynný oxid uhličitý (Linde Technoplyn, ČR).

Při experimentech byla dále využívána destilovaná voda, a také voda deionizovaná, připravená z vody destilované systémem Ultrapure 10 (Watrex, Česká republika).

4.2 *In vitro* sledování vlivu 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na endotelové buňky za použití buněčné linie HUVEC

4.2.1 Hodnocení cytotoxicity a buněčného růstu (MTT test)

Buňky HUVEC byly vysety na 96-jamkové desky pokryté želatinou (želatina 10 \times ředěná sterilním PBS, tuhnutí 20 minut při 37 °C; 5 % CO₂). Pro stanovení cytotoxicity byly HUVEC ponechány růst do subkonfluency (37 °C; 5 % CO₂) s následným přidáním testovaných látek naředěných v kultivačním médiu v koncentracích 0–100 μ M (obsah DMSO pod 1 %). Buňky byly s látkami inkubovány 24 hod (37 °C; 5 % CO₂). Pro stanovení proliferace byly HUVEC vysety v koncentraci 5 \times 10⁴ buněk/ml (5000 buněk/jamku) s následným přidáním 25 μ l roztoku testovaných látek v DMSO (obsah DMSO pod 1 %) v koncentracích 0–100 μ M a buňky byly s látkami inkubovány 72 hod (37 °C; 5 % CO₂). Po 24 respektive 72 hodinové inkubaci byly buňky opláchnuty 2 \times sterilním roztokem PBS a následně bylo k buňkám přidáno 100 μ l roztoku MTT (0,5 mg/ml) naředěného v kultivačním médiu (inkubace 2 hodiny; 37 °C; 5 % CO₂).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Po příslušné inkubační době bylo MTT v kultivačním médiu odstraněno a bylo aplikováno 50 μ l roztoku DMSO s 1% amoniakem. Po rozpuštění krystalů (5 minut) byla změřena absorbance vzniklého modrofialového roztoku při 540 nm. Negativní kontrolou byly buňky v kultivačním médiu s DMSO. Pozitivní kontrolou byly buňky s 3% roztokem Tritonu X-100.

4.2.2 Hodnocení buněčné migrace („Wound scratch assay“)

K hodnocení buněčné migrace *in vitro* je využívána metoda „wound scratch assay“, která spočívá ve vytvoření rýhy do monovrstvy konfluentních buněk a následném mikroskopickém sledování zacelování rýhy v závislosti na čase.

Buňky HUVEC byly vysety na 24-jamkové desky pokryté želatinou (želatina 10 \times ředěná sterilním PBS, tuhnutí 20 minut při 37 °C; 5 % CO₂) a ponechány růst do subkonfluency (37 °C; 5 % CO₂). Po dosažení subkonfluency byla za použití žluté pipetovací špičky (Eppendorf, 20–200 μ l) vytvořena uprostřed jamky v monovrstvě buněk 1 mm široká rýha. Následně bylo odstraněno médium a buňky byly 2 \times promyty roztokem PBS. Po promytí byly k buňkám přidány testované látky naředěné v kultivačním médiu v koncentracích 0–20, 0–30, či 0–60 μ M dle studované látky a buňky byly inkubovány po dobu 16–20 hodin (37 °C; 5 % CO₂). Po příslušné inkubační době byly látky v kultivačním médiu odstraněny, buňky byly 2 \times promyty roztokem PBS a fixovány 300 μ l 3% roztoku formaldehydu po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě (RT). Po fixaci byly buňky barveny 2% roztokem krystalové violeti ve 20% methanolu (5 minut, RT). Zacelování rýhy bylo hodnoceno vizuálně za použití mikroskopu Zeiss Axiovert40 CFL před (t = 0 hod) a po experimentu (t = 16–20 hod). Kvantifikace byla provedena pomocí programu ImageJ 1.49n. Negativní kontrolou byly buňky v kultivačním médiu s DMSO. Pozitivní kontrolou byly buňky v bezsérovém DMEM médiu bez přídavku růstových faktorů.

4.2.3 Statistika

Výsledky vlivu látek na endotelové buňky (Výsledky *in vitro* testů na buňkách HUVEC) byly vyjádřeny jako hodnoty IC₅₀ získané ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu za použití softwaru Microsoft Excel 2013 a hodnoceny v rámci jednotlivých *in vitro* testů analýzou roztyplu jednoduchého třídění (one-way ANOVA) za použití statistického balíčku Statext v2.1 (Statext LLC, Wayne, NJ, USA). Jako signifikantní byly považovány rozdíly při hladině $p \leq 0,05$.

4.3 *In vitro* studium vlivu 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na angiogenezi za použití buněčné linie endotelových buněk HMEC-1

4.3.1 Hodnocení buněčné proliferace

Hodnocení proliferace bylo provedeno v souladu s protokolem NCI (National Cancer Institute) pro angiogenezi. Buňky jsou po inkubaci s testovanými látkami barveny roztokem krystalové violeti. Krystalová violeť, vážící se převážně k DNA, je vymyta z buněk roztokem citrátu sodného v 50% ethanolu. Absorbance fialového roztoku krystalové violeti je úměrná počtu buněk a je stanovena spektrofotometricky při 540 nm.

Buňky HMEC byly vysety na 96-jamkové desky pokryté želatinou (želatina 10× ředěná sterilním PBS, tuhnutí 20 minut při 37 °C; 5 % CO₂) v koncentraci 15×10⁴ buněk/ml (1500 buněk na jamku) a kultivovány 24 hod (37 °C; 5% CO₂). Po 24 hodinách byly k buňkám přidány testované látky naředěné v kultivačním médiu v koncentracích 0, 1, 3, 5 a 10 μM (obsah DMSO pod 1 %) a buňky byly s látkami inkubovány 72 hodin (37 °C; 5 % CO₂). Po 72 hodinách byly látky v kultivačním médiu odstraněny a následně byly buňky barveny 2% roztokem krystalové violeti v 20% methanolu po dobu 10 minut při RT. Po 10 minutách byla nenavázaná krystalová violeť odstraněna promýváním destilovanou vodou a desky s nabarvenými buňkami byly ponechány na vzduchu 24 hodin. Po 24 hodinách bylo k buňkám přidáno 100 μl 1M roztoku citrátu sodného v 50% ethanolu po dobu 10 minut. Poté byla změřena absorbance fialového roztoku krystalové violeti spektrofotometricky při 540 nm.

4.3.2 Diferenciační test (test tvorby trubic)

Test tvorby trubic je metoda, která využívá schopnosti endoteliálních buněk diferenciovat v prostředí extracelulární matrix a tím tvořit kapilární struktury. Jako model extracelulární matrix je použit Matrigel[®], který je biologickým extraktem získaným z Englebreth-Holm-Swarm myšního sarkomu.

Buňky HMEC byly vysety na 6-jamkové desky pokryté želatinou (želatina 10× ředěná sterilním PBS, tuhnutí 20 minut při 37 °C; 5 % CO₂) v koncentraci 25×10⁵ buněk/ml (12,5×10⁵ buněk na jamku) a ihned k nim byly přidány testované látky naředěné v kultivačním médiu v

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

koncentracích 5 a 10 μM (obsah DMSO pod 1 %). Po 24 hodinové preinkubaci bylo médium s testovanými látkami odstraněno, buňky byly promyty 2 \times roztokem PBS, uvolněny roztokem trypsinu s EDTA, centrifugovány 5 minut při 200 g, 25 °C, spočítány a vysety v koncentraci 2 $\times 10^5$ buněk/ml na desky Ibidi μ -slides (15-jamkové) pokryté Matrigelem[®]. Po 16–20 hodinách byla tvorba tubulární struktury hodnocena mikroskopicky pomocí systému TILLvisiON-system ve spojení s mikroskopem Axiovert 200. Kvantifikace tubulární struktury byla prováděna programem S.CO LifeScience.

4.3.3 Analýza buněčného cyklu a apoptosy pomocí průtokové cytometrie

Buňky HMEC byly vysety na 6-jamkové desky pokryté želatinou (želatina 10 \times ředěná sterilním PBS, tuhnutí 20 minut při 37 °C; 5 % CO₂) v koncentraci 25 $\times 10^5$ buněk/ml (12,5 $\times 10^5$ buněk na jamku) a ihned k nim byl přidán 20-G-D naředěný v kultivačním médiu v koncentraci 5 a 10 μM . Následovala inkubace po dobu 6, 24 a 48 hodin (37 °C; 5% CO₂). Po příslušné inkubační době byly buňky promyty roztokem PBS a uvolněny roztokem trypsinu s EDTA, centrifugovány po dobu 10 minut při 200 g, 25 °C, barveny roztokem propidium jodidu (PI) ve fosfátovém pufru (PBS) o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ a inkubovány přes noc při 4 °C. Obsah DNA byl hodnocen průtokovou cytometrií. Rozdělení buněk v sub-G1 (apoptotické buňky), G0/G1, S a G2/M fázi bylo kvantifikováno za použití analýzy histogramu FlowJo softwarem.

4.3.4 SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza a imunoblotování

Buňky HMEC byly vysety na 6-jamkové desky pokryté želatinou (želatina 10 \times ředěná sterilním PBS, tuhnutí 20 minut při 37 °C; 5 % CO₂) v koncentraci 25 $\times 10^5$ buněk/ml (25 $\times 10^5$ buněk/jamku) a ponechány růst do subkonfluente. Po dosažení subkonfluente byl k buňkám přidán 20-G-D naředěný v médiu M199 v koncentraci 5 and 10 μM a buňky byly inkubovány po dobu 6 hodin (37 °C; 5 % CO₂). Po 6 hodinách bylo médium odstraněno, buňky byly promyty 2 \times studeným roztokem PBS a lyzovány studeným RIPA pufrům (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl; 2 mM NaF; 0,2% Nonidet P-40; 30 mM PMSF; 1 mM SDS; 6,4 mM deoxycholová kyselina) po dobu 30 minut při 4°C. Poté byly buňky centrifugovány po dobu 10 minut při 14 000 g a 4 °C. Po centrifugaci byla změřena koncentrace proteinu v lyzátech metodou dle Bradforda. Následně byly lyzáty buněk ředěny pufrům v poměru 1:4 a denaturovány povařením po dobu 5 minut při 95 °C.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V systému pro elektroforézu Mini-Protean (Bio-Rad) byl připraven 10% separační a 4% zaostřovací polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm a do jamek byly aplikovány vzorky s obsahem 25 µg protein/jamku. Elektroforéza byla prováděna v migračním pufru při konstantním proudu. Zaostřování vzorků probíhalo při proudu 15 mA na gel a po dosažení separačního gelu byla hodnota proudu zvýšena na 30 mA na gel.

Po rozdělení proteinů následoval jejich přenos na nitrocelulosové membrány. Po skončení přenosu byly membrány promyty 5× v Tris pufru (TBS, Tris-buffered saline) při RT, blokovány 2 hodiny v 5% (w/v) BSA v TBS s 0,1% Tweenem-20 (TBS/T). Po blokování byly membrány inkubovány přes noc při 4 °C s primárními protilátkami (p42/44 MAPK, fosfo-p44/42 MAPK, protilátka Akt a a protilátka p-Akt). Další den byly membrány promyty 5× roztokem TBS/T a poté inkubovány 2 hodiny při RT se sekundárními protilátkami značenými křenuvou peroxidasou (goat anti mouse IgG1 a goat anti rabbit IgG1). Po inkubaci se sekundárními protilátkami byly membrány promyty 5× roztokem TBS/T a následně na ně bylo aplikováno chemiluminiscenční detekční činidlo po dobu 2 minut při RT. Vzniklá chemiluminiscence byla zaznamenána na fotografický film. Semi-kvantitativní analýzy byly provedeny použitím programu ImageJ 1.49n.

4.3.5 Statistika

Výsledky vlivu látek na angiogenezi za použití buněk HMEC byly vyjádřeny jako průměr ± SD ze tří, nebo čtyř nezávislých experimentů provedených v duplikátu, či triplikátu. Statistické vyhodnocení bylo provedeno použitím softwaru Statistica version 12 analýzou rozptylu jednoduchého třídění (one-way ANOVA) a Studentovým *t*-testem. Rozdíly mezi průměry byly považovány za statisticky signifikantní při $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).

4.4 Vliv DHS a jeho galloyl derivátů na apoptosu a buněčný cyklus u vybraných lidských nádorových linií

4.4.1 Sledování apoptosy buněčných linií THP-1, NTERA-2 a BJ

4.4.1.1 Stanovení časové závislosti apoptosy po působení látek na buněčné linie

Na 96-jamkové desky (180 μ l/jamku) byly vysetvy buňky THP-1 a NTERA-2 v koncentraci 20×10^3 buněk/ml (3600 buněk/jamku) a buňky BJ v koncentraci 8×10^3 buněk/ml (1440 buněk/jamku). Následně byly k buňkám přidány testované látky naředěné v médiu MEM + 0,1% DMSO v koncentracích 0–50, 0–60, či 0–100 μ M dle testované látky a buňky byly s látkami inkubovány 24 hodin (37 °C; 5 % CO₂). Po 24 hodinové inkubaci byly k buňkám přidány 3 μ l FITC (fluorescein-5-izothiokyanátem) značeného annexinu V a 3 μ l propidium jodidu v DMSO o koncentraci 100 μ g/ml. Po 20 minutách byly vzorky proměřeny pomocí mikropilárního cytometru Guava Technologies company, Inc. za použití programu InCyte, verze 2.7. Buňky inkubované s celastolem byly použity jako pozitivní kontrola. Negativní kontrolou byly buňky v médiu MEM bez testovaných látek s obsahem 0,1% DMSO.

4.4.1.2 Stanovení apoptosy po působení látek na buněčné linie v různých časových intervalech

Příprava vzorků pro měření na mikropilárním cytometru byla stejná jako v případě měření apoptosy buněk po 24 hodinové inkubaci s látkami (viz předchozí kapitola 4.3.1.1). Kinetická měření byla provedena na buňkách NTERA-2 a THP-1. U buněk NTERA-2 bylo množství apoptotických buněk stanoveno po 1, 3, 6 a 9 hodinách po inkubaci s testovanými látkami. V případě buněk THP-1 pak po 3, 6 a 9 hodinách po inkubaci s testovanými látkami.

4.4.2 Měření buněčného cyklu u THP-1 buněk

Dvojitým značením pomocí annexinu V a propidium jodidu je možné rozlišit buňky živé (annexin V-negativní, PI-negativní), časně apoptotické (annexin V-positivní, PI-negativní), pozdně apoptotické/sekundárně nekrotické (annexin V-positivní, PI-positivní) [311].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

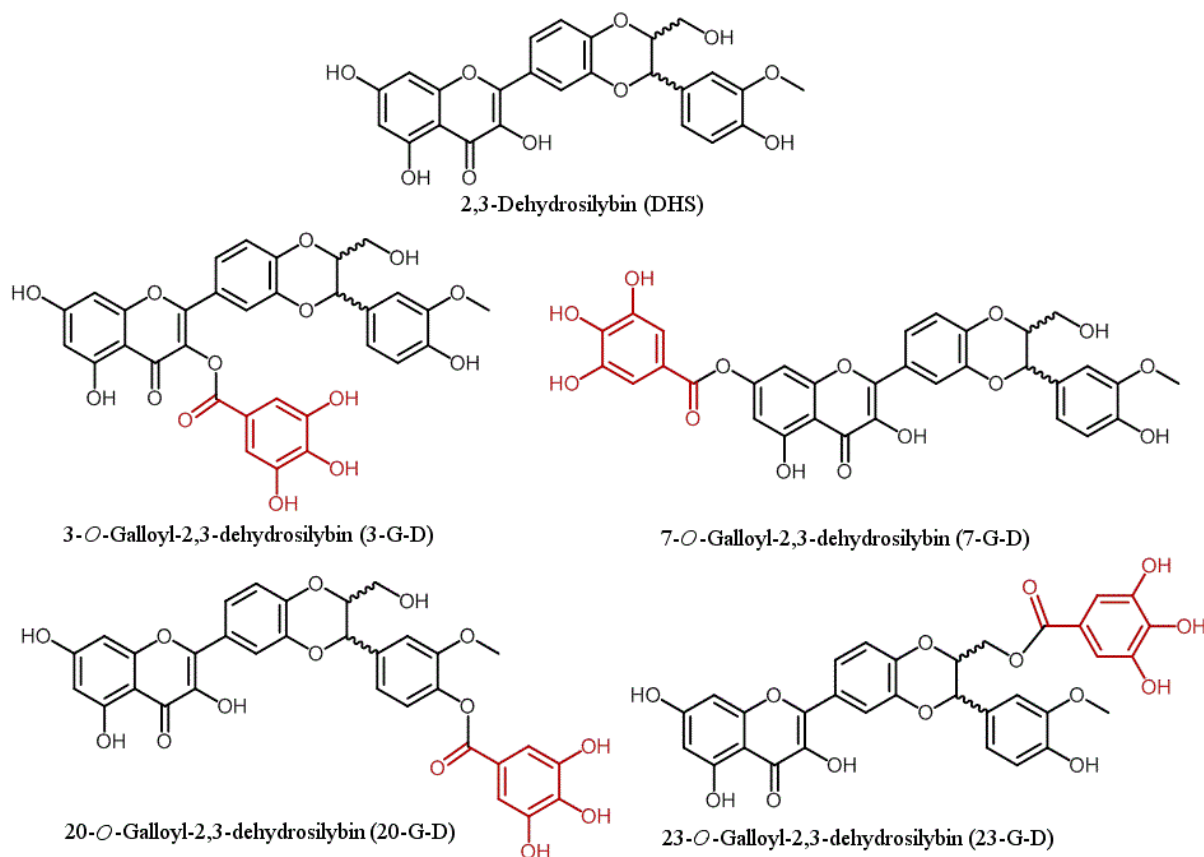
Analýza buněčného cyklu byla provedena na základě „Nicoletti assay“ [188]. Ke konfluentním THP-1 buňkám na 24-jamkové desce byly přidány testované látky naředěné v kultivačním médiu, tak aby jejich výsledná koncentrace byla 50 μM . Buňky byly po 6 a 24 hodinové inkubaci s látkami sesbírány, promyty roztokem PBS a centrifugovány 5 minut při 200 g, RT. Po centrifugaci byl pelet rozsuspendován v PBS, zafixován 70% ethanolem na ledu a ponechán přes noc při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Další den byly zafixované buňky centrifugovány při 400 g, 5 minut při RT. Po centrifugaci byl odstraněn ethanol, buňky byly promyty roztokem PBS, centrifugovány při 400 g, 5 minut při RT a barveny roztokem propidium jodidu FxCycle™ PI/RNase Staining Solution, Molecular Probes. Pro zajištění specifity barvení DNA byla RNA ve vzorcích odstraněna enzymaticky pomocí RNasy.. Analýza vzorků (5000 buněk na vzorek) byla provedena mikrokapilárním průtokovým cytometrem a výsledky byly zpracovány programem Guava InCyte.

4.4.3 Statistika

Výsledky vlivu látek na vyvolání apoptosy a vliv látek na buněčný cyklus byly vyjádřeny jako průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Statistické vyhodnocení bylo provedeno použitím Studentova *t*-testu. Hodnoty IC_{50} byly vyhodnoceny automaticky softwarem Guava InCyte. Rozdíly mezi průměry byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***)

5 Výsledky

V obrázku 29 je znázorněn DHS a jeho 4 galloylderiváty, které byly použity v našich studiích.



Obrázek 29 – Struktury 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloylderivátů. V závorce jsou uvedeny zkratky látek ve shodě s tabulkou 1. Upraveno dle Pivodová et al., 2016 [312].

5.1 *In vitro* studium vlivu 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na endotelové buňky HUVEC

5.1.1 Hodnocení cytotoxicity (MTT test)

K posouzení cytotoxicity testovaných látek po 24 hodinách byla stanovena hodnota IC_{50} , tj. koncentrace látky snižující mitochondriální redukci MTT o 50 %. Hodnoty IC_{50} pro látky 7-G-D a 23-G-D ($3,4 \pm 0,2 \mu M$ a $4,3 \pm 0,4 \mu M$) naznačují, že galloylace hydroxylových skupin v pozici C-7 a C-23 výrazně zvyšují cytotoxicitu v porovnání se strukturou DHS. Hodnota IC_{50} pro látku 20-G-D byla srovnatelná s hodnotou pro DHS (zhruba 3–4× vyšší než u 7- a 23-G-D). Nejnižší cytotoxicitu pak vykazoval 3-*O*-galloylderivát (3-G-

D), v jehož případě byla hodnota IC_{50} $18,9 \pm 1,4 \mu\text{M}$. Cytotoxicita galloylovaných derivátů se snižovala v pořadí 7-G-D > 23-G-D > 20-G-D > 3-G-D (Tab. 1).

5.1.2 Hodnocení buněčného růstu (MTT test)

K hodnocení vlivu testovaných látek na proliferaci HUVEC po 72 hodinové inkubaci byla stanovena hodnota IC_{50} , tj. koncentrace látky snižující mitochondriální redukci MTT o 50 %. Hodnoty IC_{50} pro látky DHS a 23-G-D byly velmi podobné a tyto dvě látky tedy vykazovaly podobný vliv na růst buněk. Nejvyšší antiproliferační aktivita ze všech látek byla pozorována v případě 7-O-galloyl-2,3-dehydrosilybinu (7-G-D), kdy byla hodnota IC_{50} $1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Nejméně aktivní (7× vyšší hodnota IC_{50} oproti 7-O-galloyl derivátu) byly látky 3-G-D a 20-G-D. Inhibiční efekt na proliferaci HUVEC v řadě galloyl derivátů se snižoval v pořadí 7-G-D > 23-G-D > 20-G-D > 3-G-D (Tab. 1).

5.1.3 Hodnocení buněčné migrace („Wound scratch assay“)

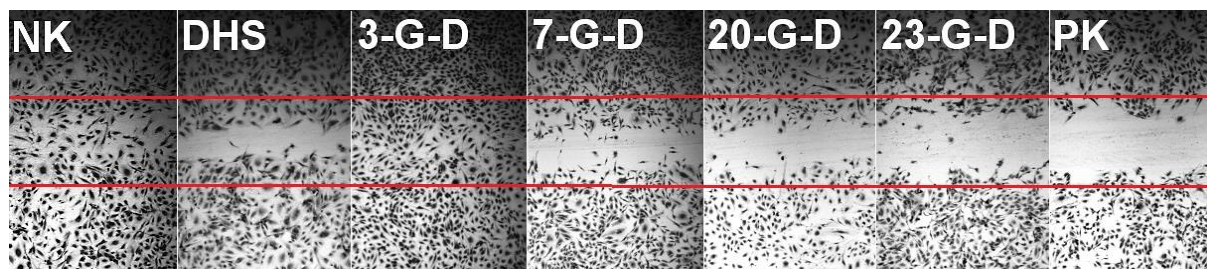
Pro hodnocení vlivu testovaných látek na migraci HUVEC po 16–20 hodinách byla stanovena hodnota IC_{50} , tj. koncentrace látky snižující mitochondriální redukci MTT o 50 %. Všechny testované látky inhibovaly migraci HUVEC (Tab. 1, Obr. 30). V případě látky 3-G-D byla hodnota IC_{50} relativně vysoká, $36,8 \pm 2,7 \mu\text{M}$, a byla tak zhruba 8× vyšší než u 7-O-galloyl derivátu (7-G-D), který s hodnotou $IC_{50} = 4,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ inhiboval migraci nejaktivněji (Obr. 31). Látky DHS, 20-G-D a 23-G-D vykazovaly podobnou antimigrační aktivitu s hodnotami IC_{50} $12,2 \pm 0,6$, $11,9 \pm 0,4$ a $8,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$, v tomto pořadí (Tab. 1).

VÝSLEDKY

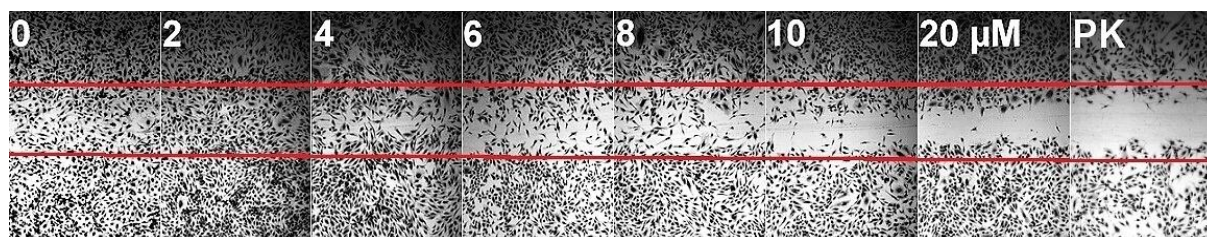
Tabulka 1 – Vliv 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na životaschopnost, proliferaci a migraci buněk HUVEC.^a

Látka		Cytotoxicita	Proliferace	Migrace
SB	Silybin	73,6 ± 4,2 ^{e,α}	10,0 ± 0,1 ^{e,α}	> 50 μM ^{e,α}
DHS	2,3-dehydrosilybin	12,0 ± 1,3 ^β	5,4 ± 0,2 ^β	12,2 ± 0,6 ^β
3-G-D	3- <i>O</i> -galloyl-2,3-dehydrosilybin	18,9 ± 1,4 ^γ	11,7 ± 0,8 ^ε	36,8 ± 2,7 ^ε
7-G-D	7- <i>O</i> -galloyl-2,3-dehydrosilybin	3,4 ± 0,2^η	1,6 ± 0,2^ζ	4,7 ± 0,3^ζ
20-G-D	20- <i>O</i> -galloyl-2,3-dehydrosilybin	11,5 ± 1,2 ^β	11,3 ± 0,5 ^ε	11,9 ± 0,4 ^β
23-G-D	23- <i>O</i> -galloyl-2,3-dehydrosilybin	4,3 ± 0,4 ^η	4,0 ± 0,3 ^δ	8,2 ± 0,4 ^δ

^aVšechny výsledky jsou uvedeny jako IC₅₀ (μM; průměr ± SE ze tří nezávislých experimentů provedených v tripletu). Hodnoty v rámci stejného sloupce značené stejným řeckým písmenem nebyly signifikantně rozdílné ($p < 0,05$). Hodnoty vyznačené tučně vyjadřují nejaktivnější látku v rámci daného testu.



Obrázek 30 – Efekt DHS a jeho galloyl derivátů (v koncentraci 10 μM) na migraci buněk HUVEC po 16–20 hodinách. Negativní kontrolou byly buňky v kultivačním médiu s DMSO (NK). Pozitivní kontrolou byly buňky v bezsérovém DMEM médiu bez přidavku růstových faktorů (PK). Zkratky látek v obrázku odpovídají zkratkám látek v tabulce 1. Červené linie odpovídají rýze po jejím vytvoření.



Obrázek 31 – Koncentračně závislý efekt 7-*O*-galloyl-2,3-dehydrosilybinu na migraci buněk HUVEC po 16–20 hodin. Negativní kontrolou byly buňky v kultivačním médiu

VÝSLEDKY

s DMSO (0 μM). Pozitivní kontrolou byly buňky v bezsérovém DMEM médiu bez přidavku růstových faktorů (PK). Čísla v obrázku vyjadřují koncentraci látky v μM . Červené linie odpovídají rýze po jejím vytvoření.

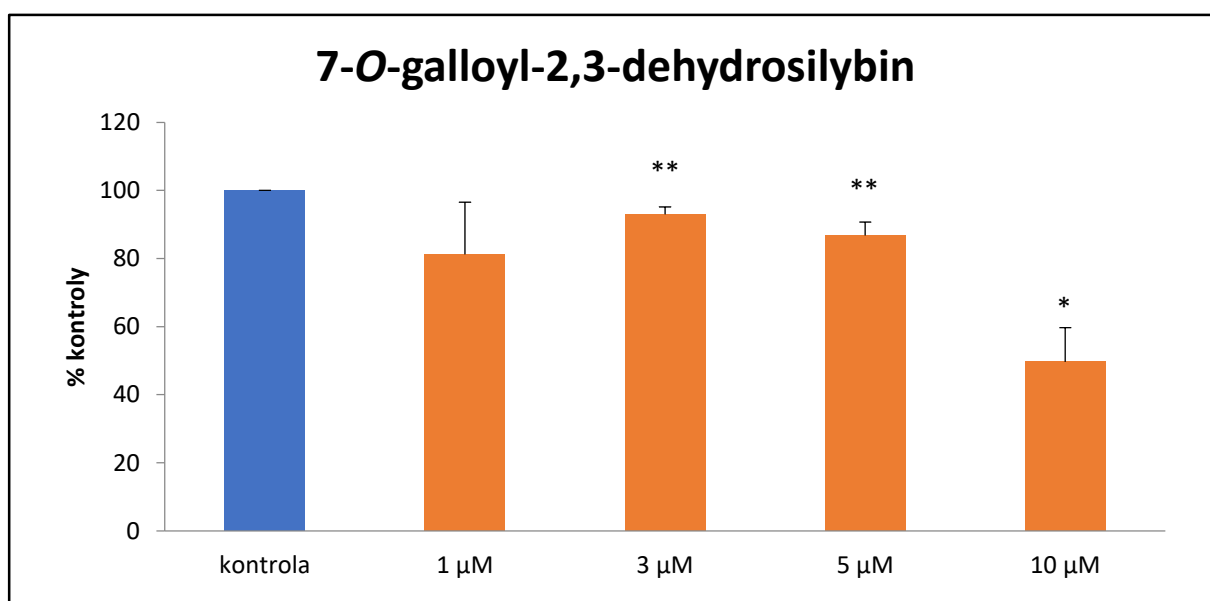
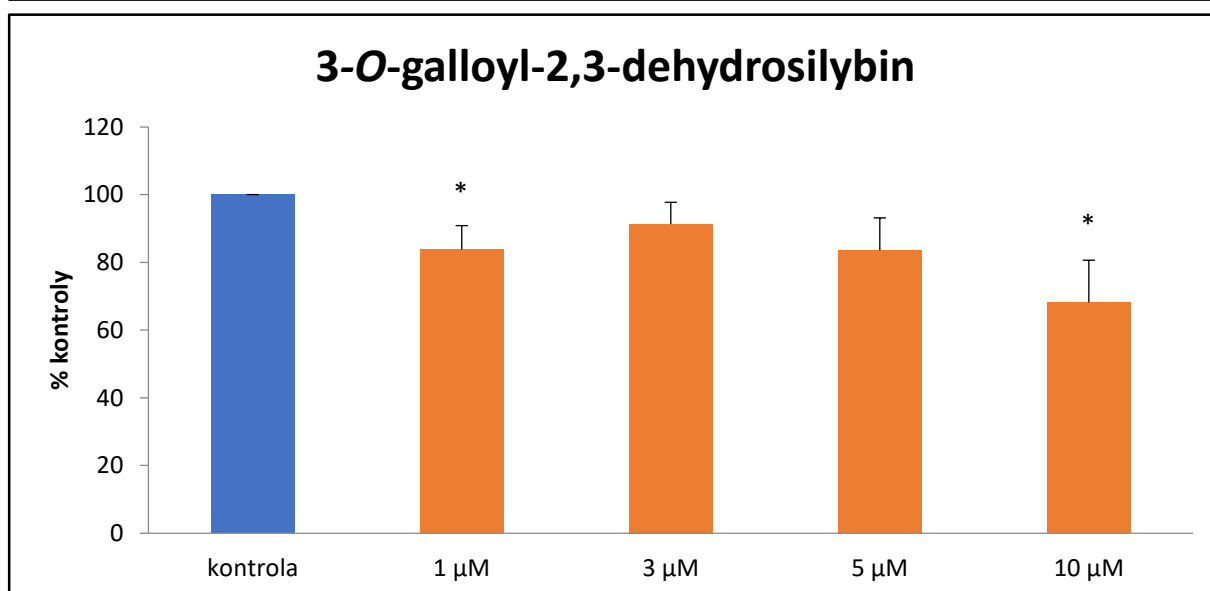
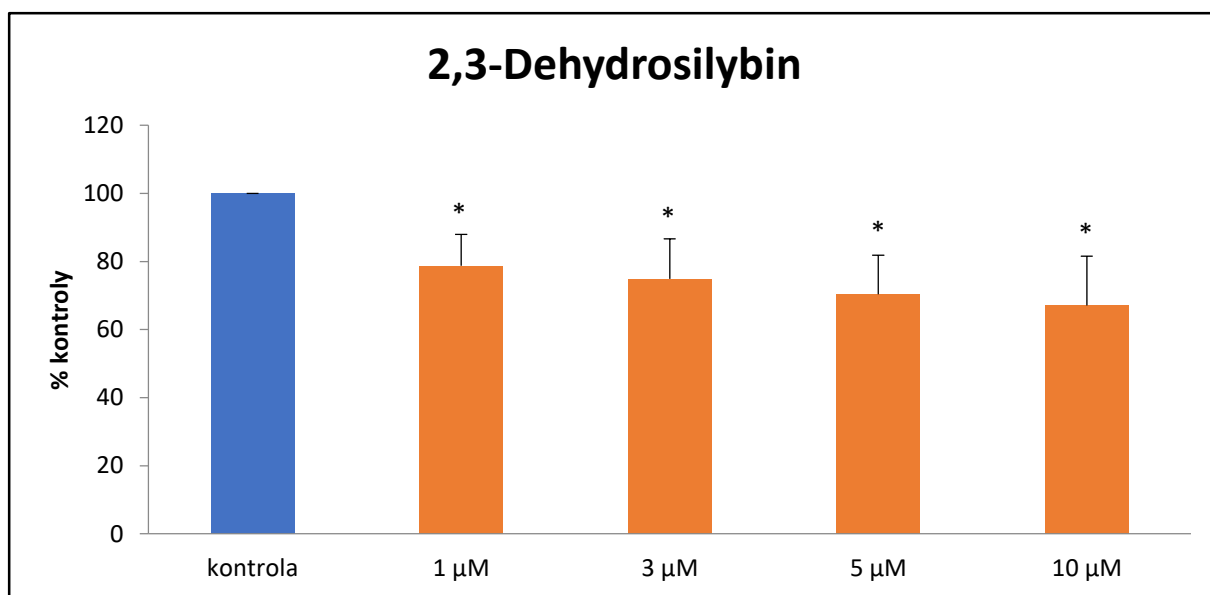
5.2 *In vitro* studium vlivu 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl derivátů na endotelové buňky HMEC-1

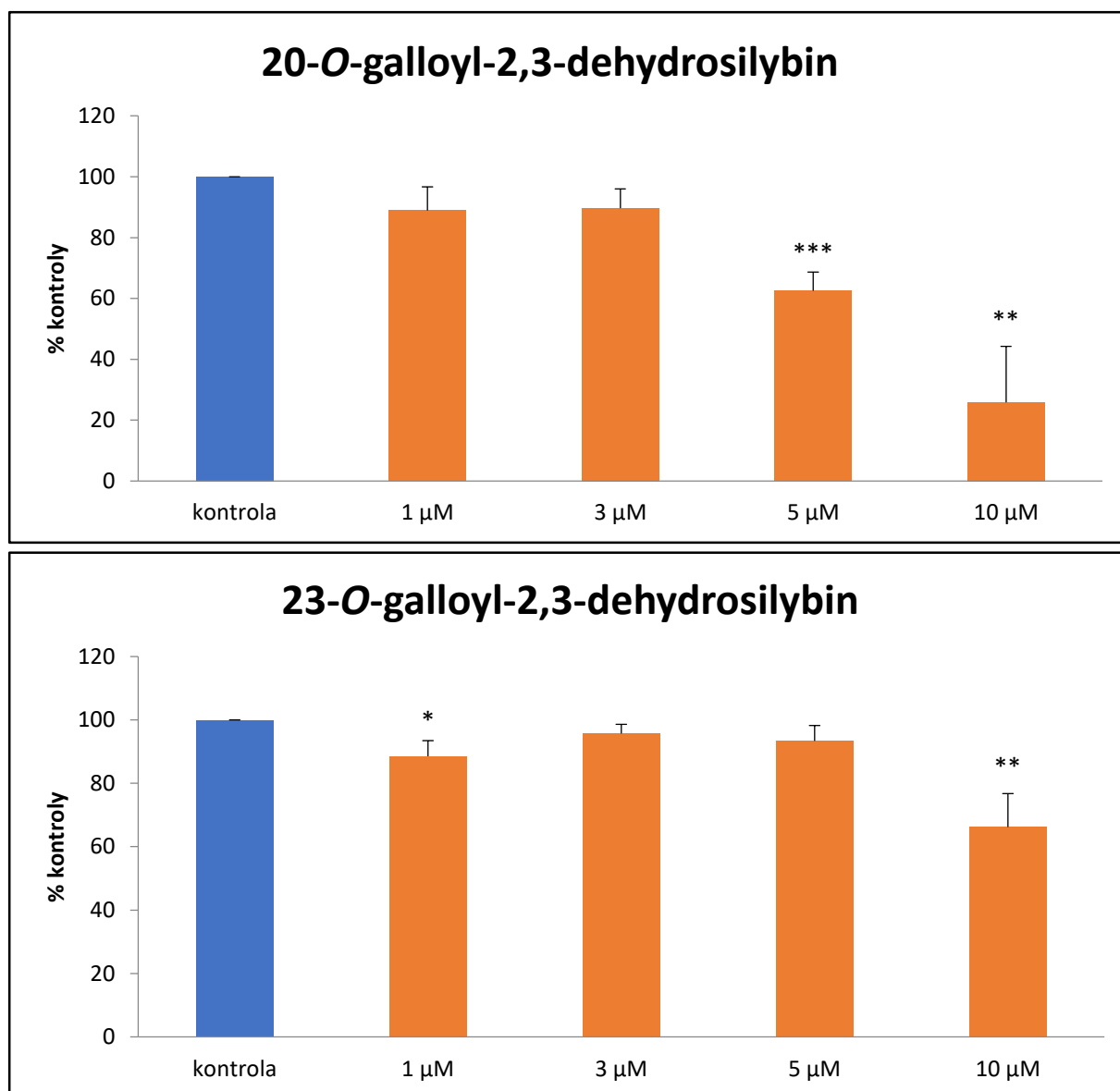
5.2.1 Hodnocení buněčné proliferace

Na základě MTT testu provedeného na buňkách HUVEC v rámci našich předchozích experimentů (data nejsou v práci zahrnuta) byly pro testování na buňkách HMEC-1 použity koncentrace látek nižší než IC_{50} pro DHS (0, 1, 3, 5 a 10 μM). Aby bylo možné data srovnat, ostatní látky byly testovány ve stejných koncentracích.

Buněčná proliferace byla studována po 72 hodinové inkubaci látek s buňkami v souladu s NCI (National Cancer Institute) protokolem pro angiogenezi. Všechny testované látky snižovaly růst HMEC, ovšem pouze DHS a 20-G-D snižovaly růst těchto buněk koncentračně závislým způsobem (Obr. 32). Největší snížení růstu buněk HMEC bylo pozorováno po inkubaci s 20-G-D v koncentracích 5 a 10 μM , přičemž koncentrace 5 μM , vykazovala statisticky neprůkaznější efekt (Obr. 32).

Koncentrace 5 a 10 μM byly na základě studia proliferace vybrány pro další testování antiangiogenní aktivity látek na HMEC.





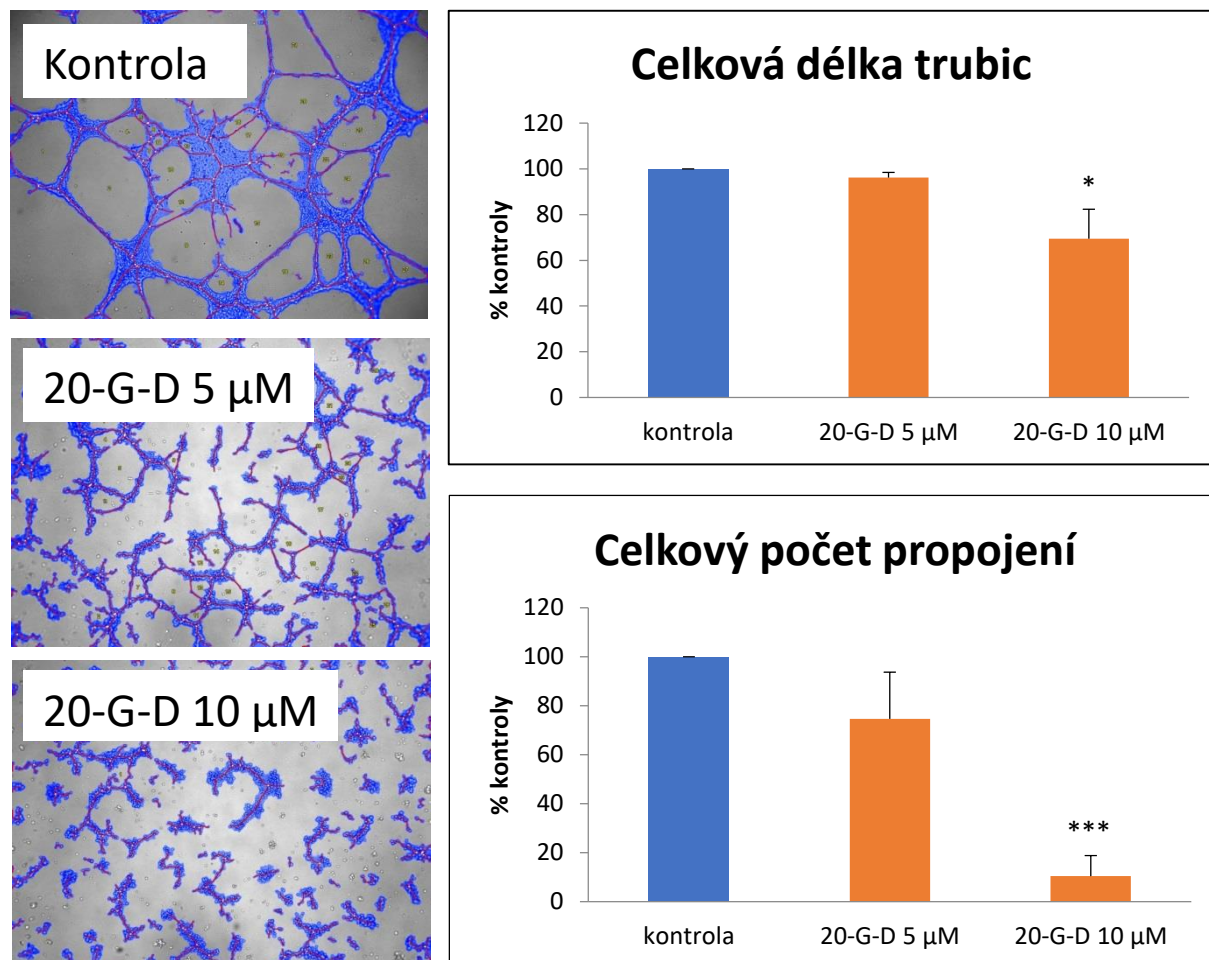
Obrázek 32 - Vliv 2,3-dehydrosilybinu a jeho galloyl esterů na proliferaci buněk HMEC po 72 hodinách. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikantní snížení oproti kontrole). Kontrolou byly buňky v kulturačním médiu bez přídavku testovaných látek.

5.2.2 Diferenciace buněk (test tvorby trubic)

Při testování buněčné diferenciace se ukázalo, že ze všech testovaných látek inhiboval tvorbu tubulární struktury HMEC-1 pouze 20-G-D v koncentracích 5 a 10 μM (Obr. 33). V koncentraci 10 μM tato látka signifikantně snižovala celkovou délku trubic a celkový počet propojení buněk v porovnání s kontrolou (Obr. 33). Ostatní látky neměly v testovaných koncentracích na tvorbu trubic signifikantní vliv (data nejsou uvedena).

VÝSLEDKY

Na základě těchto výsledků byl pro další testování antiangiogenní aktivity použit pouze 20-G-D.



Obrázek 33 - Vliv 20-O-galloyl-2,3-dehydrosilybinu na tvorbu trubic HMEC-1 po 16–20 hodinách. Buňky byly preinubovány s 20-G-D po dobu 24 hodin. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátu (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, signifikantní snížení oproti kontrole). Kontrolou byly buňky v kultivačním médiu bez přídavku 20-G-D.

5.2.3 Analýza buněčného cyklu a apoptosy pomocí průtokové cytometrie

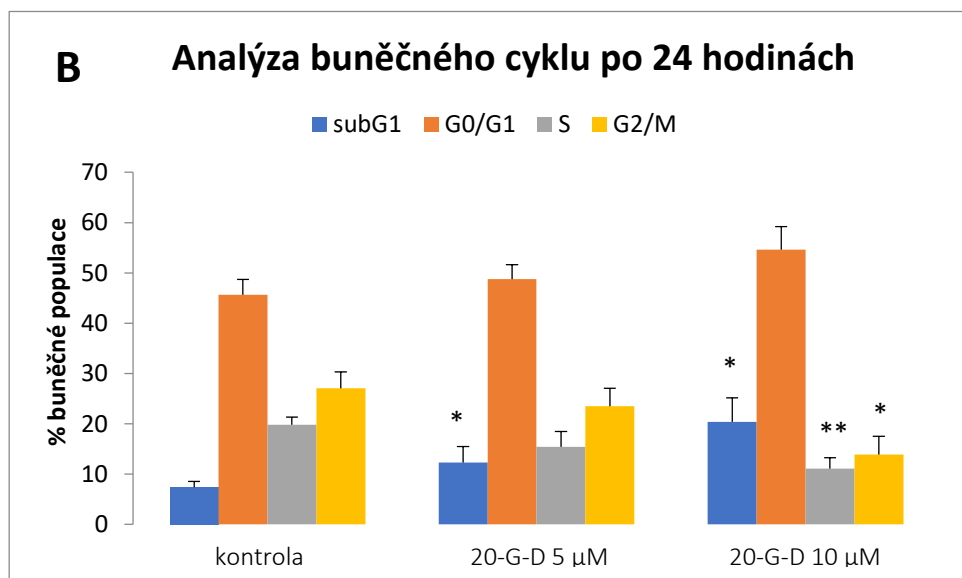
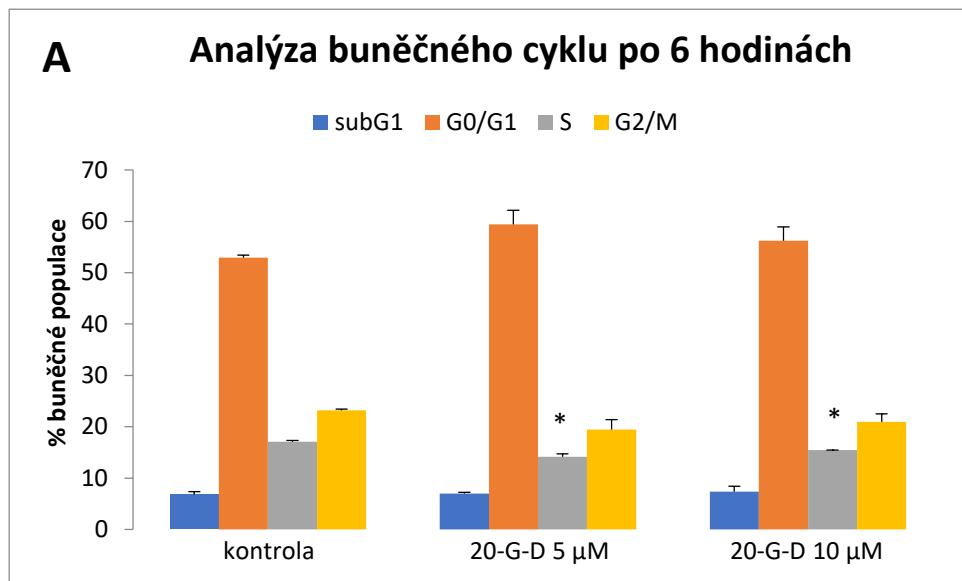
Ovlivnění buněčného cyklu buněk HMEC-1 látkou 20-G-D bylo sledováno pomocí průtokové cytometrie po 6, 24 a 48 hodinové inkubaci.

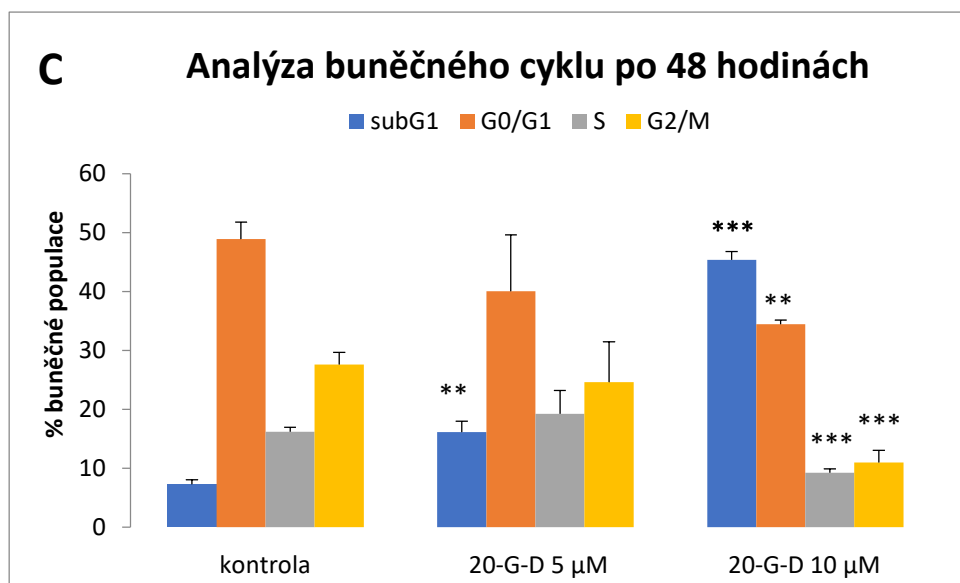
Po 6 hodinách 20-G-D v koncentracích 5 a 10 μ M signifikantně snižoval počet buněk v S fázi v porovnání s kontrolou (Obr. 34).

VÝSLEDKY

Po 24 hodinách způsobil v obou použitých koncentracích výrazné zvýšení počtu apoptotických buněk v sub-G1 fázi a navíc v koncentraci 10 μM významně snižoval počet buněk v S a G2/M fázi ve srovnání s kontrolou (Obr. 34).

Také po 48 hodinách v obou testovaných koncentracích vyvolal 20-G-D významný zvýšení počtu apoptotických buněk v sub-G1 fázi (které bylo výraznější po 24 hodinách) a v koncentraci 10 μM významně snížil zastoupení počtu buněk v G0/G1, S a G2/M fázích v porovnání s kontrolou (Obr. 34).

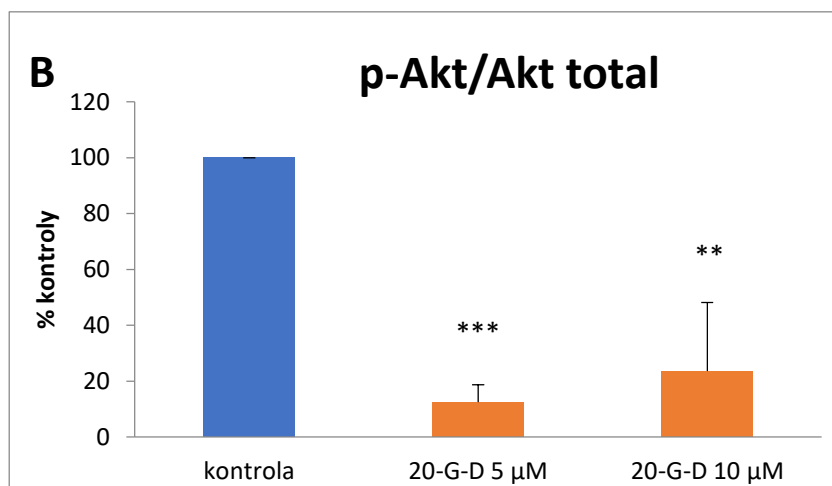
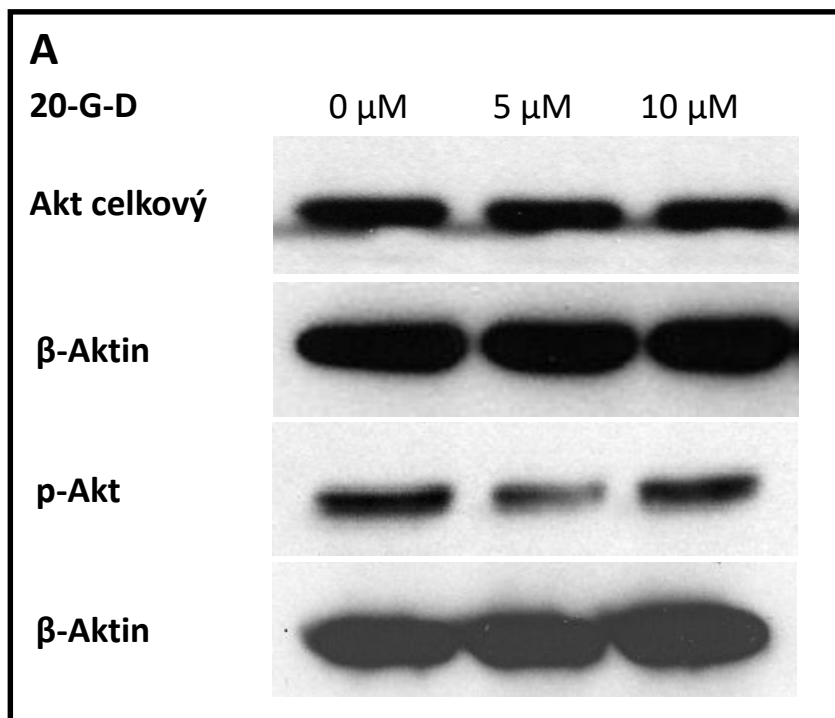


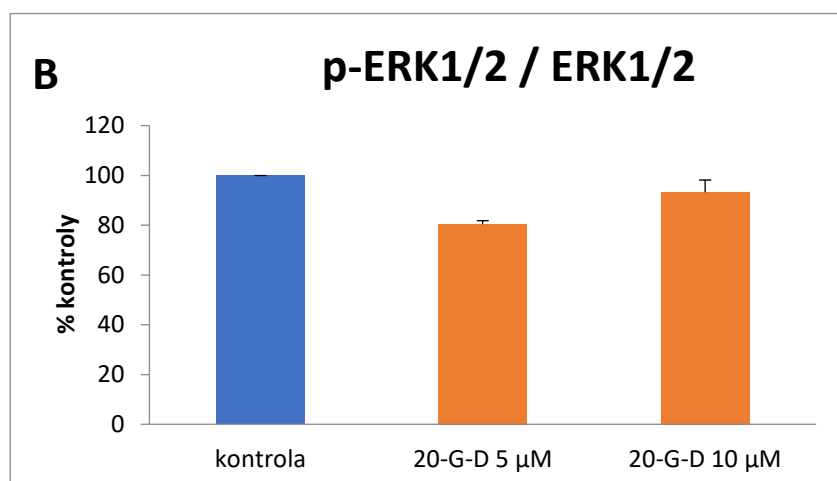
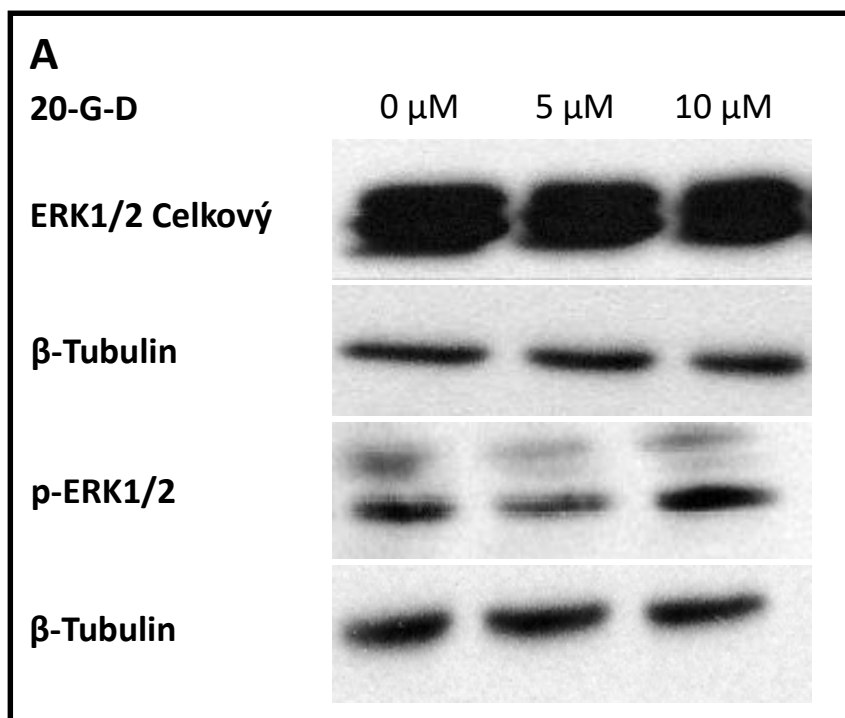


Obrázek 34 - Analýza buněčného cyklu a apoptozy HMEC-1. HMEC-1 byly inkubovány s 20-*O*-galloyl-2,3-dehydrosilybinem (5 μM a 10 μM) po dobu 6 (A), 24 (B) a 48 (C) hodin. Grafy předkládají rozdělení buněk v sub-G1, G0/G1, S a G2/M frakcích. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů provedených v duplikátu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, signifikantní snížení oproti kontrole). Kontrolou byly buňky v kultivačním médiu bez přísady 20-G-DHS.

5.2.4 Vliv 20-G-D na fosforylaci Akt a ERK1/2

Fosforylace Akt a ERK1/2 byla stanovena použitím Western blottingu po 6 hodinové inkubaci látek s buňkami. 20-G-D nevykazoval při porovnání s kontrolou vliv na fosforylaci ERK1/2 v žádné z testovaných koncentrací (Obr. 35). V koncentraci 5 a 10 μM ovšem 20-G-D signifikantně snižoval fosforylaci Akt. Největší vliv na fosforylaci Akt byl u této látky pozorován v koncentraci 5 μM (Obr. 35).





Obrázek 35 - Vliv 20-O-galloyl-2,3-dehydrosilybinu na fosforylaci Akt a ERK1/2 u HMEC-1 po 6 hodinách. (A) Reprezentativní western blott ze tří (ERK1/2), či čtyř (Akt) nezávislých experimentů. Proteiny v celých buněčných lyzátech (25 μ g/jamku) byly analyzovány Western blottingem a Akt, aktin, ERK1/2 a tubulin byly vizualizovány chemiluminiscenční detekcí. (B) Expresa Akt a ERK1/2 proteinu byla určena denzitometrickou analýzou. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze čtyř nezávislých experimentů (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, signifikantní snížení oproti kontrolním buňkám). Kontrolou byly buňky v kultivačním médiu bez přísady 20-G-D.

5.3 Vliv 2,3-dehydrosilybinu jeho galloylderivátů na apoptosu a buněčný cyklus vybraných nádorových linií

5.3.1 Sledování apoptosu buněk po 24 hodinovém působení látek

Byla sledována schopnost vybraných látek vyvolat apoptosu u lidských nádorových buněčných linií THP-1 a NTERA-2. Pro srovnání byly testy provedeny také u nenádorové linie lidských fibroblastů BJ. Konkrétně byly testovány DHS a jeho galloyl estery, dále silybin, čisté stereoisomery SB a DHS, a také kyselina gallová, jejíž zbytek je součástí galloyl esterů. Ke zjištění optimálního rozsahu koncentrací látek byl nejprve proveden screening vlivu látek na apoptosu za použití koncentrací v oblasti jejich cytotoxického účinku na endotelové buňky. Vhodná koncentrační rozmezí látek pak byla použita pro určení hodnot IC_{50} každé látky (koncentrace látky schopná vyvolat apoptosu u 50 % buněk).

Buněčná linie THP-1

U buněčné linie THP-1 byly nejméně aktivními látky 3-G-D, 20-G-D s hodnotami IC_{50} vyššími než 50 μM . DHS a jeho čisté stereoisomery, 7-G-D a 23-G-D s hodnotami IC_{50} mezi 9,6 a 15 μM vykazovaly vysokou schopnost vyvolat apoptosu. Nicméně nejvyšší aktivita byla naměřena pro B stereoisomer DHS (Tab. 2).

Buněčná linie NTERA-2

V případě buněčné linie NTERA-2 byl nejméně aktivní látkou SB A s hodnotou IC_{50} 90 μM . Naopak nejméně aktivními látkami byly 7-G-D a 23-G-D s hodnotami IC_{50} 9,4 a 8,6 μM . Ostatní testované látky měly hodnoty IC_{50} v rozmezí od 12 do 44 μM a vykazovaly tak středně vysokou aktivitu (Tab. 2).

Buněčná linie BJ

Hodnoty IC_{50} pro vliv látek na buněčnou linii BJ nejsou v tabulce 2 uvedeny, protože u těchto buněk, s výjimkou kyseliny gallové, nebylo zjištěno vyvolávání apoptosu. Kyselina gallová vyvolávala při nejvyšší použité koncentraci (60 μM) apoptosu u $77,3 \pm 2,8$ % buněk a hodnota IC_{50} byla 21 μM (Tab. 2).

Tabulka 2 – Vliv látek na apoptosu buněčných linií THP-1, NTERA-2 a BJ po 24 hodinách. Schopnost vyvolat apoptosu je vyjádřena jako hodnota IC_{50} (koncentrace látky vyvolávající apoptosu u 50 % buněk). V tabulce jsou uvedena také procenta apoptosu u nejvyšší použité koncentrace. V případě některých látek nebyl software

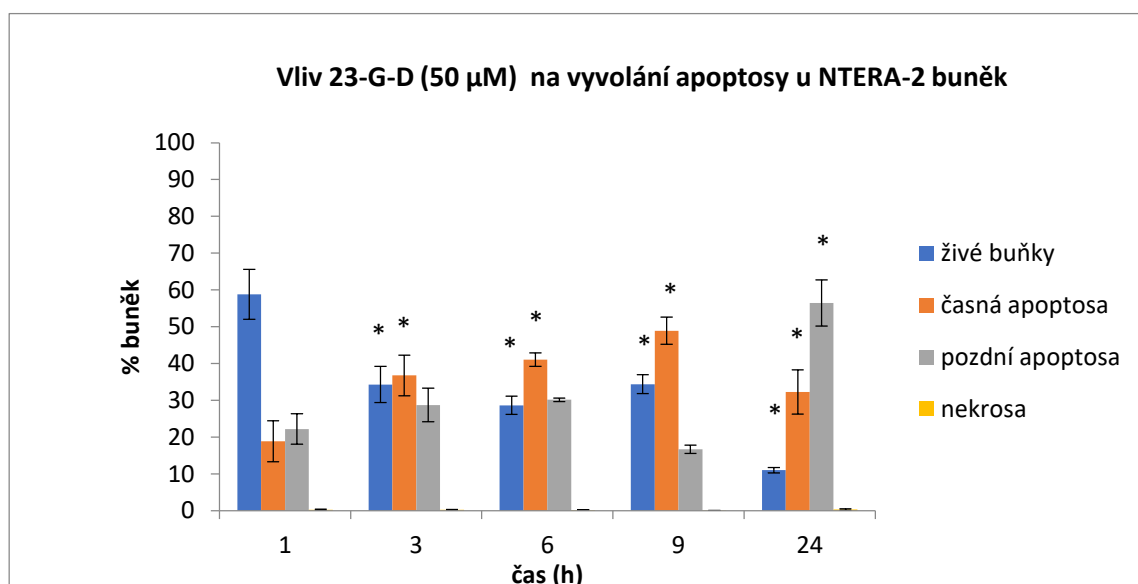
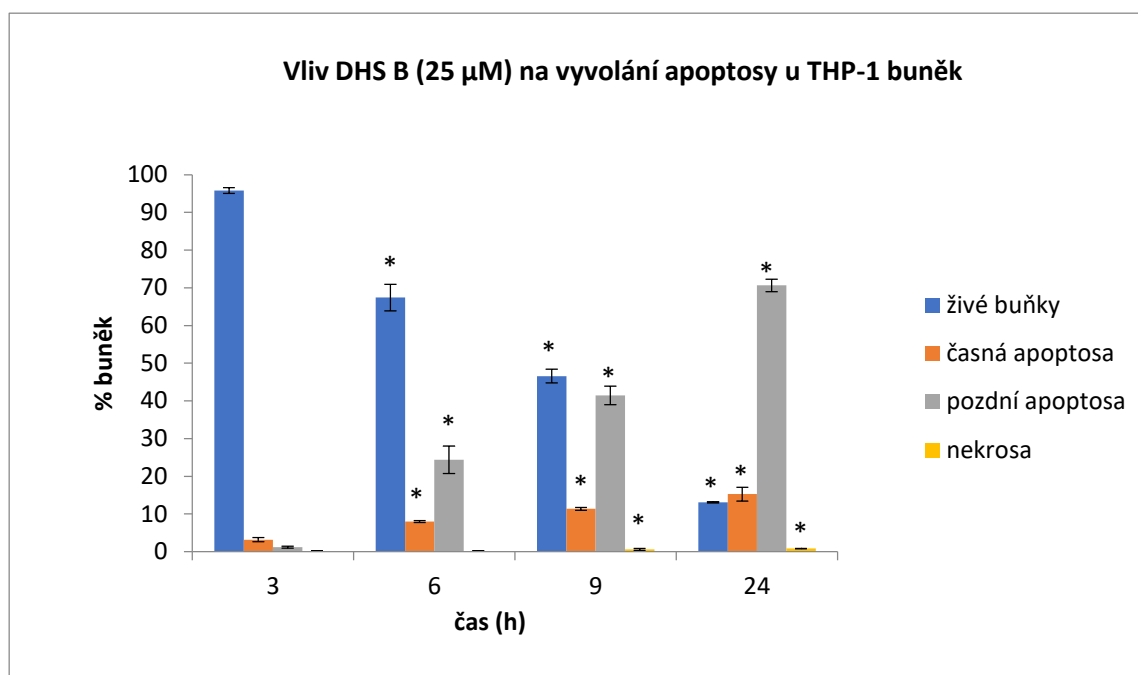
VÝSLEDKY

(Guava InCyte software (GuavaSoft 2.7, Millipore/Merck, Ca, USA)) schopen hodnoty IC_{50} z křivky závislosti aktivity na koncentraci vypočítat, nebo byly tyto hodnoty vyšší než 100 μM . V případě BJ buněk byla hodnota IC_{50} určena pouze pro kyselinu gallovou.

Látka	Buněčná kultura								
	THP-1			NTERA			BJ		
	IC_{50} (μM)	% apoptosy	c (μM)	IC_{50} (μM)	% apoptosy	c (μM)	IC_{50} (μM)	% apoptosy	c (μM)
SB A		15,2 ± 2,1	100 μM	90	56,9 ± 13,1	100 μM			
SB B		17,9 ± 1,7	100 μM	35	69,7 ± 9,0	100 μM			
SB A+B		13,4 ± 21,5	100 μM	44	76,5 ± 4,1	100 μM			
DHSB A	11	70,6 ± 2,0	60 μM	17	22,4 ± 2,3	100 μM			
DHSB B	9,6	70,6 ± 6,1	60 μM	12	28,2 ± 1,3	100 μM			
DHSB A+B	15	68,7 ± 4,5	60 μM	35	89,6 ± 5,0	100 μM			
GA		18,1 ± 1,8	100 μM	19	88,0 ± 2,5	60 μM	21	77,3 ± 2,8	60 μM
3G-DHSB	150	53,7 ± 6,4	100 μM	15	89,6 ± 2,4	60 μM			
7G-DHSB	11	93,6 ± 2,3	50 μM	9,4	91,8 ± 0,9	60 μM			
20G-DHSB	58	62,5 ± 2,7	100 μM	16	59,8 ± 2,0	60 μM			
23G-DHSB	11	85,6 ± 1,8	50 μM	8,6	88,8 ± 0,5	60 μM			

5.3.2 Stanovení časové závislosti apoptosy buněčných linií po působení látek.

Byl studován vliv vybraných látek na vyvolání apoptosy při jejich působení po různě dlouhou dobu (Obr. 36). Testování probíhalo na buňkách NTERA-2 a THP-1 a jako modelové látky byly vybrány DHS B pro kulturu THP-1 a 23-G-DHS B pro kulturu NTERA-2. V případě buněk NTERA-2 docházelo k výrazné aktivaci již po první hodině inkubace buněk s látkami, kdežto u buněčné linie THP-1 až po delším působení těchto látek (Obr. 36).



Obrázek 36 – časově závislé působení vybraných látek na nádorové buněčné linie. Grafy zobrazují procentuální zastoupení buněk ve 4 rozdílných fázích – živé buňky, buňky časně apoptotické, pozdně apoptotické a nekrotické - v rozdílných časech po přidání látky k buňkám. V případě DHS B jsou výsledky u všech časů pro 25 μ M koncentraci, v případě 23-G-D pak u 1, 3, 6 a 9 hodin pro 50 μ M a u 24 hodin pro 60 μ M koncentraci (hodnoty velmi podobné hodnotám při 50 μ M koncentraci). * $p < 0,05$ vyjadřuje signifikantní změnu. Každá ze čtyř fází je hodnocena zvlášť (v rámci daného grafu) a hodnoty jsou vždy vztaženy k hodnotě nejkratšího času inkubace.

5.3.3 Měření buněčného cyklu THP-1 buněk

K potvrzení, že jsou látky (SB, DHS a jejich čisté stereoisomery, GA a galloyl estery DHS) schopny vyvolat právě proces apoptozy byla sledována akumulace buněk THP-1 v sub-G1 fázi po jejich 6 a 24 hodinové inkubaci s látkami.

Po 6 hodinové inkubaci buněk s látkami nedošlo při srovnání s kontrolou ke zvýšené akumulaci buněk v sub-G1 fázi. Zvýšení množství buněk v sub-G1 fázi se však projevilo v případě 24 hodinové inkubace buněk s látkami. Signifikantní efekt byl pozorován u DHS a jeho obou stereoisomerů, 7-G-D a 23-G-D, kdy procentuální zastoupení apoptotických buněk bylo $19,2 \pm 8,4$ a $24,6 \pm 1,9$ %, v tomto pořadí (Tab. 3)

Tabulka 3 – Vliv vybraných látek na procentuální zastoupení buněk THP-1 v různých fázích buněčného cyklu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty procentuálního zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu buněk THP-1 po 6 a 24 hodinové inkubaci s vybranými látkami. Tučně jsou označeny nejvyšší hodnoty procentuálního zastoupení buněk v sub-G1 fázi (apoptotické buňky). Kontrolou byly buňky v kultivačním médiu bez přídavku látek.

% apoptosy	6 hodin				24 hodin			
	Látka (50 μ M)	sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S
SB A	0,2 \pm 0,1	63,9 \pm 0,6	14,3 \pm 4	24,6 \pm 4,3	0,7 \pm 0,1	78,1 \pm 7,4	12,9 \pm 5,9	8,2 \pm 1,4
SB B	0,4 \pm 0,1	65 \pm 1,5	13,3 \pm 2,3	21,3 \pm 1,6	0,6 \pm 0,3	77,2 \pm 5,4	13,3 \pm 6,5	8,9 \pm 1,4
SB	0,4 \pm 0,1	60,3 \pm 3,4	14,1 \pm 0,6	25,2 \pm 3,7	1 \pm 0	70,3 \pm 2,5	9,3 \pm 2,2	19,3 \pm 0,3
DHS A	0,5 \pm 0,2	68,1 \pm 3,0	11,9 \pm 0,8	19,5 \pm 2,3	6,8 \pm 2,5	66,8 \pm 5,3	13,4 \pm 2,2	12,9 \pm 2,6
DHS B	0,6 \pm 0,4	70,1 \pm 3,2	13,0 \pm 4,2	16,3 \pm 7,6	6,1 \pm 0,9	66,6 \pm 1,5	14,6 \pm 1,8	12,7 \pm 4,3
DHB	1,1 \pm 0,1	63,2 \pm 3,6	14,4 \pm 0,8	21,2 \pm 3,9	12,5 \pm 2,3	60,7 \pm 1,1	15,3 \pm 1,0	11,5 \pm 1,6
GA	0,4 \pm 0,2	67,2 \pm 3,4	13,3 \pm 2,9	19 \pm 5,7	0,5 \pm 0,4	75,4 \pm 4,1	11,9 \pm 3,9	12,1 \pm 0,7
3-G-D	0,4 \pm 0,2	59,4 \pm 1,2	15,9 \pm 0	24,2 \pm 1,5	3,8 \pm 1,5	58 \pm 4,6	22,1 \pm 4,8	16,1 \pm 9,7
7-G-D	0,8 \pm 0,4	74 \pm 1,8	12,1 \pm 0,8	13,1 \pm 2,3	19,2 \pm 8,4	60,3 \pm 5,3	13,7 \pm 0,3	6,9 \pm 3,5
20-G-D	0,3 \pm 0,3	69,6 \pm 2,1	15,7 \pm 3,2	14,4 \pm 3,1	0,9 \pm 0,3	62,8 \pm 5,4	15,6 \pm 1,7	20,7 \pm 6,1
23-G-D	0,7 \pm 0,1	72,1 \pm 9	12,3 \pm 3,1	14,8 \pm 5,9	24,6 \pm 1,9	55,2 \pm 2,1	14,1 \pm 1,1	6 \pm 1,1
Kontrola	0,6 \pm 0,2	66,5 \pm 5,0	13,5 \pm 2,1	19,5 \pm 3,6	0,7 \pm 0,4	68,8 \pm 4,6	13,7 \pm 4,9	16,8 \pm 6,8

6 Diskuze

V předložené disertační práci byly studovány polyfenolické látky. Konkrétně jsme se zaměřili na flavonolignan silymarinu. U flavonolignanů, lignanů a některých flavonoidů byl prokázán účinek v gastrointestinálním traktu [313], a proto jsou tyto látky atraktivní pro studium.

Z flavonolignanů silymarinu jsme se zaměřili především na 2,3-dehydrosilybin, který je sice minoritní složkou, ale má výraznou biologickou aktivitu *in vitro* [310]. Rovněž byly studovány jeho deriváty s obsahem zbytku kyseliny gallové ve skeletu, jelikož přírodní produkty obecně nemají vhodné fyzikálně chemické vlastnosti a je tak zapotřebí z důvodu vylepšení účinnosti, selektivity a farmakokinetických vlastností vytvářet jejich syntetická analoga [310].

U testovaných látek jsme sledovali jejich vliv na endotelové buňky, respektive antiangiogenní vlastnosti, a dále jejich vliv na apoptosu a buněčný cyklus u vybraných nádorových linií.

6.1 Vliv látek na endotelové buňky HUVEC

2,3-dehydrosilybin vykazoval oproti silybinu, který byl studován již dříve [314], signifikantně vyšší aktivitu v testech cytotoxicity, proliferace i migrace, což ukazuje na důležitou roli dvojně vazby v poloze 2,3 ve struktuře této skupiny flavonolignanů. Pokud je přítomna, dochází k vylepšení jejich biologických aktivit, což může být vysvětleno rozdílem v konformaci například právě mezi SB a DHS. Zatímco u molekuly silybinu dochází k silné distorzi (deformaci), přítomnost dvojně vazby u 2,3-dehydrosilybinu vede k planární konformaci flavonoidní části s vysokou delokalizací π -elektronů [315]. Nicméně přítomnost 2,3-dvojně vazby mění v porovnání se silybinem, vedle vlivu na konformaci také fyzikálně chemické vlastnosti 2,3-dehydrosilybinu. Příkladem může být zvýšení reaktivity hydroxylové skupiny na C-3 a případně i jeho kov-chelatujících vlastností (hydroxylová skupina na uhlíku C-3 2,3-dehydrosilybinu je schopna tvořit vodíkové vazby s karbonylem na C-4 a je tak typickou strukturou kov-chelatující látky).

Galloylované deriváty silybinu byly připraveny z důvodu vylepšení jeho antiangiogenního potenciálu [299]. Účinné koncentrace derivátů (10–20 μM) byly nicméně stále poměrně vysoké [300].

DISKUZE

Zavedení galloylové skupiny do molekuly 2,3-dehydrosilybinu v případě všech esterů (s výjimkou 3-*O*-galloyl-2,3-dehydrosilybinu) vedlo u HUVEC ke zvýšení cytotoxické, antiproliferační a antimigrační aktivity. S galloylderiváty byla porovnána samotná kyselina gallová, která měla na angiogenezi pouze nepatrný vliv s účinnou koncentrací 29 μM [316].

Různé galláty 2,3-dehydrosilybinu měly v rámci jednotlivých testů rozdílnou účinnost, byl však u nich pozorován podobný trend závislosti struktury na aktivitě jako v předchozí studii zaměřené na galláty silybinu [300]. Aktivní koncentrace derivátů 2,3-dehydrosilybinu, kterým se věnovala tato práce, byly ovšem značně nižší (viz Tab. 1) (například 3–7 \times pro 7-*O*-galloyl derivát), což tyto látky dělá slibnější v rámci dosažitelnosti účinné plazmatické hladiny pro případné využití v klinické praxi.

6.2 Antiangiogenní vlastnosti látek na buňkách HMEC-1

Cílem práce bylo sledovat antiangiogenní efekt látek po zavedení galloylové skupiny do jejich struktury, jelikož je známo, že přítomnost galloylové skupiny je důležitým předpokladem pro výrazné antiangiogenní vlastnosti, jak bylo prokázáno například u katechinů [300, 317].

Inhibice proliferace endotelových buněk může vést k potlačení angiogeneze a tak i rakoviny jako takové. Proliferaci endotelových buněk mohou inhibovat některé léky a přírodní látky [318]. Například byla publikována studie prokazující inhibici růstu HUVEC a HMEC po aplikaci silybinu (25, 50 a 100 μM) [319].

Díky skutečnosti, že DHS i jeho galloylderiváty potlačovaly růst HMEC, byla námi potvrzena antiproliferační aktivita těchto testovaných látek. Gažák et al., 2011 pozorovali ve své studii stejný efekt, kdy SB a jeho galloyl deriváty snižovaly proliferaci HUVEC [320].

Protože tvorba cévní sítě hraje rozhodující roli v hodnocení angiogeneze [321], bylo několik prací zaměřeno na testování potenciální inhibice tvorby trubic u endotelových buněk, kdy bylo po aplikaci různých látek zjištěno potlačení formování struktur podobných kapilárám [322-326]. Silymarin v koncentracích 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ také inhiboval tvorbu trubic HUVEC, SB v koncentračním rozmezí 25–100 μM potlačoval tvorbu trubic jak v případě HUVEC, tak HMEC [319, 327]. Přesto, že všechny námi studované látky inhibovaly tvorbu trubic, v testovaných koncentracích měl signifikantní vliv na inhibici tvorby trubic u HMEC pouze 20-G-D (podrobná data byla publikována v práci Pivodová et al., 2016) [312].

Dalším cílem pro chemoterapeutika je deregulace průběhu buněčného cyklu, ke které dochází u transformovaných buněk [261, 328]. Navíc může být vyvolání apoptosy využito

DISKUZE

k potlačení tvorby nových krevních cév a zastavení buněčného cyklu, což hraje roli v inhibici buněčného růstu [319].

Silymarin navodil apoptosu u HUVEC koncentračně závislým způsobem (50 a 100 $\mu\text{g/ml}$) [327] a inkubace se SB (25–100 μM) po dobu 24, 48 a 72 hodin způsobila u HUVEC i HMEC buněčnou smrt apoptosou [319].

Flavonolignany silymarinu vykazovaly také účinky na buněčný cyklus. Příkladem může být zastavení buněčného cyklu v G1 a G2/M fázi koncentračně závislým způsobem u HUVEC po 24 hodinovém působení silybinu A, silybinu B a isosilybinu A při použití v koncentračních rozmezích 5–30 μM [329]. SB (25, 50 a 100 μM) způsobil také silné časově a koncentračně závislé snížení počtu buněk v G1 fázi u HUVEC a HMEC a u obou typů buněk vyvolal časově a koncentračně závislé snížení počtu buněk v S a G2/M fázi po 24, 48 a 72 hodinách [319]. Naše výsledky poskytly podobný trend pro 20-G-D, který zvyšoval počet apoptotických buněk (sub-G1 fáze) koncentračně a časově závislým způsobem u HMEC (viz kapitola 5.2.3).

Naším cílem bylo také objasnit mechanismus, kterým 20-G-D vyvolává inhibici angiogeneze u endotelových buněk. Z tohoto důvodu byl studován jeho vliv na PI3K/Akt a ERK dráhy. V literatuře bylo prokázáno, že silybin potlačoval fosforylaci Akt [319]. Na základě našich výsledků bylo navrženo, že 20-G-D by mohl angiogenezi ovlivněním PI3K/Akt dráhy, protože u HMEC byla potlačena fosforylovaná forma Akt, zatímco fosforylovaná forma ERK1/2 zůstala nezměněna (viz Obr. 35). Pokud porovnáme intenzitu signálu pro fosforylovaný protein (p-Akt, p-ERK1/2) proti celkovému proteinu (celkový Akt, celkový ERK), je nejintenzivnější pokles (pod 20 %) právě v případě p-Akt/celkový Akt.

V naší práci jsme ale nepozorovali koncentračně závislý vliv testovaných látek na fosforylaci Akt a ERK1/2 popisovaný v jiných studiích [312]. 20-G-D naopak potlačoval fosforylaci Akt více v koncentraci 5 μM , než v koncentraci 10 μM , což pravděpodobně souvisí se skutečností, že koncentrace 10 μM je již cytotoxická a v buňce tak dochází i k jiným mechanismům účinku, než pouze k vlivu na fosforylaci akt. Podobný, byť statisticky nevýznamný, trend je vidět i v případě vlivu 20-G-D na fosforylaci proteinu ERK1/2.

Sledování vlivu látek na dráhy Akt a ERK1/2 byly prvotní experimenty, které měly primárně vést ke zjištění, zda 20-G-D ovlivňuje jednu či druhou dráhu. Vliv látek se sledoval už po 6 hodinách, aby se prokázalo, jestli 20-G-D působí na fosforylaci proteinů již v tak krátkém časovém intervalu. Jsme si vědomi toho, že pro verifikaci správnosti výsledků by bylo

DISKUZE

vhodnější použití také negativní a pozitivní kontroly, což je v plánu pro další experimenty, které umožní hlubší pochopení problematiky.

Na základě MTT testu cytotoxického vlivu DHS na buňky HUVEC ($IC_{50} = 12 \mu M$) byly pro ověření vlivu na proliferaci HMEC-1 vybrány vybrané koncentrace DHS (1, 3, 5 a 10 μM). Pro ostatní látky (3-G-D, 7-G-D, 20-G-D a 23-G-D) byly proto použity koncentrace stejné, aby bylo možno případně srovnat získaná data, bez ohledu na to, že v některých případech byly koncentrace vyšší než IC_{50} . Přesto, že u všech látek došlo ke snížení proliferace po inkubaci se studovanými látkami (v různých koncentracích), pouze v případě 20-G-D byl sledován koncentračně-závislý trend a proto byla tato látka vybrána pro další experimenty. V případě této molekuly lze předpokládat, že studovaná koncentrace 5 μM nebyla toxická, protože IC_{50} stanovené pro tuto látku na buňkách HUVEC bylo $11,5 \pm 1,2 \mu M$. Koncentrace 10 μM se IC_{50} blíží, proto ji lze využít pro srovnání cytotoxických projevů.

V experimentu vlivu látek na tvorbu trubic byl proveden nejprve klasický tube test, kde nebyla pozorována inhibice tvorby tubulů 20-G-D (výsledky nejsou zobrazeny). Po 24 hodinové preinkubaci 20-G-D s buňkami, jak je popsáno v metodice, už inhibice tvorby tubulů sledována byla (viz br. 33).

Vzhledem k tomu, že se sledoval vliv 20-G-D na tvorbu trubic po 24 hodiném působení a vliv látek na proliferaci HMEC-1 po 72-hodinách nelze jednoznačně tvrdit, že snížení tvorby trubic je dáno potlačením diferenciaci a nesouvisí pouze s cytotoxickým působením látky po 24 hodinách, jak naznačují výsledky testu tvorby trubic, kdy statisticky významné snížení bylo pozorováno u cytotoxické koncentrace 10 μM . Zpětně jsme si vědomi toho, že zvolené pořadí experimentů nebylo optimální. Aby byly výsledky tube testu jasnější bylo by vhodné provést MTT test také po 24 hodinách a zároveň před hodnocením tvorby trubic stanovit vliv látky na apoptosu (buněčný cyklus) buněk.

6.3 Vliv látek na vyvolání apoptosy a distribuci fází buněčného cyklu u nádorových linií

Nádorové buňky jsou schopny ignorovat proapoptotické signály [330]. Některé polyfenoly dokáží vyvolat apoptosu rakovinných buněk [331], čímž potlačují nádorové bujení [332, 333]. Zastavením buněčného cyklu a indukci apoptosy u různých typů rakoviny jsou také vysvětlovány pozitivní účinky silymarinu i silybinu.

DISKUZE

Schopnost námi studovaných látek vyvolat apoptosu *in vitro* jsme testovali na linii lidské akutní monocytární leukémie THP-1 (ATCC® TIB-202TM) a linii nádorových kmenových buněk NTERA-2 cl.D1 [NT2/D1] (ATCC® CRL-1973™). Pro srovnání byla použita také linie normálních lidských fibroblastů BJ (ATCC® CRL-2522TM). Díky dvojitému značení pomocí annexinu V a propidium jodidu jsme byli schopni rozlišit buňky živé (annexin V-negativní, PI-negativní), časně apoptické (annexin V-pozitivní, PI-negativní) a pozdně apoptické/sekundárně nekrotické (annexin V-pozitivní, PI-pozitivní) [334].

2,3-Dehydrosilybin, vykazoval oproti silybinu znatelně silnější antioxidační [284, 335] a cytoprotektivní [336] vlastnosti a také výraznější proapoptické působení [281, 282, 337]. Jak ukazuje tabulka 2, DHS projevily výraznější schopnost vyvolat apoptosu ve srovnání se SB i v našich testech na THP-1 a NTERA-2 liniích.

Rozdíl ve vyvolání apoptosy byl pozorován také mezi čistými stereoisomery silybinu i 2,3-dehydrosilybinu (viz Tab. 2). DHS A a B vyvolávaly u THP-1 i NTERA-2 buněk, oproti racemickému DHS, apoptosu silněji. V případě DHS byly, ve srovnání se směsným DHS, čisté stereoisomery vždy aktivnější. Směsný silybin byl u NTERA-2 buněk aktivnější oproti SB A, ale méně aktivní než SB B. U THP-1 buněk nevyvolávaly apoptosu ani čisté stereoisomery, ani racemický silybin.

Experimenty prováděné Agarwalem a kolektivem poukázaly na zvýšení proapoptické aktivity po zavedení galloylové skupiny do struktury molekuly [317]. V našich experimentech jsme prokázali, že v případě buněk NTERA-2 galloylderiváty (3-G-D, 7-G-D, 20-G-D i 23-G-D) vyvolávaly apoptosu výrazněji než jejich parentní molekula. U buněk THP-1 byla proapoptická aktivita zvýšena jen u 7-G-D a 23-G-D, zatímco galloylace na pozici 3-OH a 20-OH 2,3-dehydrosilybinu aktivitu výchozí látky výrazně snížila.

Požadavkem při testování protirakovinné aktivity látek je, aby tyto látky zároveň neovlivňovaly zdravé buňky. Například u EGCG bylo potvrzeno, že působí specificky na rakovinné buňky. EGCG vyvolával apoptosu u lidských rakovinných keratinocytů HaCaT, lidských prostatických rakovinných buněk DU145 a myších buněk lymfomu LY-R, ovšem ne v případě normálních lidských epidermálních keratinocytů [338]. V souvislosti s tím tedy byly slibné námi získané výsledky u normálních lidských fibroblastů (BJ), jelikož s výjimkou kyseliny gallové nebylo u žádné z látek pozorováno vyvolání apoptosy (tabulka 2).

V rámci třech linií použitých v našich experimentech vykazovala kyselina gallová zajímavé chování. Byla jednou proapopticky aktivní u zdravých buněk (BJ) a v případě

DISKUZE

rakovinných linií vyvolávala apoptosu výrazně pouze u buněk NTERA-2, zatímco u buněk THP-1 jen velmi mírně.

Při sledování vlivu látek na apoptosu nádorových linií THP-1 a NTERA-2 byly použity různé látky (DHS B a 23-G-D) v rozdílných koncentracích a časech (viz Obr. 36). Navíc v případě 24 hodinové inkubace DHS B s NTERA-2 buňkami byla použita vyšší koncentrace látky než v případě kratších inkubací. Výsledky však i přesto ukazují očekávanou časovou změnu v zastoupení apoptotických buněk a vliv derivátů silybinu na nádorové buněčné linie byl potvrzen hned u dvou typů buněk, byť tato data nelze vzájemně srovnat.

Proces apoptosy může způsobit zvýšení hypodiploidní sub-G1 buněčné populace [340]. Počet buněk v sub-G1 fázi jsme sledovali na buněčné kultuře THP-1 po 6 a 24 hodinovém působení látek na buňky. Po 6 hodinách nezvyšovala, ve srovnání s kontrolou, počet buněk v sub-G1 fázi žádná ze studovaných látek. K výraznému zvýšení akumulace buněk v této fázi však došlo při 24 hodinové inkubaci s 2,3-dehydrosilybinem i jeho čistými stereoisomery a především pak v případě 7-G-D a 23-G-D. V našich experimentech jsme však k testování použili jen jednu koncentraci testované látky (50 μ M).

7 Závěr

7.1 Vliv látek na endotelové buňky HUVEC

Předložená disertační práce se věnovala studiu cytotoxického vlivu DHS a jeho galloylovaných derivátů na endotelové buňky HUVEC a jejich působení na proliferaci a migraci těchto buněk. Bylo zjištěno, že galloyl estery mohou mít cytotoxickou aktivitu stejnou jako výchozí molekula, nebo může být jak zvýšena, tak snížena v závislosti na místě galloylace molekuly. Podobné výsledky, jak galloylace ovlivňuje aktivitu molekuly, byly získány i při studiu antimigrační a antiproliferační aktivity látek na endotelových buňkách HUVEC.

7.2 Hodnocení antiangiogenních vlastností látek na HMEC-1

Byla sledována antiangiogenní aktivita DHS a jeho galloyl esterů na endotelových buňkách HMEC-1. Při studiu antiproliferační aktivity a působení látek na tvorbu trubic bylo zjištěno, že nejaktivnějším derivátem byl 20-G-D. I tyto testy potvrdily, že aktivita galloyl esteru závisí na tom, v jakém místě k navázání zbytku kyseliny gallové došlo. U 20-G-D byla sledována jeho schopnost ovlivnit buněčný cyklus a fosforylaci proteinů Akt a ERK1/2. 20-G-D zvyšoval počet buněk v sub-G1 fázi a lze tedy říci, že antiangiogenní účinek 20-G-D může být zprostředkovan vyvoláním apoptosy endotelových buněk. Jeho antiangiogenní účinek se projevil také díky schopnosti blokovat Akt signální dráhu (snižoval množství fosforylovaného Akt). U 20-G-D byla testována i možné ovlivnění dráhy ERK1/2, ovšem v tomto případě nebyl pozorován žádný efekt.

7.3 Vliv látek na apoptosu u rakovinných buněčných linií

Schopnost vyvolat apoptosu po inkubaci se SB, DHS, jejich stereoisomery, kyselinou gallovou a derivátů DHS se zbytkem kyseliny gallové na uhlících C-3, C-7, C-20 a C-23 byla hodnocena u nádorových liniích THP-1 a NTERA-2. Jako kontrola sloužily normální lidské fibroblasty BJ.

Téměř všechny látky byly schopny vyvolat apoptosu rakovinných buněčných linií NTERA-2 a THP-1. Jedinou látkou schopnou vyvolat apoptosu také u zdravých buněk BJ byla kyselina gallová. Tyto výsledky tedy naznačují možné využití použitých látek v boji proti rakovinným onemocněním, jelikož vyvolávají apoptosu nádorových buněk a zároveň jsou

ZÁVĚR

šetrné vůči buňkám zdravým. U jednotlivých látek byla opět vidět odlišná aktivita v závislosti na umístění galloylové skupiny a také mezi racemickou směsí a čistými isomery. Látky dále vyvolávaly akumulaci buněk THP-1 v sub-G1 fázi.

K léčbě rakoviny se v dnešní době běžně používají chemoterapeutika. Bezpečnější alternativou však mohou být přírodní látky, případně jejich semi-syntetické deriváty. V našich experimentech jsme použili přírodní látky z ostropestřce mariánského a jejich semi-syntetické deriváty s kyselinou gallovou. Rozvoj onkologického onemocnění umožňuje, mimo jiné děje, nádorová angiogeneze, díky které k nádoru prorůstají cévy zajišťující jeho výživu a také schopnost nádoru vyhýbat se apoptotické smrti. Potlačení angiogeneze a vyvolání apoptosy u rakovinných buněk jsou tak slibnými metodami jak zabránit šíření rakoviny. Látky, které byly použity v našich experimentech tyto vlastnosti splňovaly a jejich aktivity byly ve většině případů vylepšeny zavedením galloylové skupiny do jejich struktury.

V našich experimentech byl proveden *in vitro* screening přírodních a semi-syntetických látek z ostropestřce mariánského se zaměřením na jejich cytotoxické a antiangiogenní aktivity. Tyto látky by mohly být slibnou alternativou ke klasické chemoterapii v léčbě rakoviny, nicméně pro ověření jejich bezpečnosti a účinnosti bude zapotřebí ještě mnoho dalších experimentů a to zejména *in vivo*.

8 Seznam prací

8.1 Seznam prací vztahujících se k disertaci

8.1.1 Publikace

1. Karas D., Ulrichová J., Valentová K. (2017) Galloylation of polyphenols alters their biological activity. *Food Chem. Toxicol.* **105**, 223 – 40. IF_{2016/2017} = 3,778.
2. Pivodová V., Zahler S., Karas D., Valentová K., Ulrichová J. (2016) *In vitro* study of 2,3-dehydrosilybin and its galloyl esters as potential inhibitors of angiogenesis. *Pharmazie* **71**, 478 – 83, IF_{2016/2017} = 1,126.
3. Karas D., Gažák R., Valentová K., Chambers C. S., Pivodová V., Biedermann D., Křenková A., Oborná I., Kuzma M., Čvačka J., Ulrichová J., Křen V. (2016) Effects of 2,3-Dehydrosilybin and Its Galloyl Ester and Methyl Ether Derivatives on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J. Nat. Prod.* **79**, 812 – 20. IF_{2016/2017} = 3,281.

8.1.2 Abstrakta ke konferencím

1. Karas D., Křen V., Valentová K., Lobstein A., Muller C. D., Ulrichová J.: The effect of natural compounds and their synthetic derivatives on apoptosis of THP-1 cells. XXIV. BIOCHEMICKÝ ZJAZD SSBMB a ČSBMB, 18. 9. – 21. 9. 2014, ISBN 978-80-970164-6-3, p. 160-161, Bratislava, Slovensko.
2. Valentová K., Nabergoj D., Vrbek S., Lobstein A., Muller C.D., Ulrichová J., Karas D., Křen V.: Vliv flavonoidů a jejich galátů na indukci apoptosy lidských buněčných linií. Konference vědeckých prací studentů DSP, 16. 12. – 17. 12. 2013, p. 30, Olomouc, Česká republika.
3. Karas D., Gažák R., Křen V., Oborná I., Ulrichová J., Valentová K.: Dehydrosilybin and its galloylderivatives as modulators of angiogenesis. The Student Scientific CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY AND BIOMEDICINE, 10. 4. – 12. 4. 2013, ISBN 978-80-210-6200-9, p. 144, Brno, Česká republika.

8.2 Ostatní práce

8.2.1 Publikace

1. Carole Minker, Livine Duban, Daniel Karas, Päivi Järvinen, Annelise Lobstein, and Christian D. Muller, “Impact of Procyanidins from Different Berries on Caspase 8 Activation in Colon Cancer,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, Article ID 154164, 13 pages, 2015. doi:10.1155/2015/154164. IF₂₀₁₅ = 4,492.

8.2.2 Abstrakta ke konferencím

1. Karas D., Pivodová V., Křen V., Ulrichová J.: Effects of 2,3-dehydrosilybin and its galloyl ester derivatives on proliferation of selected cell lines. Book of abstracts, 2, 6th EuCheMS Chemistry Congress, Sevilla, Španělsko, 11. 9. – 15. 9. 2016.
2. Pivodová V., Karas D., Křen V., Ulrichová J.: The impact of galloylation of 2,3-dehydrosilybin on migration and cell cycle of human bladder carcinoma cell line 5637. Book of abstracts, 1, 6th EuCheMS Chemistry Congress, Sevilla, Španělsko, 11. 9. – 15. 9. 2016.
3. Karas D., Pivodová V., Valentová K., Křen V., Lobstein A., Muller C. D., Ulrichová J.: Effect of natural compounds and their semi-synthetic derivatives on apoptosis and angiogenesis. Spetses Summer School, a FEBS advanced lecture course, *Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer*, 16. 8. – 24. 8. 2015, Spetses, Řecko.
4. Pivodová V., Zahler S., Karas D., Křen V., Ulrichová J.: The effect of 7-*O*-galloyl-dehydrosilybin on filopodia of endothelial cells. 9th World Congress on Polyphenols Applications, 3. 6. - 5. 6. 2015, ISBN 978-2-35609-073-7, p. 168, S^t Julian's, Malta.

9 Reference

1. Rattan, S.I., *The nature of gerontogenes and vitagenes. Antiaging effects of repeated heat shock on human fibroblasts.* Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 54-60.
2. Surai, P.F., *Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives.* Antioxidants (Basel), 2015. **4**(1): p. 204-47.
3. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
4. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy.* Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-1337.
5. Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan, *Intrinsic tumour suppression.* Nature, 2004. **432**(7015): p. 307-315.
6. Evan, G. and T. Littlewood, *A matter of life and cell death.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1317-22.
7. Gupta, S.C., et al., *Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals.* Cancer and Metastasis Reviews, 2010. **29**(3): p. 405-434.
8. de Krijger, I., et al., *MicroRNAs in colorectal cancer metastasis.* The Journal of Pathology, 2011. **224**(4): p. 438-447.
9. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis.* J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
10. Griffioen, A.W. and G. Molema, *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation.* Pharmacol Rev, 2000. **52**(2): p. 237-68.
11. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* Nature Reviews Drug Discovery, 2007. **6**(4): p. 273-286.
12. Sherwood, L.M., E.E. Parris, and J. Folkman, *Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications.* New England Journal of Medicine, 1971. **285**(21): p. 1182-1186.
13. Cook, K.M. and W.D. Figg, *Angiogenesis Inhibitors: Current Strategies and Future Prospects.* CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2010. **60**(4): p. 222-243.
14. Ferrara, N., *VEGF: an update on biological and therapeutic aspects.* Current Opinion in Biotechnology, 2000. **11**(6): p. 617-624.
15. Zhao, Y. and A.A. Adjei, *Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor.* The Oncologist, 2015. **20**(6): p. 660-673.
16. Kerbel, R.S., *Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents.* BioEssays, 1991. **13**(1): p. 31-36.
17. Gacche, R.N. and R.J. Meshram, *Angiogenic factors as potential drug target: Efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2014. **1846**(1): p. 161-179.
18. Ferrara, N. and K. Alitalo, *Nature Medicine*, 1999. **5**(12): p. 1359-1364.
19. Gerber, P.A., et al., *Chemokines in tumor-associated angiogenesis.* Biological Chemistry, 2009. **390**(12).
20. Liekens, S., E. De Clercq, and J. Neyts, *Angiogenesis: regulators and clinical applications.* Biochemical Pharmacology, 2001. **61**(3): p. 253-270.
21. Nasarre, P., et al., *Host-Derived Angiopoietin-2 Affects Early Stages of Tumor Development and Vessel Maturation but Is Dispensable for Later Stages of Tumor Growth.* Cancer Research, 2009. **69**(4): p. 1324-1333.
22. Ribatti, D., *The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review.* Angiogenesis, 2008. **11**(3): p. 215-221.

REFERENCE

23. Kieran, M.W., R. Kalluri, and Y.J. Cho, *The VEGF Pathway in Cancer and Disease: Responses, Resistance, and the Path Forward*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(12): p. a006593-a006593.
24. Ferrara, N. and T. DavisSmyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocrine Reviews, 1997. **18**(1): p. 4-25.
25. Beeghly-Fadiel, A., et al., *Genetic Variation in VEGF Family Genes and Breast Cancer Risk: A Report from the Shanghai Breast Cancer Genetics Study*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2010. **20**(1): p. 33-41.
26. Ferrara, N., *The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis*, in *Experientia Supplementum*, Birkhäuser-Verlag. p. 209-231.
27. Gavard, J., *Breaking the VE-cadherin bonds*. FEBS Letters, 2008. **583**(1): p. 1-6.
28. Grünewald, F.S., et al., *Structure–function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2010. **1804**(3): p. 567-580.
29. Nissen, L.J., et al., *Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(10): p. 2766-2777.
30. Ferrara, N., H.-P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nature Medicine, 2003. **9**(6): p. 669-676.
31. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-845.
32. Decaris, M.L., et al., *Influence of the oxygen microenvironment on the proangiogenic potential of human endothelial colony forming cells*. Angiogenesis, 2009. **12**(4): p. 303-311.
33. Bertout, J.A., S.A. Patel, and M.C. Simon, *The impact of O₂ availability on human cancer*. Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(12): p. 967-975.
34. Geretti, E., et al., *Site-directed Mutagenesis in the B-Neuropilin-2 Domain Selectively Enhances Its Affinity to VEGF165, but Not to Semaphorin 3F*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(35): p. 25698-25707.
35. Klagsbrun, M., S. Takashima, and R. Mamluk, *The Role of Neuropilin in Vascular and Tumor Biology*, in *Neuropilin*. 2002, Springer US. p. 33-48.
36. Meadows, K.L. and H.I. Hurwitz, *Anti-VEGF Therapies in the Clinic*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(10): p. a006577-a006577.
37. Niu, G. and X. Chen, *Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(8): p. 1000-17.
38. Depoix, C., M.K. Tee, and R.N. Taylor, *Molecular Regulation of Human Placental Growth Factor (PlGF) Gene Expression in Placental Villi and Trophoblast Cells is Mediated via the Protein Kinase A Pathway*. Reproductive Sciences, 2010. **18**(3): p. 219-228.
39. Oura, H., *A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation*. Blood, 2002. **101**(2): p. 560-567.
40. Dewerchin, M. and P. Carmeliet, *PlGF: A Multitasking Cytokine with Disease-Restricted Activity*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(8): p. a011056-a011056.
41. Martin, D., R. Galisteo, and J.S. Gutkind, *CXCL8/IL8 Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression and the Autocrine Activation of VEGFR2 in Endothelial Cells by Activating NFκB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) Complex*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **284**(10): p. 6038-6042.

REFERENCE

42. You, W.-K. and D.M. McDonald, *The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis*. BMB Reports, 2008. **41**(12): p. 833-839.
43. Kowalczyk, L., et al., *Placental Growth Factor Contributes to Micro-Vascular Abnormalization and Blood-Retinal Barrier Breakdown in Diabetic Retinopathy*. PLoS ONE, 2011. **6**(3): p. e17462.
44. Cianfarani, F., et al., *Placenta growth factor in diabetic wound healing: altered expression and therapeutic potential*. Am J Pathol, 2006. **169**(4): p. 1167-82.
45. Herrmann, J., *Angiogenesis in Atherogenesis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006. **26**(9): p. 1948-1957.
46. Kim, K.-J., C.-S. Cho, and W.-U. Kim, *Role of placenta growth factor in cancer and inflammation*. Experimental and Molecular Medicine, 2011. **44**(1): p. 10.
47. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(5): p. 1011-1027.
48. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
49. Avastin [prescribing information]. South San Francisco, C.G.
50. Inlyta [package insert]. New York, N.P., Inc.; 2013.
51. Cyramza [package insert]. Indianapolis, I.E.L.a.C.
52. Mazziere, R., et al., *Targeting the ANG2/TIE2 Axis Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Impairing Angiogenesis and Disabling Rebounds of Proangiogenic Myeloid Cells*. Cancer Cell, 2011. **19**(4): p. 512-526.
53. Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet, *Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis*. Cell, 2011. **146**(6): p. 873-887.
54. Sun, Q., J. Heilmann, and B. König, *Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic properties – a review from the chemical point of view*. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2015. **11**: p. 249-264.
55. Avastin bevacizumab. EPAR summary for the public. EMA/302947/2017, E.H.C.
56. Murakami, M., et al., *VEGFR1 Tyrosine Kinase Signaling Promotes Lymphangiogenesis as Well as Angiogenesis Indirectly via Macrophage Recruitment*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(4): p. 658-664.
57. Oliner, J., et al., *Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2*. Cancer Cell, 2004. **6**(5): p. 507-16.
58. Presta, M., et al., *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2005. **16**(2): p. 159-178.
59. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. Nature Reviews Drug Discovery, 2009. **8**(3): p. 235-253.
60. Turner, N. and R. Grose, *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(2): p. 116-129.
61. Pineda-Lucena, A., et al., *Three-Dimensional Structure of Acidic Fibroblast Growth Factor in Solution: Effects of Binding to a Heparin Functional Analog*. Journal of Molecular Biology, 1996. **264**(1): p. 162-178.
62. Ornitz, D.M., et al., *Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(25): p. 15292-15297.
63. Woad, K.J., et al., *Fibroblast growth factor 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis*. Reproduction, 2011. **143**(1): p. 35-43.
64. Cao, Y., R. Cao, and E.-M. Hedlund, *R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways*. Journal of Molecular Medicine, 2008. **86**(7): p. 785-789.

REFERENCE

65. Dvorak, P., D. Dvorakova, and A. Hampl, *Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells*. FEBS Letters, 2006. **580**(12): p. 2869-2874.
66. Rusnati, M. and M. Presta, *Fibroblast Growth Factors/Fibroblast Growth Factor Receptors as Targets for the Development of Anti-Angiogenesis Strategies*. Current Pharmaceutical Design, 2007. **13**(20): p. 2025-2044.
67. Porta, R., et al., *FGFR a promising druggable target in cancer: Molecular biology and new drugs*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **113**: p. 256-267.
68. Harding, M.J. and A.V. Nechiporuk, *Fgfr-Ras-MAPK signaling is required for apical constriction via apical positioning of Rho-associated kinase during mechanosensory organ formation*. Development, 2012. **139**(17): p. 3130-5.
69. Helsten, T., et al., *The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(1): p. 259-67.
70. Bergsten, E., et al., *PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 512-6.
71. Li, X., et al., *PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(5): p. 302-9.
72. Heldin, C.-H., U. Eriksson, and A. Östman, *New Members of the Platelet-Derived Growth Factor Family of Mitogens*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002. **398**(2): p. 284-290.
73. Magnusson, P.U., et al., *Platelet-Derived Growth Factor Receptor- Constitutive Activity Promotes Angiogenesis In Vivo and In Vitro*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(10): p. 2142-2149.
74. Ross, R., E.W. Raines, and D.F. Bowen-Pope, *The biology of platelet-derived growth factor*. Cell, 1986. **46**(2): p. 155-169.
75. Levitzki, A., *PDGF receptor kinase inhibitors for the treatment of PDGF driven diseases*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2004. **15**(4): p. 229-235.
76. Beitz, J.G., et al., *Human microvascular endothelial cells express receptors for platelet-derived growth factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(5): p. 2021-2025.
77. Lindahl, P., *Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice*. Science, 1997. **277**(5323): p. 242-245.
78. Pietras, K., et al., *Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy*. Cancer Res, 2002. **62**(19): p. 5476-84.
79. Hellström, M., et al., *Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis*. The Journal of Cell Biology, 2001. **153**(3): p. 543-554.
80. Abramsson, A., P. Lindblom, and C. Betsholtz, *Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(8): p. 1142-1151.
81. Jain, R.K. and M.F. Booth, *What brings pericytes to tumor vessels?* Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(8): p. 1134-1136.
82. Hellstrom, M., et al., *Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse*. Development, 1999. **126**(14): p. 3047-55.
83. Dong, J., et al., *VEGF-null cells require PDGFR α signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis*. The EMBO Journal, 2004. **23**(14): p. 2800-2810.
84. Ori, A., M.C. Wilkinson, and D.G. Fernig, *The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4309-38.

REFERENCE

85. Bergers, G., et al., *Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**(9): p. 1287-1295.
86. Erber, R., *Combined inhibition of VEGF- and PDGF-signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms*. The FASEB Journal, 2003.
87. Raica, M. and A.M. Cimpean, *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy*. Pharmaceuticals (Basel), 2010. **3**(3): p. 572-599.
88. Kuhnert, F., et al., *Soluble receptor-mediated selective inhibition of VEGFR and PDGFRbeta signaling during physiologic and tumor angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10185-90.
89. Timke, C., et al., *Combination of vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor inhibition markedly improves radiation tumor therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(7): p. 2210-9.
90. Sennino, B., et al., *Cellular source and amount of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in tumors determine response to angiogenesis inhibitors*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4527-36.
91. Ding, S., *HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro*. Blood, 2003. **101**(>12): p. 4816-4822.
92. Zhang, J., et al., *miR-101 Inhibits Cholangiocarcinoma Angiogenesis through Targeting Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*. The American Journal of Pathology, 2013. **182**(5): p. 1629-1639.
93. Cao, B., et al., *Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(13): p. 7443-7448.
94. Augustin, H.G., et al., *Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(3): p. 165-177.
95. Thomas, M. and H.G. Augustin, *The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis*. Angiogenesis, 2009. **12**(2): p. 125-137.
96. Shim, W.S.N., I.A.W. Ho, and P.E.H. Wong, *Angiopoietin: A TIE(d) Balance in Tumor Angiogenesis*. Molecular Cancer Research, 2007. **5**(7): p. 655-665.
97. Davis, S., et al., *Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1161-1169.
98. Kim, I., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3*. FEBS Letters, 1999. **443**(3): p. 353-356.
99. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
100. Valenzuela, D.M., et al., *Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(5): p. 1904-1909.
101. Felcht, M., et al., *Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling*. J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 1991-2005.
102. Etoh, T., et al., *Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2145-53.
103. Huang, J., et al., *Angiopoietin-1/Tie-2 activation contributes to vascular survival and tumor growth during VEGF blockade*. Int J Oncol, 2009. **34**(1): p. 79-87.

REFERENCE

104. Koh, Y.J., et al., *Double antiangiogenic protein, DAAP, targeting VEGF-A and angiopoietins in tumor angiogenesis, metastasis, and vascular leakage*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(2): p. 171-84.
105. Martinsson-Niskanen, T., et al., *Monoclonal antibody TB-403: a first-in-human, Phase I, double-blind, dose escalation study directed against placental growth factor in healthy male subjects*. *Clin Ther*, 2011. **33**(9): p. 1142-9.
106. Tabruyn, S.P. and A.W. Griffioen, *Molecular pathways of angiogenesis inhibition*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. **355**(1): p. 1-5.
107. Kirsch, M., et al., *Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo*. *Cancer Res*, 1998. **58**(20): p. 4654-9.
108. Geiger, J.H. and S.E. Cnudde, *What the structure of angiostatin may tell us about its mechanism of action*. *J Thromb Haemost*, 2004. **2**(1): p. 23-34.
109. Moser, T.L., et al., *Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(6): p. 2811-6.
110. Moser, T.L., et al., *Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(12): p. 6656-61.
111. Tarui, T., L.A. Miles, and Y. Takada, *Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(43): p. 39562-8.
112. Tarui, T., et al., *Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 33564-70.
113. Makrilia, N., et al., *The role of angiogenesis in solid tumours: An overview*. *European Journal of Internal Medicine*, 2009. **20**(7): p. 663-671.
114. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1994. **59**: p. 471-82.
115. Folkman, J., *Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(5): p. 594-607.
116. O'Reilly, M.S., et al., *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. *Cell*, 1997. **88**(2): p. 277-85.
117. Shichiri, M. and Y. Hirata, *Antiangiogenesis signals by endostatin*. *FASEB J*, 2001. **15**(6): p. 1044-53.
118. Abdollahi, A., et al., *Endostatin's antiangiogenic signaling network*. *Mol Cell*, 2004. **13**(5): p. 649-63.
119. Abdollahi, A., L. Hlatky, and P.E. Huber, *Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy*. *Drug Resist Updat*, 2005. **8**(1-2): p. 59-74.
120. Tonini, T., F. Rossi, and P.P. Claudio, *Molecular basis of angiogenesis and cancer*. *Oncogene*, 2003. **22**(42): p. 6549-6556.
121. Sargiannidou, I., J. Zhou, and G.P. Tuszynski, *The role of thrombospondin-1 in tumor progression*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. **226**(8): p. 726-33.
122. Tan, K., et al., *Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats: a novel layered fold and its biological implication*. *J Cell Biol*, 2002. **159**(2): p. 373-82.
123. Li, X., et al., *Inhibition of angiogenesis by a novel small peptide consisting of the active fragments of platelet factor-4 and vasostatin*. *Cancer Letters*, 2007. **256**(1): p. 29-32.
124. Pike, S.E., et al., *Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth*. *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2349-56.
125. Lord, M.S., et al., *Platelet Factor 4 Binds to Vascular Proteoglycans and Controls Both Growth Factor Activities and Platelet Activation*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(10): p. 4054-4063.

REFERENCE

126. Aidoudi, S. and A. Bikfalvi, *Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis*. Thromb Haemost, 2010. **104**(5): p. 941-8.
127. Ribeiro-Silva, A. and J.P. Oliveira da Costa, *Osteopontin expression according to molecular profile of invasive breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study*. The International Journal of Biological Markers, 2008. **23**(3): p. 154-160.
128. Hao, C., et al., *Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review)*. Int J Mol Med, 2017. **39**(6): p. 1327-1337.
129. Dai, J., et al., *Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells*. Oncogene, 2009. **28**(38): p. 3412-22.
130. Lund, S.A., C.M. Giachelli, and M. Scatena, *The role of osteopontin in inflammatory processes*. J Cell Commun Signal, 2009. **3**(3-4): p. 311-22.
131. Qi, J.H., et al., *SI56C Mutation in Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 Induces Increased Angiogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(30): p. 19927-19936.
132. Baker, A.H., D.R. Edwards, and G. Murphy, *Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 19): p. 3719-27.
133. Seo, D.W., et al., *TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism*. Cell, 2003. **114**(2): p. 171-80.
134. Qi, J.H., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 peptides inhibit angiogenesis and choroidal neovascularization in mice*. PLoS ONE, 2013. **8**(3): p. e55667.
135. Beraud, C., W.J. Henzel, and P.A. Baeuerle, *Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 429-34.
136. Kane, L.P., et al., *Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase*. Curr Biol, 1999. **9**(11): p. 601-4.
137. Shiojima, I. and K. Walsh, *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis*. Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1243-50.
138. Pugazhenthii, S., et al., *Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10761-10766.
139. L'Hote, C.G.M. and M.A. Knowles, *Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis*. Exp Cell Res, 2005. **304**(2): p. 417-431.
140. Huber, A., et al., *Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin*. Biochimi Biophys Acta, 2008. **1780**(5): p. 837-847.
141. Wu, L.W., et al., *Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 5096-103.
142. Folkman, J., et al., *Induction of Angiogenesis during the Transition from Hyperplasia to Neoplasia*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 58-61.
143. Weitensteiner, S.B., et al., *Trisubstituted pyrazolopyrimidines as novel angiogenesis inhibitors*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54607.
144. Hassan, L.E.A., et al., *Correlation of antiangiogenic, antioxidant and cytotoxic activities of some Sudanese medicinal plants with phenolic and flavonoid contents*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014. **14**(1).
145. Scappaticci, F.A., *The therapeutic potential of novel antiangiogenic therapies*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2003. **12**(6): p. 923-932.
146. Dell'Eva, R., et al., *Inhibition of angiogenesis in vivo and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti-malarial artesunate*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(12): p. 2359-66.

REFERENCE

147. Scappaticci, F.A., *Mechanisms and Future Directions for Angiogenesis-Based Cancer Therapies*. Journal of Clinical Oncology, 2002. **20**(18): p. 3906-3927.
148. Makarevich P. I. and P.Y. V., *Physiologic and Pathologic Angiogenesis - Signaling Mechanisms and Targeted Therapy* (Simionescu D., Simionescu A., ed.), InTech, Rijeka, Croatia, 343 - 364. 2017.
149. Jeong, S.-J., et al., *Antiangiogenic phytochemicals and medicinal herbs*. Phytotherapy Research, 2010. **25**(1): p. 1-10.
150. Khan G. J., et al., *Assessment methods of angiogenesis and present approaches for its quantification*. Cancer Research Journal, 2014. **2**: p. 47-62.
151. Auerbach, R., *Angiogenesis Assays: A Critical Overview*. Clinical Chemistry, 2003. **49**(1): p. 32-40.
152. Ng, C.T., et al., *Comparison of invasion by human microvascular endothelial cell lines in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in a threedimensional (3D) cell culture system*. Malays J Pathol, 2015. **37**(3): p. 219-25.
153. Staton, C.A., M.W.R. Reed, and N.J. Brown, *A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays*. International Journal of Experimental Pathology, 2009. **90**(3): p. 195-221.
154. Staton, C.A., et al., *Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo*. International Journal of Experimental Pathology, 2004. **85**(5): p. 233-248.
155. Vailhé, B., D. Vittet, and J.-J. Feige, *In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis*. Laboratory Investigation, 2001. **81**(4): p. 439-452.
156. Bouïs, D., et al., *Angiogenesis*, 2001. **4**(2): p. 91-102.
157. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line*. Journal of Investigative Dermatology, 1992. **99**(6): p. 683-690.
158. Nicosia, R.F. and A. Ottinetti, *Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: A comparative study of angiogenesis in Matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot*. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1990. **26**(2): p. 119-128.
159. Folkman, J., *Angiogenesis*, in *Developments in Cardiovascular Medicine*. 1984, Springer US. p. 412-428.
160. Lee, E.O., *Potent inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of Vitis amurensis through apoptotic and anti-angiogenic activities*. Carcinogenesis, 2006. **27**(10): p. 2059-2069.
161. Passaniti, A., *Extracellular matrix-cell interactions: Matrigel and complex cellular pattern formation*. Lab Invest, 1992. **67**(6): p. 804; author reply 804-8.
162. Runkel, S., N. Hunter, and L. Milas, *An Intradermal Assay for Quantification and Kinetics Studies of Tumor Angiogenesis in Mice*. Radiation Research, 1991. **126**(2): p. 237.
163. Algire G. H. and C.H. W., *Vascular reactions of the normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants*. J Natl Cancer Inst USA, 1945. **6**: p. 73-75.
164. Selye, H., *On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury; an experimental study with the granuloma pouch technique*. J Am Med Assoc, 1953. **152**(13): p. 1207-13.
165. Cheon, D.J. and S. Orsulic, *Mouse models of cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 95-119.
166. Tao, L., et al., *LL-202, a newly synthesized flavonoid, inhibits tumor growth via inducing G2/M phase arrest and cell apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro and in vivo*. Toxicology Letters, 2014. **228**(1): p. 1-12.

REFERENCE

167. Tomei, L.D. and F.O. Cope, *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Books on Demand: Stoughton, WI, USA., 1991.
168. Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green, *The machinery of programmed cell death*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2001. **92**(1): p. 57-70.
169. Antonsson, B. and J.-C. Martinou, *The Bcl-2 Protein Family*. *Experimental Cell Research*, 2000. **256**(1): p. 50-57.
170. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(1): p. 3-11.
171. Ilknur, A.E., et al., *Efficiency of Bioflavonoids in the Prevention of Experimental Myringosclerosis*. *Journal of International Advanced Otolaryngology*, 2010. **6**(2): p. 195-200.
172. Koff, J., S. Ramachandiran, and L. Bernal-Mizrachi, *A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015. **16**(2): p. 2942-2955.
173. Parrish, A.B., C.D. Freel, and S. Kornbluth, *Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013. **5**(6): p. a008672-a008672.
174. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. *Nature Reviews Cancer*, 2002. **2**(4): p. 277-288.
175. Norbury, C., *Animal Cell Cycles and Their Control*. *Annual Review of Biochemistry*, 1992. **61**(1): p. 441-470.
176. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. *Cell Proliferation*, 2003. **36**(3): p. 131-149.
177. Sa, G. and T. Das, *Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death*. *Cell Division*, 2008. **3**(1): p. 14.
178. Martinez, M.M., R.D. Reif, and D. Pappas, *Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques*. *Analytical Methods*, 2010. **2**(8): p. 996.
179. Kajstura, M., et al., *Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms*. *Cytometry Part A*, 2007. **71A**(3): p. 125-131.
180. Darzynkiewicz, Z., et al., *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*. *Cytometry*, 1992. **13**(8): p. 795-808.
181. Darzynkiewicz, Z., et al., *Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)*. *Cytometry*, 1997. **27**(1): p. 1-20.
182. Ormerod, M.G., *The study of apoptotic cells by flow cytometry*. *Leukemia*, 1998. **12**(7): p. 1013-1025.
183. Ormerod, M.G., *Using flow cytometry to follow the apoptotic cascade*. *Redox Report*, 2001. **6**(5): p. 275-287.
184. Ormerod, M.G., *Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry*. *Journal of Immunological Methods*, 2002. **265**(1-2): p. 73-80.
185. Wallen, C.A., R. Higashikubo, and L.A. Dethlefsen, *Comparison of two flow cytometric assays for cellular RNA—acridine orange and propidium iodide*. *Cytometry*, 1982. **3**(3): p. 155-160.
186. Pollack, A. and G. Ciancio, *Chapter 3 Cell Cycle Phase-Specific Analysis of Cell Viability Using Hoechst 33342 and Propidium Iodide after Ethanol Preservation*, in *Flow Cytometry*. 1990, Elsevier. p. 19-24.
187. Ormerod, M.G., et al., *Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells*. *Journal of Immunological Methods*, 1992. **153**(1-2): p. 57-65.
188. Riccardi, C. and I. Nicoletti, *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and low cytometry*. *Nature Protocols*, 2006. **1**(3): p. 1458-1461.

REFERENCE

189. Kennedy, D.O. and E.L. Wightman, *Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function*. Advances in Nutrition: An International Review Journal, 2011. **2**(1): p. 32-50.
190. Wang, J., et al., *SKLB-M8 Induces Apoptosis Through the AKT/mTOR Signaling Pathway in Melanoma Models and Inhibits Angiogenesis With Decrease of ERK1/2 Phosphorylation*. Journal of Pharmacological Sciences, 2014. **126**(3): p. 198-207.
191. Fraga, C.G., et al., *Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols*. Molecular Aspects of Medicine, 2010. **31**(6): p. 435-445.
192. Bowsher C., S.M., Tobin A., *Plant Biochemistry*. 2008. **Garland Science. Taylor & Francis Group, New York & Abigdon**.
193. Hu, M., *Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms*. Mol Pharm, 2007. **4**(6): p. 803-6.
194. Vacek J., et al., *Analytical methods and strategies in the study of plant polyphenolics in clinical samples*. Anal. Methods, 2010. **2**: p. 604–613.
195. Lall, R., et al., *Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(2): p. 3350-3376.
196. Gorlach, S., J. Fichna, and U. Lewandowska, *Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs*. Cancer Letters, 2015. **366**(2): p. 141-149.
197. Huang, W.Y., Y.Z. Cai, and Y.B. Zhang, *Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention*. Nutrition and Cancer- an International Journal, 2010. **62**(1): p. 1-20.
198. Danesi, F., et al., *Mixed Pro- and Anti-Oxidative Effects of Pomegranate Polyphenols in Cultured Cells*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(11): p. 19458-19471.
199. Hsieh, J.F., et al., *Phylogenetic diversity and conservation of protected click beetles (*Campsosternus* spp.) in Taiwan: a molecular approach to clarifying species status*. Journal of Insect Conservation, 2014. **18**(6): p. 1059-1071.
200. Lewandowska, U., et al., *Flavanols from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit inhibit human prostate and breast cancer cell line invasiveness and cause favorable changes in Bax/Bcl-2 mRNA ratio*. Nutr Cancer, 2013. **65**(2): p. 273-85.
201. Shu, X.K., et al., *Preparative separation of polyphenols from the flowers of *Paeonia lactiflora* Pall. by high-speed chromatography*. Journal of chromatography B-Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences, 2014. **947**: p. 62-67.
202. Gorlach, S., et al., *Procyanidins from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit induce apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells in a degree of polymerization-dependent manner*. Nutr Cancer, 2011. **63**(8): p. 1348-60.
203. Lewandowska, U., et al., *Flavanols from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds inhibit prostate cells invasiveness and cause changes in Bcl-2/Bax mRNA ratio*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(12): p. 2987-98.
204. Duluc, L., et al., *Delphinidin inhibits VEGF induced-mitochondrial biogenesis and Akt activation in endothelial cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **53**: p. 9-14.
205. Lewandowska, U., et al., *Procyanidins from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds inhibit invasiveness of breast cancer cells and modulate the expression of selected genes involved in angiogenesis, metastasis, and apoptosis*. Nutr Cancer, 2013. **65**(8): p. 1219-31.
206. Salaga, M., et al., *Polyphenol extract from evening primrose pomace alleviates experimental colitis after intracolonic and oral administration in mice*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2014. **387**(11): p. 1069-78.

REFERENCE

207. Zielinska, M., et al., *Orally available extract from Brassica oleracea var. capitata rubra attenuates experimental colitis in mouse models of inflammatory bowel diseases*. Journal of Functional Foods, 2015. **17**: p. 587-599.
208. Symonds, E.L., I. Konczak, and M. Fenech, *The Australian fruit Illawarra plum (Podocarpus elatus Endl., Podocarpaceae) inhibits telomerase, increases histone deacetylase activity and decreases proliferation of colon cancer cells*. British Journal of Nutrition, 2013. **109**(12): p. 2117-2125.
209. Li, B.H., et al., *Structure-activity relationship of polyphenols that inhibit fatty acid synthase*. Journal of Biochemistry, 2005. **138**(6): p. 679-685.
210. Herbert, R.B., *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Chapman and Hall, London 1989.
211. Xiao, J., et al., *A review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting alpha-amylase*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2013. **53**(5): p. 497-506.
212. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009. **2**(5): p. 270-278.
213. Scalbert, A., et al., *Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005. **45**(4): p. 287-306.
214. Sun, Y. and L.W. Oberley, *Redox regulation of transcriptional activators*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. **21**(3): p. 335-348.
215. Scott, D.W., V. Edwards, and G. Loo, *Curcumin induces DNA damage and GADD gene expression in colon cancer cells*. Faseb Journal, 2003. **17**(5): p. A1162-A1163.
216. Schuler, M., et al., *p53 Induces Apoptosis by Caspase Activation through Mitochondrial Cytochrome c Release*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(10): p. 7337-7342.
217. Shimizu, M., *(-)-Epigallocatechin Gallate and Polyphenon E Inhibit Growth and Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Signaling Pathways in Human Colon Cancer Cells*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(7): p. 2735-2746.
218. Selvendiran, K., *Luteolin Promotes Degradation in Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Human Hepatoma Cells: An Implication for the Antitumor Potential of Flavonoids*. Cancer Research, 2006. **66**(9): p. 4826-4834.
219. Michels, G., et al., *Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells*. Toxicology, 2005. **206**(3): p. 337-348.
220. Giovannini, C., et al., *Apoptosis in cancer and atherosclerosis: polyphenol activities*. Ann Ist Super Sanita, 2007. **43**(4): p. 406-16.
221. Bravo, L., *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews, 1998. **56**(11): p. 317-333.
222. Ramos, S., *Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2007. **18**(7): p. 427-442.
223. *Plant biochemistry*. Choice Reviews Online, 2008. **46**(04): p. 46-2081-46-2081.
224. Quideau, S., et al., *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(3): p. 586-621.
225. Aiyegoro, O.A. and A.I. Okoh, *Phytochemical Screening and Polyphenolic Antioxidant Activity of Aqueous Crude Leaf Extract of Helichrysum pedunculatum*. International Journal of Molecular Sciences, 2009. **10**(11): p. 4990-5001.
226. Barnes, S. and J. Prasain, *Current progress in the use of traditional medicines and nutraceuticals*. Current Opinion in Plant Biology, 2005. **8**(3): p. 324-328.
227. Akram, M. and S.A. Siddiqui, *Breast cancer management: Past, present and evolving*. Indian Journal of Cancer, 2012. **49**(3): p. 277.

REFERENCE

228. Begum, S.A., M. Sahai, and A.B. Ray, *Non-conventional lignans: coumarinolignans, flavonolignans, and stilbenolignans*. Fortschr Chem Org Naturst, 2010. **93**: p. 1-70.
229. Pelter, A. and R. Hänsel, *The structure of silybin (silybum substance E6), the first flavonolignan*. Tetrahedron Letters, 1968. **9**(25): p. 2911-2916.
230. Simanek, V., et al., *Silymarin: What is in the name...? An appeal for a change of editorial policy*. Hepatology, 2000. **32**(2): p. 442-4.
231. Kim, N.-C., et al., *Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (Silybum marianum)* Electronic supplementary information (ESI) available: *HPLC chromatograms of isolates and extracts*. See <http://www.rsc.org/suppdata/ob/b3/b300099k>. Organic & Biomolecular Chemistry, 2003. **1**(10): p. 1684.
232. Hansel R., Schulz J., and P. A., *Struktur Des Silybins, II. Synthese Des Dehydrosilybinpentamethylaethers und verwandter Verbindungen*. Chem. Ber., 1975. **108**: p. 1482.
233. Schopen, R.D., et al., *[Searching for a new therapeutic principle. Experience with hepatic therapeutic agent Legalon]*. Med Welt, 1969. **20**(15): p. 888-93.
234. Pelter, A. and R. Hänsel, *Struktur des Silybins: I. Abbauversuche*. Chemische Berichte, 1975. **108**(3): p. 790-802.
235. Gazak, R., D. Walterova, and V. Kren, *Silybin and Silymarin - New and Emerging Applications in Medicine*. Current Medicinal Chemistry, 2007. **14**(3): p. 315-338.
236. Biedermann, D., et al., *Chemistry of silybin*. Nat. Prod. Rep., 2014. **31**(9): p. 1138-1157.
237. Džubák, P., et al., *New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006. **14**(11): p. 3793-3810.
238. Deep, G. and R. Agarwal, *Chemopreventive Efficacy of Silymarin in Skin and Prostate Cancer*. Integrative Cancer Therapies, 2007. **6**(2): p. 130-145.
239. Škottová, N., V. Krečman, and V. Šimánek, *Activities of silymarin and its flavonolignans upon low density lipoprotein oxidizability in vitro*. Phytotherapy Research, 1999. **13**(6): p. 535-537.
240. Kren, V. and D. Walterova, *Silybin and silymarin - new effects and applications*. Biomedical Papers, 2005. **149**(1): p. 29-41.
241. Ágoston, M., et al., *Silymarin and vitamin E reduce amiodarone-induced lysosomal phospholipidosis in rats*. Toxicology, 2003. **190**(3): p. 231-241.
242. Wang, M.-J., et al., *Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation*. European Journal of Neuroscience, 2002. **16**(11): p. 2103-2112.
243. E., K., *Silymarin in the Treatment of Liver Diseases*. Freiburg im Breisgau, Falk Foundation e. V, Freiburg, Germany., 1998: p. 8-50.
244. Crocenzi, F. and M. Roma, *Silymarin as a New Hepatoprotective Agent in Experimental Cholestasis: New Possibilities for an Ancient Medication*. Current Medicinal Chemistry, 2006. **13**(9): p. 1055-1074.
245. Hoofnagle, J.H., *Milk thistle and chronic liver disease*. Hepatology, 2005. **42**(1): p. 4-4.
246. Federico, A., M. Dallio, and C. Loguercio, *Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years*. Molecules, 2017. **22**(2).
247. Valenzuela, A. and A. Garrido, *Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin*. Biol Res, 1994. **27**(2): p. 105-12.
248. Ramasamy, K. and R. Agarwal, *Multitargeted therapy of cancer by silymarin*. Cancer Lett, 2008. **269**(2): p. 352-62.

REFERENCE

249. Singh, R.P. and R. Agarwal, *Prostate cancer chemoprevention by silibinin: Bench to bedside*. Molecular Carcinogenesis, 2006. **45**(6): p. 436-442.
250. Singh, R.P. and R. Agarwal, *A cancer chemopreventive agent silibinin, targets mitogenic and survival signaling in prostate cancer*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2004. **555**(1-2): p. 21-32.
251. Zi, X., et al., *A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells*. Cancer Res, 1998. **58**(9): p. 1920-9.
252. Tyagi, A., et al., *Antiproliferative and apoptotic effects of silibinin in rat prostate cancer cells*. Prostate, 2002. **53**(3): p. 211-7.
253. Scambia, G., et al., *Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin*. European Journal of Cancer, 1996. **32**(5): p. 877-882.
254. Zi, X., D.K. Feyes, and R. Agarwal, *Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(4): p. 1055-64.
255. Sharma, G., et al., *Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells*. Anticancer Res, 2003. **23**(3B): p. 2649-55.
256. Tyagi, A., et al., *Chemopreventive effects of silymarin and silibinin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice*. Molecular Cancer Therapeutics, 2007. **6**(12): p. 3248-3255.
257. Tyagi, A., et al., *Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages*. Carcinogenesis, 2004. **25**(9): p. 1711-20.
258. Wu, K.-j., et al., *Silibinin inhibits prostate cancer invasion, motility and migration by suppressing vimentin and MMP-2 expression*. Acta Pharmacologica Sinica, 2009. **30**(8): p. 1162-1168.
259. Roy, S., et al., *p21 and p27 induction by silibinin is essential for its cell cycle arrest effect in prostate carcinoma cells*. Molecular Cancer Therapeutics, 2007. **6**(10): p. 2696-2707.
260. Raina, K., et al., *Dietary Feeding of Silibinin Inhibits Prostate Tumor Growth and Progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Model*. Cancer Research, 2007. **67**(22): p. 11083-11091.
261. Singh, R.P., et al., *Silibinin Inhibits Established Prostate Tumor Growth, Progression, Invasion, and Metastasis and Suppresses Tumor Angiogenesis and Epithelial-Mesenchymal Transition in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Model Mice*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(23): p. 7773-7780.
262. Singh, R.P., et al., *Silibinin Suppresses Growth of Human Prostate Carcinoma PC-3 Orthotopic Xenograft via Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Inhibition of Signal Transducers and Activators of Transcription Signaling*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(2): p. 613-621.
263. Tyagi, A., et al., *Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells*. Oncology Reports, 2004.
264. Lee, S.-O., et al., *Silibinin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the AP-1 activation via MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **354**(1): p. 165-171.

REFERENCE

265. Gu, M., et al., *Silibinin Inhibits Inflammatory and Angiogenic Attributes in Photocarcinogenesis in SKH-1 Hairless Mice*. *Cancer Research*, 2007. **67**(7): p. 3483-3491.
266. Singh, R.P., M. Gu, and R. Agarwal, *Silibinin Inhibits Colorectal Cancer Growth by Inhibiting Tumor Cell Proliferation and Angiogenesis*. *Cancer Research*, 2008. **68**(6): p. 2043-2050.
267. Singh, R.P., et al., *Effect of Silibinin on the Growth and Progression of Primary Lung Tumors in Mice*. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 2006. **98**(12): p. 846-855.
268. Cheung, C.W., et al., *Therapeutic value of orally administered silibinin in renal cell carcinoma: manipulation of insulin-like growth factor binding protein-3 levels*. *BJU International*, 2007. **100**(2): p. 438-444.
269. Li, L., et al., *Silibinin inhibits cell growth and induces apoptosis by caspase activation, down-regulating survivin and blocking EGFR-ERK activation in renal cell carcinoma*. *Cancer Letters*, 2008. **272**(1): p. 61-69.
270. Tyagi, A.K., et al., *Silibinin down-regulates survivin protein and mRNA expression and causes caspases activation and apoptosis in human bladder transitional-cell papilloma RT4 cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003. **312**(4): p. 1178-1184.
271. Tyagi, A., et al., *Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase-mediated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder transitional-cell papilloma RT4 cells: evidence for a regulatory loop between p53 and caspase 2*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(11): p. 2269-2280.
272. Singh, R.P., et al., *Oral Silibinin Inhibits In vivo Human Bladder Tumor Xenograft Growth Involving Down-Regulation of Survivin*. *Clinical Cancer Research*, 2008. **14**(1): p. 300-308.
273. Li, L., et al., *Targeting silibinin in the antiproliferative pathway*. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2010. **19**(2): p. 243-255.
274. Zeng, J., et al., *Chemopreventive and Chemotherapeutic Effects of Intravesical Silibinin against Bladder Cancer by Acting on Mitochondria*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2011. **10**(1): p. 104-116.
275. Yu, J., et al., *Gambogic acid-induced G2/M phase cell-cycle arrest via disturbing CDK7-mediated phosphorylation of CDC2/p34 in human gastric carcinoma BGC-823 cells*. *Carcinogenesis*, 2006. **28**(3): p. 632-638.
276. Choi, H.J., D.Y. Lim, and J.H.Y. Park, *Induction of G1 and G2/M cell cycle arrests by the dietary compound 3,3'-diindolylmethane in HT-29 human colon cancer cells*. *BMC Gastroenterology*, 2009. **9**(1).
277. Hong, C.B., et al., *3,3'-Diindolylmethane (DIM) induces a G(1) cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21(WAF1/CIP1) expression*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(8): p. 1297-1305.
278. Kim, S., et al., *Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression and VEGF secretion by inactivation of the Raf/MEK/ERK pathway in MCF-7 human breast cancer cells*. *Phytomedicine*, 2009. **16**(6-7): p. 573-580.
279. Deep, G., et al., *Isosilybin B and isosilybin A inhibit growth, induce G1 arrest and cause apoptosis in human prostate cancer LNCaP and 22Rv1 cells*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(7): p. 1533-1542.
280. Huber, A., et al., *Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2008. **1780**(5): p. 837-847.

REFERENCE

281. Thongphasuk, P., W. Stremmel, and W. Chamulitrat, *Potent direct or TNF-alpha-promoted anticancer effects of 2,3-dehydrosilybin: comparison study with silybin*. *Chemotherapy*, 2008. **54**(1): p. 23-30.
282. Thongphasuk, P., W. Stremmel, and W. Chamulitrat, *2,3-Dehydrosilybin Is a Better DNA Topoisomerase I Inhibitor than Its Parental Silybin*. *Chemotherapy*, 2009. **55**(1): p. 42-48.
283. Gažák, R., et al., *Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004. **12**(21): p. 5677-5687.
284. Zatloukalová, M., et al., *Electrochemical investigation of flavonolignans and study of their interactions with DNA in the presence of Cu(II)*. *Bioelectrochemistry*, 2011. **82**(2): p. 117-124.
285. Svobodová, A., D. Walterová, and J. Psotová, *Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts*. *Burns*, 2006. **32**(8): p. 973-979.
286. Bandopad.M, T.R. Seshadri, and N.P. Pardeshi, *Components of Silybum-Marianum*. *Indian Journal of Chemistry*, 1972. **10**(8): p. 808-&.
287. Kidd, P. and K. Head, *A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos)*. *Altern Med Rev*, 2005. **10**(3): p. 193-203.
288. Kren, V., Kubisch, J., Sedmera, P., Halada, P., Prikrylova, V., Jegorov, A, Cvak., L, Gebhardt, R., J. Ulrichova, Simanek, V. , and e. al., *Glycosilation of Silybin*. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*, 1997: p. 2467.
289. Kubisch, J., Sedmera, P., Halada, P., Gazak, R., Skottova, N., Simanek, V., Kren, V., *Chemoenzymatic Preparation of Oligoglycosides of Silybin, the Flavonolignan from Silybum marianum*. *Heterocycles*, 2001. **53**: p. 901.
290. Pliskova, M., et al., *Effects of silymarin flavonolignans and synthetic silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation*. *Toxicology*, 2005. **215**(1-2): p. 80-89.
291. Maitrejean, M., et al., *The flavanolignan silybin and its hemisynthetic derivatives, a novel series of potential modulators of P-glycoprotein*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000. **10**(2): p. 157-60.
292. Dzubak, P., et al., *New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(11): p. 3793-810.
293. Goss, R.J.M., S. Shankar, and A.A. Fayad, *The generation of "unNatural" products: Synthetic biology meets synthetic chemistry*. *Natural Product Reports*, 2012. **29**(8): p. 870.
294. Gottlieb, O.R., M.A.C. Kaplan, and K. Kubitzki, *A Suggested Role of Galloyl Esters in the Evolution of Dicotyledons*. *Taxon*, 1993. **42**(3): p. 539-552.
295. Karas, D., J. Ulrichova, and K. Valentova, *Galloylation of polyphenols alters their biological activity*. *Food Chem Toxicol*, 2017. **105**: p. 223-240.
296. Ikeda, I., *Multifunctional effects of green tea catechins on prevention of the metabolic syndrome*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2008. **17 Suppl 1**: p. 273-4.
297. Ikeda, I., et al., *Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats*. *J Nutr*, 2005. **135**(2): p. 155-9.
298. Meselhy, M.R., N. Nakamura, and M. Hattori, *Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1997. **45**(5): p. 888-893.

REFERENCE

299. Kondo, T., et al., *Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding*. Cancer Letters, 2002. **180**(2): p. 139-144.
300. Gažák, R., et al., *Synthesis and Antiangiogenic Activity of New Silybin Galloyl Esters*. Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **54**(20): p. 7397-7407.
301. Tasdemir, D., et al., *Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(4): p. 1352-64.
302. Hsu, S., *Compounds Derived from Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) as a Novel Approach to the Prevention of Viral Infections*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2015. **14**(1): p. 13-8.
303. Kajimoto O., et al., *Tea catechins with a galloyl moiety reduce body weight and fat*. Journal of Health Science, 2005. **51**: p. 161-171.
304. Bettuzzi, S., et al., *Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1234-40.
305. Jatoi, A., et al., *A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(6): p. 1442-6.
306. Feldman, K.S., et al., *Immunostimulation by plant polyphenols: a relationship between tumor necrosis factor-alpha production and tannin structure*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(7): p. 985-90.
307. Nishizawa, M., et al., *[Quantitative determination of gallotannin in Paeoniae Radix]*. Yakugaku Zasshi, 1984. **104**(12): p. 1244-50.
308. Zhang, J., et al., *Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose*. Pharm Res, 2009. **26**(9): p. 2066-80.
309. Chung K.-T., Wei C.-I., and J.M. G., *Are tannins a double-edged sword in biology and health ?* Trends in Food Science & Technology, 1998. **9**: p. 168-175.
310. Karas, D., et al., *Effects of 2,3-Dehydrosilybin and Its Galloyl Ester and Methyl Ether Derivatives on Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. J Nat Prod, 2016. **79**(4): p. 812-20.
311. Vanden Berghe, T., et al., *Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo*. Methods, 2013. **61**(2): p. 117-129.
312. Pivodová V., Z.S., Karas D., Valentová K., Ulrichova, J., *In vitro study of 2,3-dehydrosilybin and its galloyl esters as potential inhibitors of angiogenesis* Pharmazie, 2016. **71**: p. 478-483(6).
313. Modriansky, M., et al., *Přírodní látky v prevenci onemocnění trávicího traktu*. Chem. Listy, 2003. **97**: p. 540-547.
314. Gažák, R., et al., *Synthesis and antiangiogenic activity of new silybin galloyl esters*. J. Med. Chem., 2011. **54**(20): p. 7397-7407.
315. Trouillas, P., et al., *Mechanism of the Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study*. The Journal of Physical Chemistry A, 2008. **112**(5): p. 1054-1063.
316. Zhao, B. and M. Hu, *Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells*. Oncol. Lett., 2013. **6**(6): p. 1749-1755.
317. Agarwal, C., et al., *Anti-Cancer Efficacy of Silybin Derivatives - A Structure-Activity Relationship*. PLoS ONE, 2013. **8**(3): p. e60074.

REFERENCE

318. Nor, J.E. and P.J. Polverini, *Role of endothelial cell survival and death signals in angiogenesis*. *Angiogenesis*, 1999. **3**(2): p. 101-16.
319. Singh, R.P., et al., *Silibinin strongly inhibits growth and survival of human endothelial cells via cell cycle arrest and downregulation of survivin, Akt and NF-kappaB: implications for angioprevention and antiangiogenic therapy*. *Oncogene*, 2005. **24**(7): p. 1188-202.
320. Gazak, R., et al., *Synthesis and Antiangiogenic Activity of New Silybin Galloyl Esters*. *J Med Chem*, 2011. **54**(20): p. 7397-7407.
321. Shimo, T., et al., *Connective Tissue Growth Factor Induces the Proliferation, Migration, and Tube Formation of Vascular Endothelial Cells In Vitro, and Angiogenesis In Vivo*. *Journal of Biochemistry*, 1999. **126**(1): p. 137-145.
322. Jiang, Q., et al., *Anti-angiogenic activities of CRBGP from buccal glands of lampreys (Lampetra japonica)*. *Biochimie*, 2015.
323. Lu, K. and S. Basu, *The natural compound chebulagic acid inhibits vascular endothelial growth factor A mediated regulation of endothelial cell functions*. *Scientific Reports*, 2015. **5**(1).
324. Rárová, L., et al., *Brassinosteroids inhibit in vitro angiogenesis in human endothelial cells*. *Steroids*, 2012. **77**(13): p. 1502-1509.
325. Sousa, M., et al., *Red Raspberry Phenols Inhibit Angiogenesis: A Morphological and Subcellular Analysis Upon Human Endothelial Cells*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2016. **117**(7): p. 1604-1612.
326. Wang, S., et al., *The natural compound codonolactone impairs tumor induced angiogenesis by downregulating BMP signaling in endothelial cells*. *Phytomedicine*, 2015. **22**(11): p. 1017-1026.
327. Jiang, C., R. Agarwal, and J. Lu, *Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **276**(1): p. 371-8.
328. R, A., *Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents*. *Biochemical Pharmacology*, 2000. **60**(8): p. 1051-1059.
329. Deep, G., et al., *Angiopreventive Efficacy of Pure Flavonolignans from Milk Thistle Extract against Prostate Cancer: Targeting VEGF-VEGFR Signaling*. *Plos One*, 2012. **7**(4): p. e34630.
330. Liu, J.J., et al., *Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics*. *Cancer Lett*, 2011. **300**(2): p. 105-14.
331. Safarzadeh, E., S. Sandoghchian Shotorbani, and B. Baradaran, *Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment*. *Adv Pharm Bull*, 2014. **4**(Suppl 1): p. 421-7.
332. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
333. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and S.W. Lowe, *Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy*. *Cell*, 2002. **108**(2): p. 153-64.
334. Vanden Berghe, T., et al., *Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo*. *Methods*, 2013. **61**(2): p. 117-29.
335. Gažák, R., et al., *Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004. **12**(21): p. 5677-5687.
336. Svobodova, A., D. Walterova, and J. Psotova, *Influence of silymarin and its flavonolignans on H2O2-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts*. *Burns*, 2006. **32**(8): p. 973-979.

REFERENCE

337. Huber, A., et al., *Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008. **1780**(5): p. 837-847.
338. Mukhtar, H. and N. Ahmad, *Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(6 Suppl): p. 1698S-702S; discussion 1703S-4S.
339. Roy, M.K., et al., *Antiproliferative effect on human cancer cell lines after treatment with nimbolide extracted from an edible part of the neem tree (Azadirachta indica)*. *Phytother Res*, 2007. **21**(3): p. 245-50.
340. Kim, W.K., et al., *Antitumor Activity of Spicatoside A by Modulation of Autophagy and Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells*. *J Nat Prod*, 2016. **79**(4): p. 1097-104.