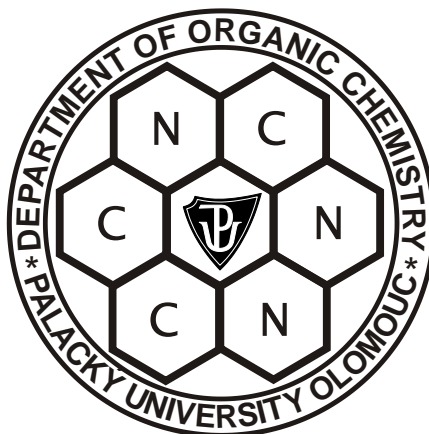


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Markéta STONOVÁ

**Využití analýzy buněčného cyklu a ploidie metodou
průtokové cytometrie v klinické diagnostice a vývoji nových
protinádorových léčiv**

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: Mgr. Petr Konečný

Olomouc 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 3.8.2012

.....

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Petru Konečnému za odborné vedení, předané zkušenosti, cenné rady a připomínky, které mi při tvorbě práce poskytl. Renatě Buriánové za věnovaný čas a ochotu a také celému kolektivu Laboratoře experimentální medicíny v Olomouci. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině a blízkým za jejich podporu při realizaci tohoto projektu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení:	Markéta Stonová
Název práce:	Využití analýzy buněčného cyklu a ploidie metodou průtokové cytometrie v klinické diagnostice a vývoji nových protinádorových léčiv
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř experimentální medicíny, Ústav Molekulární a Translační Medicíny LF UP a FN Olomouc
Vedoucí práce:	Mgr. Petr Konečný
Rok obhajoby práce:	2012
Abstrakt:	Nádorová onemocnění představují závažný společenský problém po celém světě. Tím většího významu nabývá snaha prozkoumat všechny příčiny tohoto onemocnění a najít vhodné léčivo vykazující protinádorový účinek. U žen je nejčastější gynekologickou malignitou karcinom endometria. Proto jsem si tuto problematiku zvolila jako téma své bakalářské práce, kde jsem věnovala pozornost analýze změn ploidie nádorových buněk a zjištění účinku testovaných látek s potenciálním protirakovinovým účinkem. K tomuto účelu byla zvolena metoda průtokové cytometrie, která našla uplatnění v širokém spektru bioanalýz. Ke studii vlivu na regulaci buněčného cyklu byly využity deriváty salicylaldehydu syntetizované na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze.
Klíčová slova:	Karcinom endometria, buněčný cyklus, buněčná smrt, ploidie, cytostatika, průtoková cytometrie
Počet stran:	44
Počet příloh:	6
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Markéta Stonová

Title: Application of cell cycle analysis and ploidy by flow cytometry methods in clinical diagnosis and new anticancer drugs development

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and dentistry, Palacky University and Faculty Hospital in Olomouc

Advisor: Mgr. Petr Konečný

The year of presentation: 2012

Abstract: Cancer represents a serious social problem worldwide. Therefore more effort is required, to explore the significance of all the causes of this disease and find a suitable pharmaceuticals showing antitumor effects. The most common feminine gynecological malignancy is endometrial cancer. That's why I have chosen this problematic as a topic of my thesis, where I focused my attention to the ploidy change analysis of tumor cell and the effects of tested salicylaldehyde derivatives with potential anticancer effects. Flow cytometry was chosen in this case for its use in a wide range of bioanalysis. Derivatives were used for study of cell cycle regulation influence. Mentioned above were synthesized at The Institute of Chemical Technology in Prague.

Keywords: Endometrial cancer, cell cycle, cell death, ploidy, cytostatics, flow cytometry

Number of pages: 44

Number of appendixes: 6

Language: Czech

Seznam zkratk

AIDS	Syndrom získaného selhání imunity
ATP	Adenosintrifosfát
BrU	5-bromuracil
Brdu	5-brom-2'-deoxyuridine
BSA	Hovězí sérový albumin
CDK	Cyklin-dependentní kináza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FBS	Fetální hovězí sérum
FCM	Průtoková cytometrie
FIGO	Mezinárodní federace gynekologů a porodníků
FSC	Přímý rozptyl
p53	Protein kódovaný genem <i>TP53</i>
mAb	Monoklonální protilátka
MTT	3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
PBS	Fosfátový pufr
pRB	Protein Retinoblastoma
RNA	Ribonukleová kyselina
RNAása	Enzym štěpící ribonukleovou kyselinu
RP	Restikční bod
SSC	Boční rozptyl

Obsah

Cíle práce	9
I. Teoretická část	10
1. Karcinom endometria	11
1.1. Incidence onemocnění	11
1.2. Predisponující a protektivní faktory	11
1.3. Diagnostika	12
1.4. Léčba a prognóza	14
1.4.1. Konvenční chemoterapie	14
2. Buněčný cyklus	15
2.1. Fáze buněčného cyklu	15
2.2. Regulace buněčného cyklu	16
2.3. Cyklin-dependentní kinázy	16
2.4. Maligní transformace	17
2.5. Buněčná smrt	18
3. Průtoková cytometrie	20
3.1. Princip FCM	20
II. Experimentální část	22
4. Chemikálie a přístrojové vybavení	23
4.1. Materiály a přístrojové vybavení	23
4.2. Chemikálie	23
4.3. Příprava roztoků	24
5. Analýza ploidie nádorové tkáně metodou průtokové cytometrie	25
5.1. Příprava buněk pro měření na průtokovém cytometru FACSCalibur	25
5.2. Softwarové vybavení	26
6. Testování vybraných cytostatik	26
6.1. Buněčné kultury	26
6.2. Princip MTT testu	26
6.3. Testované deriváty	27
6.4. Příprava buněčných kultur k testování	27
6.5. Postup jednotlivých analytických metod	28

7. Výsledky	32
Závěr	38
Přílohy	39
Seznam literatury	43

Cíle práce

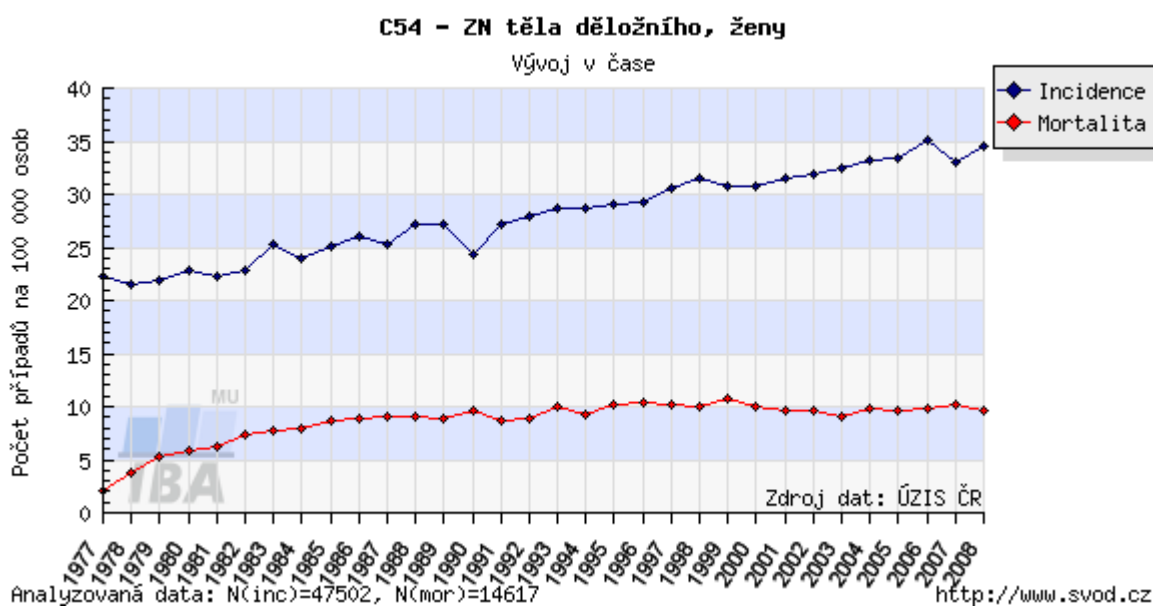
- 1.** Zpracování vzorků nádorové tkáně fixovaných v parafinových bločcích metodou průtokové cytometrie a určení ploidie nádorové buněčné populace ve srovnání s referenčním standardem.
- 2.** Zjištění účinku vybraných látek s potenciálním protinádorovým účinkem metodou měření buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. Karcinom endometria

1.1. Incidence onemocnění

Karcinom endometria je nejčastěji se vyskytující gynekologickou malignitou. V České republice byla v roce 2008 incidence 34,44 případů na 100 000 osob a mortalita 9,55 případů na 100 000 osob. (Graf 1) Vysoká incidence karcinomu endometria byla pozorována ve všech vyspělých zemi, především v Severní Americe, Evropě a Austrálii. Hodnoty České republiky jsou ve srovnání s evropským i světovým standardem vyšší. Nejvyšší procento tohoto onemocnění je zaznamenáno u žen ve věku 60-64 let, a to 16,09%. (Graf 2)

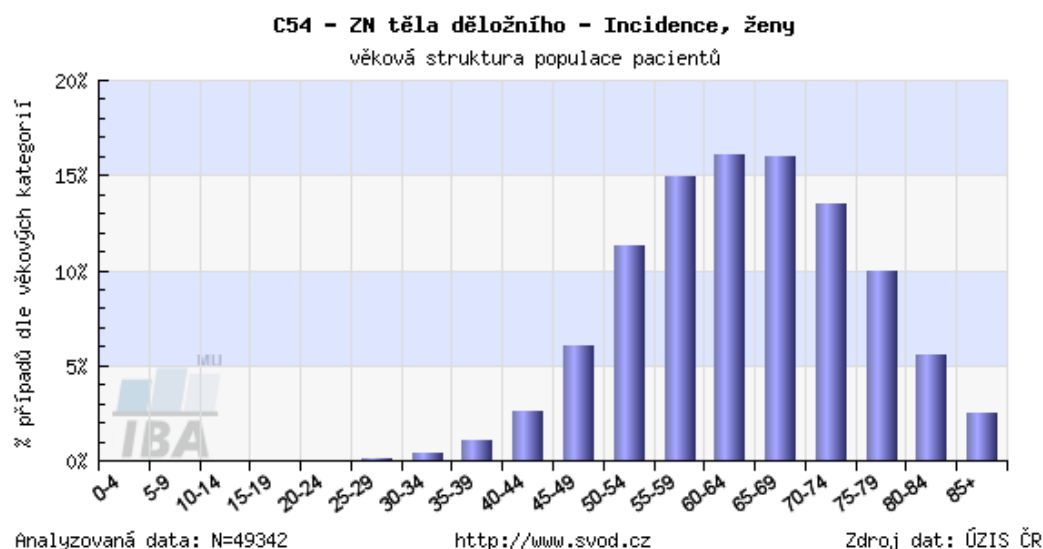


Graf 1: Incidence a mortalita onemocnění v ČR v letech 1977-2008 ^[17] - incidence onemocnění má dlouhodobě stoupající tendenci, mortalita se naopak výrazně nemění. $N(inc)$ a $N(mor)$ značí velikost analyzované skupiny pacientů.

1.2. Predisponující a protektivní faktory

Mezi nejvýraznější predisponující faktory patří především zvyšující se průměrná délka života žen a tím také nárůst jejich počtu v rizikové skupině, pozdní menopauza, obezita, nuliparita, sterilita, neplodnost, diabetes mellitus (zejména I. typu), hypertenze spojená s obezitou a léčba tamoxifenem. Mezi protektivní faktory řadíme početné porody (žena po prvním porodu má o polovinu nižší riziko než nulipara

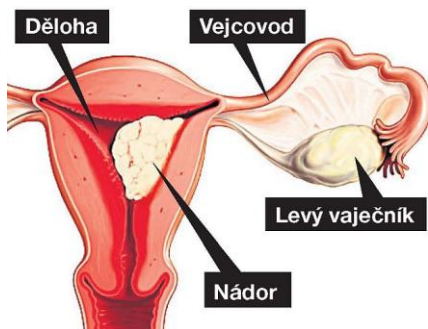
díky ochrannému účinku progesteronu), hormonální antikoncepce, fyzická aktivita a kouření, které snižuje riziko výskytu karcinomu o 30%. [1, 25]



Graf 2: Incidence onemocnění podle věkových skupin žen v ČR [18] – s nejvyšší incidencí karcinomu se setkáváme ve věkové skupině žen od 60- 64 let. Analýza zahrnuje výsledky 49 342 pacientů.

1.3. Diagnostika

Diagnostika a příslušná terapie nádorového bujení v časném stádiu vede k nejlepším léčebným výsledkům. K tomu patří i sledování prekancerózních stavů. Pojmem prekanceróza rozumíme histopatologické změny tělní tkáně, které ještě nejsou definovány jako nádorové bujení, ale které za určitých podmínek mají tendenci v nádorové bujení přejít. Prekancerózou karcinomu děložní sliznice bývá tzv. atypická hyperplazie endometria, která progreduje do karcinomu ve 29% – 40% případů. Buňky nekontrolovatelně cyklují, což má za následek zvětšení části dělohy (*Obr.1*) za současného abnormálního vaginálního krvácení. Růst děložní sliznice je závislý na přísunu estrogenů, tudíž lze předpokládat, že nádor bude nabývat společně se vzrůstající hladinou těchto hormonů, považujeme ho tedy za hormonálně-dependentní. [2] Rozlišujeme dva druhy tohoto karcinomu: typ I – estrogen dependentní, jehož incidence tvoří majoritní podíl, a to až 80% a typ II – estrogen non-dependentní, jehož bujení není závislé na hladině hormonů. Většinou platí, že typ I mívá lepší prognózu – procentuální míra pětiletého přežití činí 85%, kdežto u druhého typu karcinomu se setkáváme s hodnotou 58%. [2]

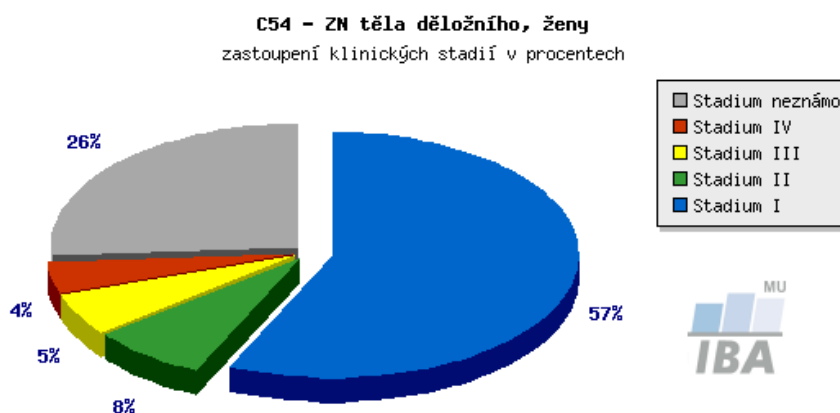


Obr.1: Sliznice postižená karcinomem ^[26] - karcinom endometria je nejčastěji se vyskytující gynekologickou malignitou.

Stadia endometriálního karcinomu (popsaná dle tzv. FIGO klasifikace):

- 0. stadium:* prekanceróza, nádor nevykazuje žádný infiltrativní růst
- I. stadium:* nádor postihuje pouze tělo dělohy
- II. stadium:* nádor se šíří i na děložní čípek
- III. stadium:* nádor proniká na povrch dělohy, v pochvě zakládá ložisko či postihuje lymfatické uzliny.
- IV. stadium:* v této fázi nádor prorůstá do močového měchýře, střev či tvoří vzdálené metastáze

Průměrné zastoupení klinických stadií v letech 1977 – 2009: (Graf 3)



Analyzovaná data: N=49342

Zdroj dat: ÚZIS ČR

<http://www.svod.cz>

Graf 3: Průměrné zastoupení klinických stadií karcinomu endometria v letech 1977 až 2009 ^[19] – nejčastěji diagnostikované je stadium I, tedy stadium prekancerózy, což

s vhodně zvolenou terapií vede k dobrým léčebným výsledkům. Analýza byla provedena na 49 342 pacientech.

1.4. Léčba a prognóza

Léčba endometriálního karcinomu vyžaduje individuální přístup závislý na klinickém stadiu onemocnění a kompletním stavu nemocného. Prognóza pětiletého přežití byla v roce 2007 v I. stadiu 86%, II. stadiu 66%, III. stadiu 44% a IV. klinickém stadiu 16%.^[1]

Mezi základní způsoby léčby patří nejčastěji chirurgický zákrok, radioterapie, konvenční chemoterapie, imunoterapie, hormonální léčba a jiné.

1.4.1. Konvenční chemoterapie

Konvenční chemoterapie má základy již ve 40. letech 20. století. V 60. a 70. letech se díky narůstajícímu počtu nově objevených látek s protinádorovým účinkem stala jednou z hlavních strategií při léčbě tumorů. Konvenční chemoterapie je založena na podávání tzv. cytostatik. Terapie těmito konvenčními cytostatiky svým zásahem do buněčného cyklu nádorové buňky iniciuje mimo jiné defekt DNA, zastavení proliferace buněk a následně podnítl start apoptotického mechanismu či jiné formy buněčné smrti, například přes protein p53 (viz. strana 18).^[5,6]

Podle mechanismu účinku můžeme cytostatika rozdělit do více skupin, přičemž nepoužívanější jsou např. alkylační cytostatika, antimetabolity a antimitotika.

a) Alkylační cytostatika

Účinek alkylačních cytostatik je založen na přenesení alkylových skupin na bázi DNA, vytvoření kovalentní vazby a potlačení proliferace nádorových buněk. Zástupcem je např. cyklofosfamid, melfalan, cisplatina a jiné platinové komplexy.^[5,6]

b) Antimetabolity

Antimetabolity jsou látky s podobnou chemickou strukturou jako mají jejich přirozené metabolity a jsou schopné interakce s odpovídajícími enzymy. Využívají své podobnosti při vstupu do metabolické dráhy a tím ji v určitém stupni zablokují, a to buď inhibicí určitého enzymu, či syntézou nefunkčních produktů. Mezi ně řadíme např. metotrexát – antimetabolit kyseliny listové, merkaptopurin – analogy purinu, 5-fluorouracil – analog pyrimidinu.^[5,6]

c) Antimitotika (Mitotické jedy)

Antimitotika jsou látky s inhibičním účinkem na mitózu. Jejich účinek spočívá v inhibici funkce mikrotubulů, aurora kináz nebo cyklin –dependentních kináz. Příkladem je vinblastin, vinkristin, kolchicin či skupina látek se souhrnným názvem taxany.

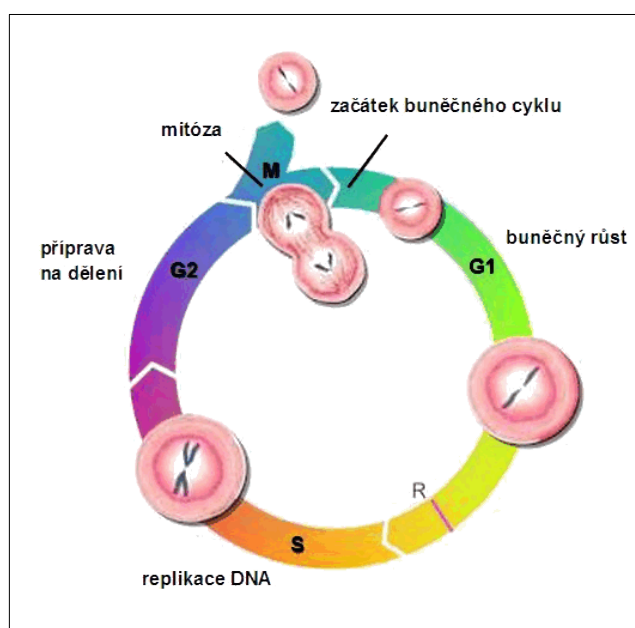
Mezi ostatní cytostatika patří např. inhibitory topoizomeráz, cytostatická antibiotika či různé druhy antihormonů.^[5,6]

2. Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je sled po sobě jdoucích procesů, vedoucí k rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné. Doba, kterou buněčný cyklus trvá, se nazývá doba generační.

2.1. Fáze buněčného cyklu

Obecně ho dělíme do 4 fází: G₁, S, G₂ a M. (Obr.2) Interfáze je doba mezi dvěma mitózami. G₁ fáze: Nazývaná také fází první přípravnou a tvoří zpravidla přibližně 40% generační doby. Buňka roste, duplikuje svou buněčnou hmotu, syntetizuje proteiny, tvoří zásoby nukleotidů a enzymů pro replikaci DNA.^[7]



Obr.2: Rozdělení buněčného cyklu podle jeho fází^[20] – během interfáze buňka roste, replikuje svoji DNA a připravuje se na své mitotické dělení. Vlastní mitóza probíhá

v mitotické fázi, kdy dochází k rozdělení chromozomů a cytoplazmy mezi dvě dceřiné buňky s totožnou genetickou výbavou.

Jestliže jsou splněny podmínky pro správný průběh, buňka přechází do *fáze S*, neboli fáze syntetické. V této fázi dochází k replikaci jaderné DNA na dvojnásobné množství, syntetizují se histony, které se podílí na tvorbě nových nukleozomů a chromatinového vlákna. Skončením S fáze následuje *fáze G₂*, neboli druhá přípravná, která zaujímá zpravidla 10-20% generační doby. V této postsyntetické fázi pokračuje růst buňky za současné intenzivní syntézy specifických proteinů a RNA. Buňka se připravuje na vlastní mitotické dělení. Poslední etapou buněčného cyklu tvoří *M fáze*, neboli mitotická, ve které se odehrává mitóza. Mitotické dělení zahajuje tzv. karyokineze, rozdělení jádra, která plynule přechází v cytokinezi, rozdělení buňky. Mitóza je klasifikována na 5 fází: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze. Během těchto fází dochází k podélnému rozdělení chromozómů, zaškrcení a distribuci cytoplazmy, čímž vznikají dvě dceřinné buňky se shodným karyotypem. ^[3,7]

2.2. Regulace buněčného cyklu

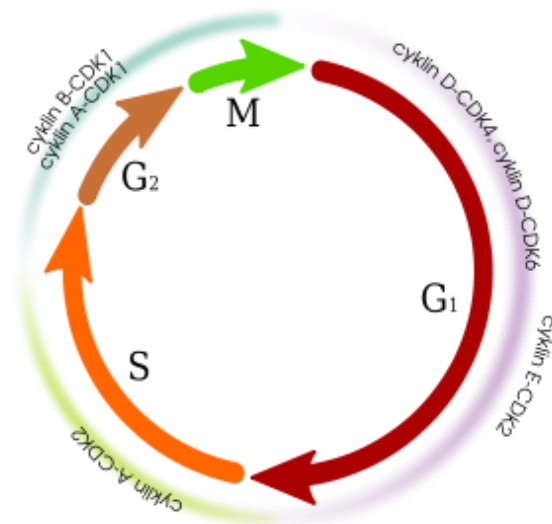
Poruchy regulace buněčného cyklu mohou vést až k nádorovému bujení. O tom, zda-li buňka přejde do další fáze cyklu, rozhodují tzv. kontrolní uzly na základě monitoringu kompletnosti jednotlivých kroků. Tyto uzly se nacházejí v G₁, G₂ a M fázi. Jestliže byly úspěšně dokončeny všechny procesy probíhající v dané fázi cyklu, buňka postoupí do další fáze. V G₁ fázi lidských buněk se tento uzel nazývá tzv. bod restrikce a zde buňka rozhoduje o tom, zda-li zahájí replikaci DNA či vstoupí do klidové, tzv. G₀ fáze. V G₂ fázi kontrolní uzel určuje vstup do mitózy a poslední bod v M fázi kontroluje přechod z metafáze do anafáze. V opačném případě buňka cyklus pozastaví a spustí korekci chyb, avšak pokud jsou detekovány rozsáhlejší poškození, které nelze opravit, je zahájena programovaná buněčná smrt, neboli apoptóza. ^[8]

2.3. Cyklin- dependentní kinázy

Principiální roli v regulaci buněčného cyklu hrají především dvě skupiny látek, tzv. cykliny a proteinkinázy. Proteinkinázy jsou enzymy ze skupiny kináz, které katalyzují vazbu fosfátové skupiny ATP na serinové nebo threoninové zbytky specifických proteinů. Přítomny jsou v průběhu celého cyklu a aktivní jen v určité době. Cykliny jsou regulační proteiny, které jsou aktivní pouze ve spojení s proteinkinázami za vzniku aktivního komplexu cyklin-CDK. Proto tyto proteinkinázy

nazýváme cyklin-dependentní kinázy - CDK. Aktivní komplex cyklin-CDK zajišťuje správnou posloupnost stadií buněčného cyklu tím, že fosforyluje proteiny specifické pro určitou fázi cyklu. Regulace koncentrace cyklinu je důležitá pro postupný nástup fází buněčného cyklu. Ta narůstá až na kritickou hladinu, tím se aktivuje odpovídající kináza a poté hladina cyklinu rapidně klesá. Souhrnně řečeno, CDK jsou regulovány jak syntézou a degradací cyklinu, tak jejich fosforylací a defosforylací. [4,9]

Existuje více typů cyklinů a CDK. Jednotlivé druhy cyklinů se značí písmeny, CDK číslicemi. Tímto způsobem tvoří se kombinace cyklinů a CDK spouštějí pro ně specifické kroky buněčného cyklu. V G_0 a v průběhu fáze G_1 je syntetizován cyklin D, který tvoří komplex s CDK 4/6. Rozhraní G_1 a S je typické přítomností komplexu cyklinu E a CDK2. Cyklin A se tvoří za současné syntézy DNA, tedy ve fázi S, kde se také sdružuje s CDK2. V pozdní části G_2 fáze se začne produkovat cyklin B a CDK1. [9,10,28] (Obr.3)



Obr.3: Regulace buněčného cyklu [21] – každá fáze buněčného cyklu je regulována specifickým typem cyklinu a CDK.

2.4. Maligní transformace

Nádorové onemocnění je složitý a víceúrovňový proces. Proces přeměny zdravé buňky v nádorovou označujeme jako maligní transformace, která je vyvolávána mutacemi v určitých genech. Gen, který podlehl mutaci a způsobuje rakovinné bujení, označujeme jako onkogen obvykle vzniká z proto-onkogenu, který řídí proliferaci a diferenciaci buněk. Například u kolorektálního či pankreatického karcinomu se jedná o tzv. K-ras onkogen. Kromě proto-onkogenních mutací se setkáváme taky s mutacemi

tumor-supresorových genů. Tyto tumor-supresorové geny (nazývané také antionkogeny či recesivní onkogeny) mají naopak antiproliferační charakter. Příklady takových antionkogenů jsou proteiny p53 a Retinoblastoma (pRB). Protein p53 je jaderný protein (velikost 53kDa) kódovaný genem TP53. Jeho role spočívá v regulaci genové exprese – při přijetí signálu o poškození DNA buď zastaví růst, nebo iniciuje programovanou buněčnou smrt. Výše zmíněný pRB zajišťuje regulaci restrikčního bodu v G₁ fázi. K zablokování tohoto bodu dochází v důsledku hypofosforylace proteinu Retinoblastoma, která je stimulována cykliny D ve spojení s CDK4 a CDK6. Následkem deregulace tohoto antionkogenu je nekontrolovatelná proliferace buněk. Jedním z rysů buněčné transformace a nádorové progresse je obvykle chromozomální a genetická alterace. Ploidie je počet homologních sad chromozomů v buňce. Její analýza je využívána ke specifikaci biologické povahy karcinomu, prognózy nemoci a při výběru vhodné terapie. Jedna z chromozomálních aberací je aneuploidie, tedy genomová mutace, kdy dochází k absenci či abundanci chromozomů v buňkách organismu a u mnoha malignit je spojena s méně příznivou prognózou. [9, 11, 12, 27]

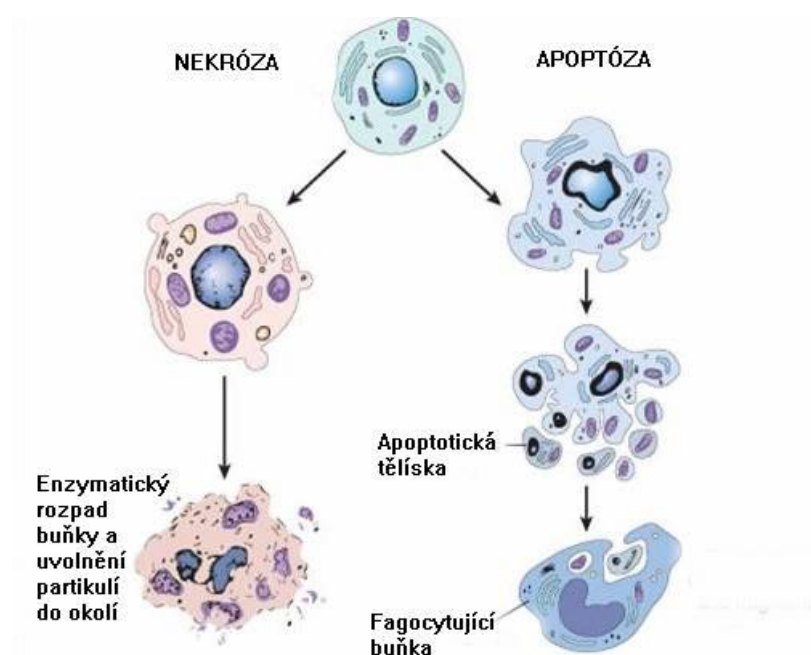
2.5. Buněčná smrt

Buněčná smrt je řada dějů vedoucí k zániku buňky. Obvykle rozlišujeme dva typy buněčného zániku, a to nekrózu a apoptózu.

Nekróza je intravitální nekontrolovatelný proces buněčné dezintegrace, vznikající v důsledku vnějších irevizibilních zásahů. Příčiny nekrózy mohou být různé, např. termický šok, hypoxie (= nedostatek kyslíku), mechanické poškození, virová infekce a jiné. K hlavním morfologickým změnám charakteristické pro nekrózu patří především vakuolizace, karyolýza, rozpad membránových organel a nakonec ztráta integrity buněčné membrány. Tento typ buněčné smrti vede k nekontrolovatelné buněčné lýze, a tím i k výrazné zánětlivé reakci.

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je považována za vysoce kontrolovaný mechanismus buněčné regulace. Programovaná buněčná smrt je nezbytná pro regulaci eliminace nefunkčních, přestárých, zmutovaných či jinak transformovaných buněk. Mezi morfologické změny řadíme celkovou kondenzaci buňky, vznik nepravidelných záhybů v membráně, fragmentace buňky na apoptotická tělíska a na rozdíl od nekrózy je integrita buněčné membrány zachována. Správná funkce apoptózy je důležitá také pro embryogenezi a udržování homeostázy v postnatálním období.

Můžeme rozlišit dva typy spouštěcích apoptotických drah. Receptorovou (vnější) dráhu, která stimuluje receptory smrti a aktivuje některé specifické proteiny. Mitochondriální (vnitřní) dráhu, ve které hraje centrální roli protein p53 a mitochondrie. Obě tyto dráhy jsou spouštěny aktivací cysteinových proteáz. Tyto cysteinové proteázy, neboli tzv. apikální kaspázy, jsou aktivovány štěpením prokaspáz. Vnější i vnitřní dráha je následně konvergována do jednoho mechanismu, který je spuštěn aktivací tzv. efektorových kaspáz. Poté dochází k nevratným změnám ve struktuře buňky a její programované přeměně na apoptotická tělíska, která jsou pohlcena fagocyty. Apoptóza, na rozdíl od nekrózy, nevyvolává zánětlivou reakci v okolí. ^[6] (Obr. 4)



Obr.4: Srovnání průběhu nekrózy a apoptózy ^[13] – nekrotický proces je zakončen enzymatickým poškozením buňky a jejím rozpadem. Obsah buňky se „vylije“ do okolí a vyvolává místní zánětlivou reakci. U apoptózy dochází ke smršťování buňky, kondenzaci jádra, fragmentaci DNA a nakonec se buňka rozpadne na apoptotická tělíska, která jsou následně pohlcena fagocyty. Není poškozená membrána, tudíž nedochází k zánětlivé reakci v okolí.

Deregulace apoptózy vede k určitým patologickým změnám a je průvodním znakem nádorového bujení. Můžeme ji rozdělit na předčasnou (excesivní) a oddálenou (inhibovanou). Příkladem excesivní apoptózy je syndrom získané imunodeficiency (AIDS), Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, insulin-dependentní diabetes mellitus či aplastická anémie. Inhibovaná apoptóza je

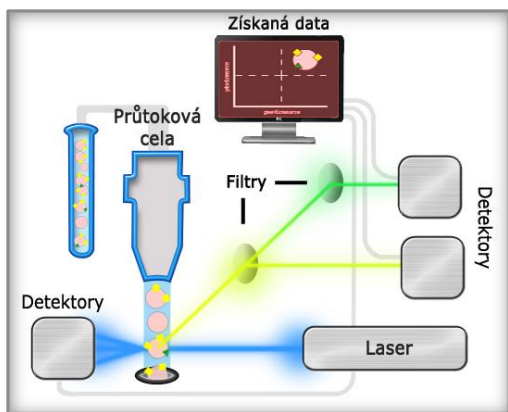
charakteristická pro maligní onemocnění a zde je typická hyperexprese anti-apoptotických faktorů nebo mutační změny genů proteinu p53. ^[13]

3. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (anglicky *flow cytometry*, FCM) je standardní optickou metodou pro analýzu buněk rychlostí až 2 000 - 10 000 částic za vteřinu. Uplatnění této metody je značně široké a to jak při stanovování jaderné DNA, analýze buněčného cyklu, určení ploidie, tak i při studiu genové exprese, detekci mikroorganismů či počítání a určení typu krevních buněk. Základním analyzovaným parametrem je zejména intenzita fluorescence, velikost částic a granularita. Koncentrace suspenze s analytem se pohybuje okolo $5 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^6$ mol/litr. ^[14,15,16]

3.1. Princip FCM

Princip cytometrických analýz je poměrně jednoduchý. Na buňky je před vlastním měřením navázáno fluorescenční barvivo, tzv. fluorochrom, který je ve většině případů konjugován s monoklonální protilátkou (mAb). Podmínkou je, aby se mAb vázala na povrchu či uvnitř antigenu specificky (nikoliv jiné organely) a kvantitativně (množství fluorochromu a DNA bylo úměrné). (Obr.5)

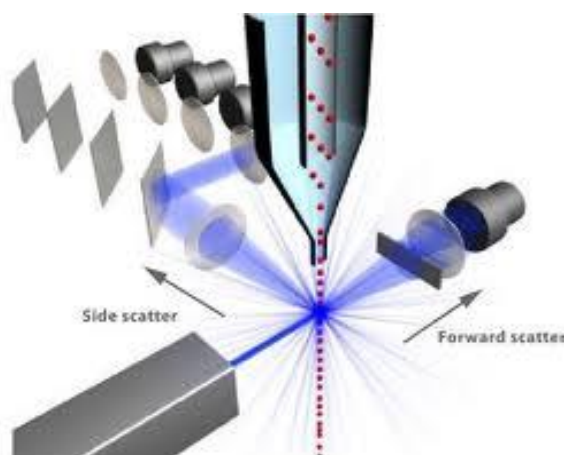


Obr.5: Obecné schéma průtokového cytometru ^[23] – mezi základní části každého cytometru patří průtoková komůrka, zdroj excitačního záření (laser), optická soustava, detektory a počítač.

Mezi běžně používané barviva patří například propidium iodid, který se váže na strukturu nukleových kyselin a které při ozáření vlnovou délkou 488nm fosforeskuje červeně. K přechodu elektronů fluorochromu na vyšší energetickou hladinu dojde,

ozáříme-li ho světlem o určité vlnové délce. Jelikož excitovaný stav je poměrně labilní, elektrony se vrací zpět na základní hladinu, za současného vyzáření nejen tepelné, ale především světelné energie – tento jev se nazývá fluorescence. ^[14,15,16]

Takto obarvená suspenze se vloží do průtokového cytometru, kde je vnášena do kapiláry s laminárně proudící nosnou kapalinou, přičemž je stabilní pozice a rychlost analyzovaných částic zajišťována tzv. hydrodynamickou fokusací. Zde analyt dosahuje rychlosti průtoku až 10-30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Tento proud suspenze protíná laserový paprsek. Ve chvíli, kdy paprsek protne procházející buňku, dochází k lomu (refrakci) a rozptylu světla, jenž lze podle směru a úhlu refrakce dělit na přímý rozptyl (Forward Scatter, FSC), který je úměrný velikosti buňky a boční rozptyl (Side Scatter, SSC), který je indikátorem vnitřního členění, granularity. (Obr.6) V případě, že jsou na analyzovaném vzorku přítomny fluorochromy, které byly excitovány laserovým paprskem, dochází k emisi záření, fluorescenci. Excitované světlo částic je sbíráno optickou sestavou a podle vlnové délky separováno na detektory. Ty převedou optický signál na elektrický impuls a ten je dále zpracován dvěma způsoby. Intenzivnější signály, tedy signály vygenerované forward scatterem, jsou zpracovány fotodiodou, naopak pro slabší signály side scatteru a fotony vyzářené fluorochromy se používají fotonásobiče. Optické signály dopadající na detektor jsou převedeny na elektrický impuls, který je úměrně zesílen na měřitelnou hodnotu a digitalizován. Informace, které charakterizují každou jednotlivou buňku řadou parametrů, jsou uchovávány v počítači v podobě histogramu. ^[14,15, 16]



Obr.6: *Laserový paprsek protínající proud buněčné suspenze ^[22] – v místě styku buněčné suspenze a paprsku jsou umístěny optické sestavy a detektory, které převádí optický signál na měřitelný elektrický impuls.*

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

4.1. Materiál a přístrojové vybavení

Pipety, špičky, eppendorfky, zkumavky „falkony“ (Techno Plastic Products), laboratorní sklo, bločky s tkáněmi, pinzeta, filtr, 6 jamkový panel (Techno Plastic Products?), vodní lázeň (Julabo TW2), centrifuga (Eppendorf), laminární box (Biohazard II), mikrodisektor (Arcturus), průtokový cytometr (BD FACSCalibur) (*Obr. 7*), vortex (Genie 2), Bürkerova komůrka (Meopta ČR), mikroskop světlý (Meopta ČR, zvětšení 45x), 96 jamkový panel, Petriho misky, kultivační láhve, inkubátor (Thermo scientific).



Obr.7: Průtokový cytometr BD FACS Calibur ^[24] – tento analyzátor disponuje modrým argonovým laserem o vlnové délce 488nm.

4.2. Chemikálie

Při práci v laboratoři byly použity chemikálie uvedené níže. (*Tab.1*)

Název	Dodavatel
Xylen	Lach-Ner
Ethanol	Lach-Ner
Pepsin	Sigma-Aldrich
Propidium iodid	Sigma-Aldrich
RNAasa	Sigma-Aldrich

Trypanová modř	Sigma-Aldrich
FBS	PAN-Biotech
RPMI-1640	Sigma-Aldrich
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Penicilin	Biotika
BSA	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Tween 100	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich

Tabulka 1: Přehled použitých chemikálií a jejich dodavatelů.

4.3. Příprava roztoků

- *100 mM zásobní roztok BrU*: 32,3 mg BrU, 1 ml RPMI media
- *1 litr 1x PBS*: 1 litr destilované vody, 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g K₂HPO₄, HCl na úpravu pH 7,4
- *1% glycin v PBS*: 1g glycinu, 99ml 1x PBS
- *Fixační roztok*: 99 ml 1xPBS, 1 ml 1% formaldehydu, 0,05% NP-40
- *Promývací roztok*: 100ml 1x PBS, 0,1g 0,1% BSA, 0,1% NP-40
- *Roztok primární protilátky* : 4μl Anti-BrdU (Exbio, clone MoBu-1), 1ml 1x PBS, 0,1% BSA, 0,1% NP-40
- *Roztok sekundární protilátky*: 4μl Anti-Mouse-IgG-FITC (Sigma), 1ml 1x PBS, 0,1% BSA, 0,1% NP-40
- *Pracovní roztok RNAasy*: 10mg RNAasy, 1ml 1x PBS, 0,1% BSA, 0,1% NP-40
- *Pracovní roztok propidium iodidu*: 50μg propidium iodidu, 1ml 1x PBS, 0,1% BSA, 0,1% NP-40
- *1 mM zásobní roztok BrdU*: 0,3071 mg BrdU, 1ml RPMI media
- *70% roztok ethanolu*: 70ml 99% ethanolu, 29ml deionizované vody
- *Roztok boraxu*: 3,82 g 0,1M- Na₂B₄O₇ · 10H₂O, doplnit do 100ml tkáňovou vodou, NaOH na úpravu pH na 8,5
- *Roztok PBS-T*: 100 mg 1x PBS, 0,5 ml 0,5% Tween 20, 0,1% BSA
- *Roztok PBS + 1% FBS*: 10ml FBS, do 1 litru 1x PBS
- *Roztok PBS + 0,25% Triton X-100*: 100ml 1x PBS, 250μl Triton X-100

- *Roztok primární protilátky II: Anti-phospho-Histone H3(Millipore), ředění 1:500 v PBS + 1% FBS*
- *Roztok sekundární protilátky II: Alexy Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen), ředění 1:500 v PBS + 1% FBS*
- *Roztok propidium iodidu a RNAasy: 0,5mg propidium iodidu v 1 ml PBS + 1% FBS, 0,5 mg RNAasy v 1 ml PBS + 1% FBS*
- *Kultivační medium: 500ml RMPI-1640, 100ml FBS, 250 µl zásobního roztoku penicilinu, 2,5 ml zásobního roztoku streptomycinu*
- *10x citrátový pufr: 5,68g Na₃C₆H₅O₇, 500 ml deionizované vody*
- *1x citrátový pufr: 10 ml 10x citrátového pufru, 90 ml deionizované vody*

5. Analýza ploidie nádorových tkání metodou průtokové cytometrie

5.1. Příprava buněk pro měření na průtokovém cytometru FACSCalibur

Jedním z mnoha způsobů uchování tkání je jejich zalití do parafinového bloku, které jsou k dispozici i po mnoha letech archivace. Z každého parafinového bločku s tkání byly připraveny řezy s majoritním podílem nádorové tkáně o síle 4 µm, které byly ve zkumavkách zpracovány následujícím způsobem:

- Řezy byly ve zkumavkách deparafinizovány 100% xylenem a následně po dobu 15 minut rehydratovány 5 ml ethanolu o klesající koncentraci (99,8%, 95%, 70% a 50%).
- Dvakrát se převrstvily deionizovanou vodou a nechaly se inkubovat na vodní lázni při 37°C po dobu 15 minut a 30 minut.
- Druhý den byl supernatant odstraněn od rehydratované tkáně a do každé zkumavky přidán 1 ml 0,5% roztok pepsinu, ve kterém se nechaly buňky inkubovat 30 minut za současného vortexování.
- Po inkubaci se buňky zcentrifugovaly při 800g na 7 minut.
- Po aspiraci supernatantu byly tkáně resuspendovány v 5 ml citrátového pufru s následnou centrifugací 800g/7minut.
- Do zkumavek bylo přidáno 600 µl pracovního roztoku propidium iodidu.
- Po 15-minutové inkubaci byly buněčné suspenze přefiltrovány do cytometrických zkumavek 12x75mm a bylo přidáno 500 µl pracovního roztoku RNAasy.

- Po inkubaci na vodní lázni se nechaly zkumavky hodinu chladit v lednici. V této fázi byly vzorky zcela připraveny pro vlastní analýzu na průtokovém cytometru.
- Nejprve byl analyzovaný samotný vzorek a poté s přídavkem 25 μ l vnitřního standardu. Jako standard byla užitá tkáň sleziny.

5.2. Softwarové vybavení

Pro analýzu buněk byl použit CellQuest, základní ovládací a analytický software průtokového cytometru. Pro analýzu buněčného cyklu a ploidie zase operační systém ModFit LT. Vyhodnocená data byla ukládána do programu ClarisWorks Office Pro Mac OS.

6. Testování vybraných cytostatik

6.1. Buněčné kultury

Pro testování vybraných cytostatik metodou průtokové cytometrie byly zvoleny nádorové buněčné linie CEM buňky odvozené od akutní lymfoblastické leukémie. Jako kultivační médium pro tuto buněčnou linii bylo použito médium RPMI-1640 se suplementy fetálního telecího séra (FBS), streptomycinu a penicilinu. Buněčné kultivace byly kontrolovány na světelném mikroskopu a zjišťována jejich viabilita. Jelikož se po určité době vyčerpaly živiny v médiu a znásobil se počet buněk, bylo třeba část kultivace odebrat do další kultivační láhve a doplnit novým kultivačním médiem. Tento postup označujeme jako pasáž a nové buněčné kultury se říká subkultura.

6.2. Princip MTT testu

MTT test je běžně užívaná laboratorní metoda sloužící ke stanovení rezistence nádorových buněk na cytostatika v in vitro podmínkách. Je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) mitochondriálními dehydrogenázami na modré nerozpustné krystaly formazanu. Vyhodnocování probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm a hodnota absorbance odpovídá viabilitě buněk. Hodnota IC_{50} je definována jako polovina maximální inhibiční koncentrace a je měřítkem účinnosti látky, přesněji řečeno, udává takovou koncentraci cytostatika, která je letální pro 50% nádorových buněk.

Kompletní testování celé skupiny cytostatik bylo prováděno na dvou typech buněčných liniích:

- nádorové – CEM (linie akutní lymfoblastické leukémie), CEM-DNR.BULK (linie akutní lymfoblastické leukémie rezistentní na daunorubicin), K562 (linie myleoidní leukémie) HCT116p53 wt (linie karcinomu kolorekta, divoký typ), HCT116p53 mut (linie karcinomu střev, delece genu p53), A549 (linie karcinomu plic)
- nenádorové - MRC-5 (linie normální plicní tkáně) a BJ (linie fibroblastu)

6.3. Testované deriváty

Jako testované látky byly použity deriváty salicylaldehydu syntetizované na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. (tab. 2). Salicylaldehyd je aldehyd odvozený od kyseliny salicylové, která se vyskytuje v kůře vrby bílé a která disponuje svými analgetickými a protizánětlivými účinky. Dodané deriváty byly podrobeny cytotoxickému MTT testu. Celá skupina látek obsahovala 106 derivátů. Pro naše testování byly vybrány ty, které vykazovaly dobrý terapeutický index (poměr dávky s léčivým účinkem k dávce způsobující otravu) a jejich hodnota IC_{50} byla nižší než 10 $\mu\text{mol/l}$. (Tab.2)

Název derivátu	Hodnota IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
A	5,272
B	0,592
C	4,333
D	0,283
E	3,563
F	9,087
G	3,816
H	7,334

Tabulka 2: Přehled testovaných derivátů a jejich hodnoty IC_{50} v $\mu\text{mol/l}$.

6.4. Příprava buněčných kultur k testování

Pro další práci s tkáňovými kulturami bylo nutné stanovit přesný počet buněk a jejich životnost. Pro toto stanovení se používá tzv. Bürkerova komůrka, na

kterou se aplikuje 10 μ l buněčné kultury s přídatkem 10 μ l trypanové modře, jež zajistí obarvení mrtvých buněk skrze porušenou integritu buněčné membrány.

- Buněčná kultura byla naředěna kultivačním médiem RPMI-1640 na požadovanou koncentraci 250 000 buněk na jamku.
- Do šestijamkového panelu bylo napipetováno 4ml suspenze a kultivováno 24 hodin v inkubátoru při 37°C a obsahu 5% CO₂ v atmosféře.
- Po 24 hodinách byly buněčné kultury naočkovány testovanými cytostatiky tak, aby pro každou testovanou látku v každé jamce koncentrace činila 1x IC50 [μ mol/l] a 5x IC50 [μ mol/l].
- Po další 24-hodinové kultivaci v inkubátoru byly buňky přepipetovány do zkumavek, 5 minut centrifugovány při 1400rpm a promyty 5 ml kultivačního média.
- Takto připravené buňky byly zafixovány 2 ml ledově vychlazeného 70% ethanolu a uchovány při teplotě -20°C do vlastní cytometrické analýzy.

6.5. Postup jednotlivých analytických metod

Analýza buněčného cyklu – propidium iodid

- Buňky, které se zafixovaly 70% ethanolem, byly centrifugovány při 800g po dobu 5 minut.
- Po odsátí supernatantu se postupně přidaly celkem 4 ml citrátového pufru 1x.
- Buňky s přídatkem citrátového pufru byly opět za stejných podmínek centrifugovány, byl odsán supernatant a k peletě přidáno 600 μ l pracovního roztoku propidium iodidu.
- Buněčná suspenze byla promíchána na vortexu.
- Po inkubaci v tmě při 37°C s propidium iodidem bylo přidáno 500 μ l pracovního roztoku RNAasy a zkumavky se nechaly opět inkubovat za stejných podmínek ve vodní lázni.
- Před vlastní analýzou se nechaly připravené buněčné suspenze 1 hodinu v lednici.

Poznámka: Ze stejné metody se vycházelo při analýze apoptózy.

Fosforylace histonu H3-P

- Buněčná suspenze byla stočena v malé falkoně a k ní přidány 4ml PBS, které po odstředěny byly odsány. K peletě byly přidány 2 ml vychlazeného 70% ethanolu a buňky se nechaly 1 hodinu inkubovat v ledu.
- Po přidání 1 ml promývacího roztoku byly zkumavky zcentrifugovány při 2000g a vzniklý supernatant odsán.
- Při mírném vortexování byl přidán 1ml chlazeného roztoku PBS s přísádkem Tritonu X-100. Zkumavky byly inkubovány 15 minut na ledu.
- K suspenzi bylo přidáno 5 ml promývacího roztoku, se kterým se zkumavky nechaly 5 minut centrifugovat při 2000g.
- Ze zkumavek byl odsán supernatant a k peletě bylo přidáno 100 μ l primární protilátky Anti-phospho-Histone, nechaly se alespoň 1 hodinu inkubovat.
- Po promytí a odsátí supernatantu bylo k peletě přidáno 100 μ l sekundární protilátky Alexy Fluor 488 goat anti-rabbit IgG.
- Buňky byly inkubovány 30 minut, promyty a odstředěny při 2000g na 5 minut. Bylo přidáno 700 μ l propidium iodidu a RNAasy a po 30-minutové inkubaci byly připravené pro analýzu.

Analýza syntézy RNA - 5-bromuracil (BrU)

- Buňky byly označeny 40 μ l 1mmol zásobního roztoku BrU a převedeny pomocí pipety do zkumavek a zcentrifugovaly se při 500g při teplotě 4°C.
- Byly přidány 3 ml promývacího roztoku 1xPBS, zcentrifugovaly se a odsál se supernatant.
- Na mírném vortexu byly přidány 2 ml 1% formaldehydu, zkumavky se míchaly 15 minut na míchadle a poté se 24 hodin inkubovaly v lednici.
- Malé množství se převedlo do falkonek a stočilo na 5 minut při 500g.
- Byl odsán supernatant a suspenze byla promyta 3 ml vychlazeného 1% glycinu v PBS a zcentrifugována. Proces byl opakován s 3 ml 1x PBS.

- Po odsání supernatantu bylo do zkumavek přidáno 100 μ l zředěné primární protilátky Anti-Brdu a nechaly se inkubovat 45 minut ve tmě.
- Po přidání 3 ml vychlazeného promývacího roztoku a centrifugaci byl odsán supernatant a do zkumavek přidáno 100 μ l zředěné sekundární protilátky Anti-Mouse-IgG-FITC.
- Buněčná suspenze se nechala opět inkubovat 30 minut ve tmě a poté byla promyta 3 ml vychlazeného promývacího roztoku a zcentrifugována.
- Po přidání 1 ml fixačního roztoku se zkumavky 15 minut míchaly na míchadle, 1 hodinu inkubovaly v lednici a následně stočeny při 500g na 5 minut.
- Byl odsán supernatant, buňky byly promyty promývacím roztokem a zcentrifugovány. Po odsátí tohoto roztoku bylo přidáno 100 μ l zásobního roztoku RNAázy a po inkubaci následně i 600 μ l zásobního roztoku propidium iodidu.
- Za 15 minut byly buňky připraveny k analýze.

Analýza syntézy DNA - 5-brom-2'-deoxyuridin (BrdU)

- Buňky byly označeny 40 μ l 10 μ mol zásobního roztoku BrdU a převedeny pomocí pipety do zkumavek a zcentrifugovaly se při 500g při teplotě 4°C.
- Byly přidány 3 ml fixačního roztoku 1xPBS, zcentrifugovaly se a odsál se supernatant.
- Na mírném vortexu byly po kapkách přidány 2 ml 70% ethanolu a inkubovaly se 24 hodin v lednici.
- 1 ml suspenze se převedlo do falkonek a stočilo na 5 minut při 500g.
- Byl odsán supernatant a k suspenzi byl po kapkách přidán roztok 2M HCl/Triton X-100 a nechala se zcentrifugovat.
- Následně byl odstraněn supernatant a přidány 2ml 0,1M boraxu. Proces byl opakován s 2 ml 1x PBS-T.
- Po odsátí supernatantu bylo do zkumavek přidáno 200 μ l zředěné primární protilátky Anti-Brdu a nechaly se inkubovat 45 minut ve tmě.
- Po přidání 2ml PBS-T a centrifugaci byl odsán supernatant a do zkumavek přidáno 200 μ l zředěné sekundární protilátky Anti-Mouse-IgG-FITC.
- Buněčná suspenze se nechala opět inkubovat 30 minut ve tmě a poté byly přidány 2 ml PBS-T a zcentrifugována.

- Po odsátí supernatantu bylo přidáno 100 μ l zásobního roztoku RNAázy a po inkubaci následně i 600 μ l zásobního roztoku propidium iodidu.
- Buněčná suspenze byla inkubována 15 minut a tím připravena k analýze.

7. Výsledky

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo:

1. Určení stupně ploidity nádorových buněk
 2. Hodnocení apoptotických účinků testovaných cytostatik
 3. Hodnocení vlivu testovaných derivátů na buněčný cyklus
 4. Hodnocení vlivu vybraných derivátů na fosforylaci fosfohistonu H3^{pSer10}
 5. Stanovení vlivu testovaných derivátů k na syntézu DNA pomocí inkorporace 5-brom-2'-deoxyuridinu (BrdU) a na syntézu RNA aplikací 5-bromuracilu (BrU)
-

Ploidie nádorových tkání:

Ploidie nádorových buněk může mít svůj význam při prognóze onemocnění. Je definována tzv. DNA indexem (DI), který charakterizuje změnu obsahu DNA G₀/G₁ fáze ve srovnání s normální diploidní buňkou.

- Diploidní: DI=1
- Aneuploidní: DI < 1 nebo DI > 1

Celkový počet vzorků byl 134, z toho bylo zpracováno 103. Vzorků, které vykazovaly diploidii bylo 54 a u kterých se projevila aneuploidie bylo 49. Nezpracované vzorky obsahovaly nedostatečné množství tkáně pro jejich analýzu. Z výsledků analýzy ploidity lze usoudit, že u poloviny analyzovaného materiálu byla zjištěna genomová mutace. Z toho můžeme usoudit, že u těchto případů neproběhla správně meióza, tudíž došlo ke ztrátě či nadbytku chromozomu. (*Příloha 1*)

Apoptóza:

Analýza apoptózy ukázala, že všechny testované deriváty v porovnání s kontrolou vykazovaly vyšší toxicitu a také zde byl zřejmý trend nárůstu toxicity korespondující se zvyšující se koncentrací testovaných látek. (*Tab.3*) Znatelně vyšší

toxická byla zaznamenána u derivátu E-5x IC₅₀ (Příloha 2) a dále především u derivát G v obou koncentracích.

Název derivátu:	Hodnota apoptózy:
Kontrola	5,43%
A-1x	8,80%
A-5x	11,81%
B-1x	8,18%
B-5x	10,02%
C-1x	6,37%
C-5x	9,13%
D-1x	4,73%
D-5x	7,58%
E-1x	10,38%
E-5x	44,66%
F-1x	6,49%
F-5x	9,57%
G-1x	23,07%
G-5x	42,24%
H-1x	6,25%
H-5x	9,70%

Tabulka 3: Hodnoty apoptózy v %.

Buněčný cyklus:

Všechny testované deriváty vykazovaly určitý vliv na regulaci jednotlivých fází buněčného cyklu. (Tab. 4)

Na G₀/G₁ fázi měl výrazně inhibiční účinek derivát G-5x a H-5x, zato opačný vliv byl zjištěn u látky E-5x. Průběh S fáze pozitivně ovlivňovaly téměř všechny látky, avšak deriváty H-5x a E-1x měly podstatně vyšší. U derivátu G-1x byl

pozorovatelný výrazný nárůst buněk v S fázi, zatímco u jeho vyšší koncentrace IC₅₀ dochází k bloku a tedy ke zvýšení akumulaci buněk v G₂/M fázi. (Příloha 3) Podobnou tendenci měl derivát B- 5x, který blokoval buňky v S fázi, kdežto v G₀/G₁ fázi byl u něj zjištěn účinek opačný.

Název derivátu:	G ₀ /G ₁ fáze	S fáze	G ₂ /M fáze
Kontrola	45,75%	38,94%	15,32%
A-1x	47,76%	39,55%	12,69%
A-5x	42,50%	44,33%	13,18%
B-1x	43,54%	41,21%	15,26%
B-5x	14,90%	76,70%	8,40%
C-1x	38,98%	49,18%	11,85%
C-5x	44,32%	46,04%	9,64%
D-1x	43,85%	40,20%	15,95%
D-5x	38,45%	49,06%	12,49%
E-1x	26,93%	57,73%	15,35%
E-5x	72,29%	25,58%	2,14%
F-1x	46,19%	39,93%	13,87%
F-5x	48,46%	39,45%	12,09%
G-1x	25,43%	65,20%	9,37%
G-5x	6,46%	25,22%	68,31%
H-1x	43,77%	42,69%	13,54%
H-5x	17,15%	73,33%	9,52%

Tabulka 4: Přehled hodnot procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Fosforylace histonu H3p^{Ser10}:

Při hodnocení změn fosforylace histonu H3p^{Ser10} vykazoval největší inhibiční účinek derivát E v obou koncentracích a také B-5x. Zajímavostí byl vliv derivátu G, u kterého byla v nižší koncentraci snížena fosforylace histonu až o 75%, naopak v koncentraci 5x byla jeho fosforylace extrémně vysoká, a to až 16x vyšší oproti kontrole. (Příloha 4) Zde bylo zaznamenáno, že hodnoty derivátů s koncentrací 1x byly poměrně neměnné, zatímco hodnoty koncentrace 5x byly, s výjimkou extrémního G-5x, vždy výrazně nižší. (Tab. 5)

Název derivátu:	Hodnota H3 ^{pSer10} :
Kontrola	1,66%
A-1x	1,25%
A-5x	1,61%
B-1x	1,53%
B-5x	0,57%
C-1x	1,54%
C-5x	1,09%
D-1x	1,54%
D-5x	1,08%
E-1x	0,22%
E-5x	0,04%
F-1x	1,58%
F-5x	1,26%
G-1x	0,41%
G-5x	26,23%
H-1x	1,64%
H-5x	1,15%

Tabulka 5: Souhrn hodnot procentuálního zastoupení fosforylace histonu H3p^{Ser10}.

BrU:

Téměř všechny látky pozitivně stimulovaly syntézu RNA. (Tab. 6) Vyšší hodnoty byly zjištěny u derivátu B-5x a H-5x. Největší pozitivní účinek měl derivát E-1x, který vykazoval až 2x větší hodnotu než měla kontrola. (Příloha 5) Podobné výsledky byly zaregistrovány u derivátu G v obou koncentracích. Pouze jedna látka E-5x z testovaných derivátů měla mírný inhibiční vliv.

Název derivátu:	Hodnota BrU:
Kontrola	41,53%
A-1x	49,84%
A-5x	48,54%
B-1x	48,40%
B-5x	74,30%
C-1x	58,07%
C-5x	58,90%
D-1x	54,06%
D-5x	59,87%
E-1x	86,62%
E-5x	36,21%
F-1x	46,57%
F-5x	58,00%
G-1x	71,77%
G-5x	80,19%
H-1x	51,85%
H-5x	65,49%

Tabulka 5: Souhrn hodnot procentuálního zastoupení buněk při syntéze RNA.

BrdU:

Z vyšší hodnoty derivátu B-5x a D-5x lze usoudit, že tyto látky podporovaly tvorbu DNA. Derivát G-5x měl na syntézu negativní vliv, naopak jeho snížená koncentrace IC₅₀ prokázala opačný účinek. (Tab.7) Jiným případem byl derivát E, jehož obě

koncentrace měly na syntézu inhibiční efekt, vyšší koncentrace IC₅₀ této látky dokonce až o 68%. (Příloha 6)

Název derivátu:	Hodnota BrdU:
Kontrola	49,78%
A-1x	46,89%
A-5x	52,47%
B-1x	55,32%
B-5x	72,47%
C-1x	64,81%
C-5x	50,95%
D-1x	46,94%
D-5x	65,26%
E-1x	43,88%
E-5x	15,91%
F-1x	53,84%
F-5x	43,24%
G-1x	61,28%
G-5x	32,99%
H-1x	59,74%
H-5x	46,46%

Tabulka 6: Souhrn hodnot procentuálního zastoupení buněk při syntéze DNA.

Závěr a diskuze

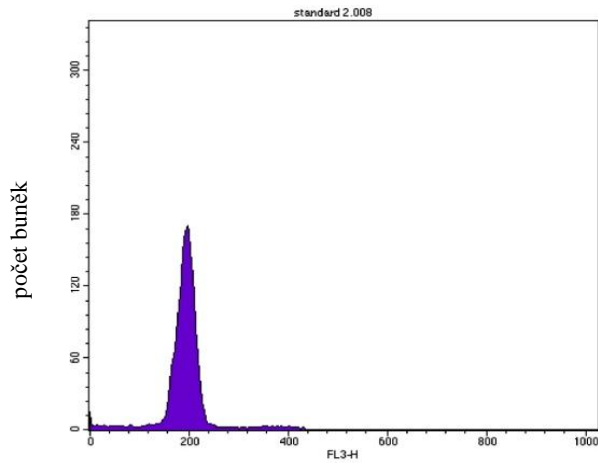
Tato bakalářská práce je zaměřena jak na využití analýzy buněčného cyklu a ploidie v klinické diagnostice, tak i na testování nových derivátů s potenciálním protirakovinovým účinkem. K tomuto účelu byla zvolena cytometrická analýza, která se osvědčila jako vhodná metoda pro toto stanovení.

První část teoretické části shrnuje poznatky o karcinomu endometria, jeho incidenci, diagnostice a terapii. V druhé části věnuji pozornost popisu buněčného cyklu, jeho regulaci a nedílnou součástí je také pojednání o buněčné smrti a jejím defektům. Dále popisuji princip metody průtokové cytometrie a její využití v medicíně. Experimentální část práce je zaměřena na analýzu ploidie nádorových buněk karcinomu endometria, kde 49 vzorků, tedy téměř polovina analyzovaného materiálu, vykazovala aberaci v počtu chromozomových sad. Poznatky z této analýzy lze využít při další prognóze a diagnostice nádorového onemocnění. Dále se zabývám testováním derivátů salicylaldehydu, které byly syntetizovány na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. Všechny testované deriváty byly velmi účinné, avšak pro cytometrickou analýzu byly vybrány pouze ty, které vykazovaly nejlepší terapeutický index a současně jejichž hodnota IC_{50} se pohybovala v hodnotách do 10 $\mu\text{l/l}$. U některých derivátů byl zjištěný vysoký toxický účinek, a to až 8x vyšší, než byla hodnota kontroly. Při analýze fosforylace histonu $H3p^{Ser10}$ se jeden z testovaných derivátů jevil jako extrémně aktivní. Hodnota aktivity fosforylace histonu oproti kontrole byla až 16x vyšší. Zkoumání vlivu na syntézu nukleových kyselin poukázalo až na dvakrát větší účinek na syntézu RNA, zato žádný výrazný inhibiční vliv nebyl patrný. Naopak u analýzy syntézy DNA byly zjištěny jak zřejmé stimulační vlivy, tak zde byly zaznamenány látky, které působily inhibičně. U analýzy buněčného cyklu po naočkování testovanými látkami byla pozorována akumulace buněk v G_2/M fázi. Tento vliv napovídá, že by se mohlo jednat o látku, která je považována za tzv. mitotický jed, podobně jako vinkristin nebo kolchicin. Výsledky testování těchto derivátů jsem prezentovala v sekci výsledky. Celá skupina testovaných látek se jeví svým vlivem na regulaci buněčného cyklu jako velmi zajímavá a perspektivní pro další podrobnější testování.

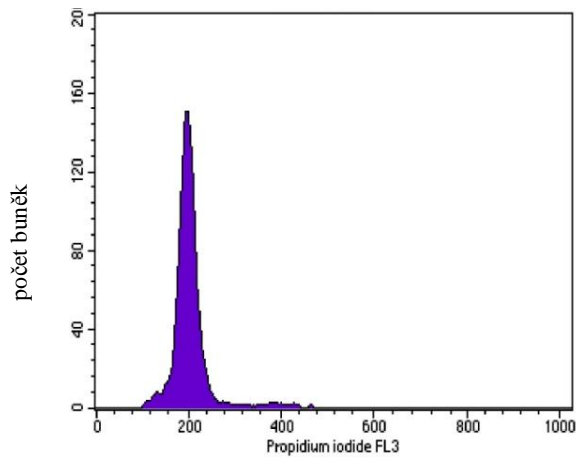
Zadané cíle této bakalářské práce byly úspěšně splněny.

Přílohy

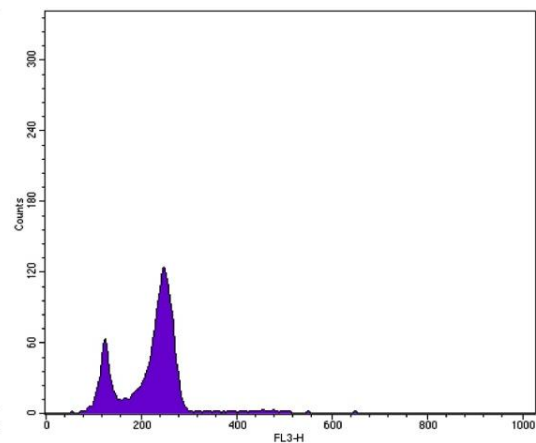
Standard (zdravá slezina)



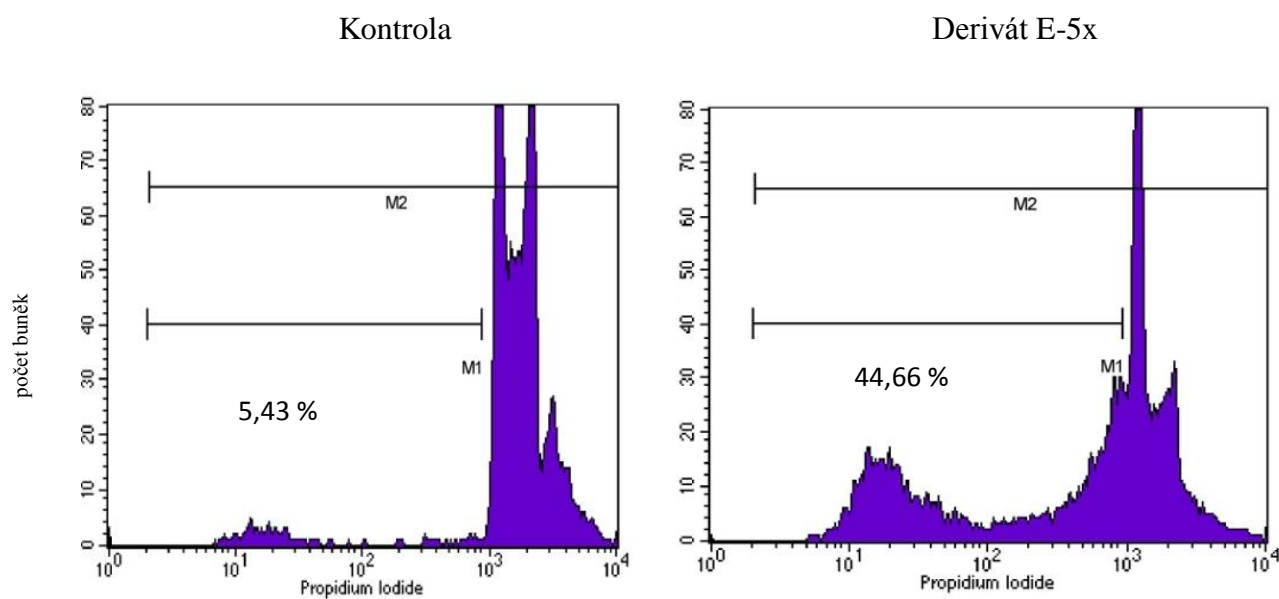
Tkáň karcinomu endometria



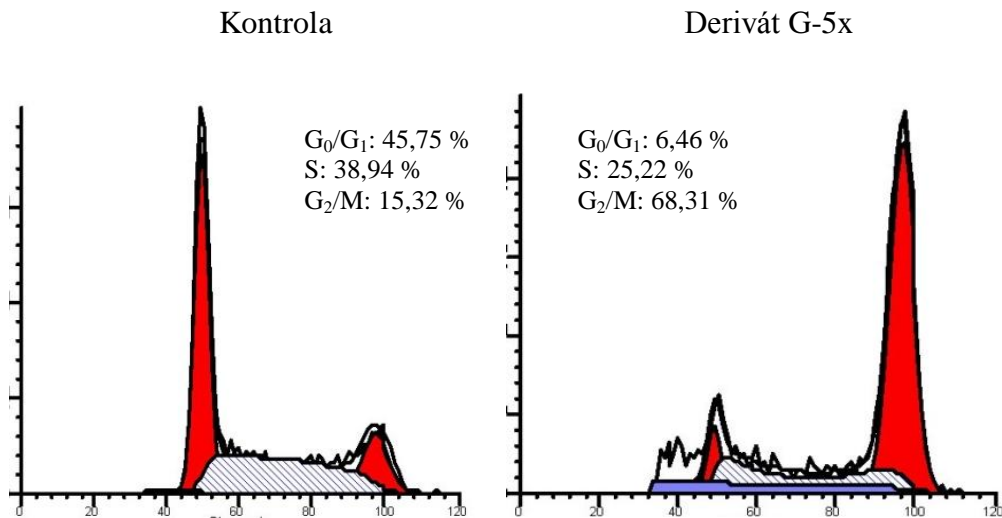
Tkáň karcinomu endometria se standardem



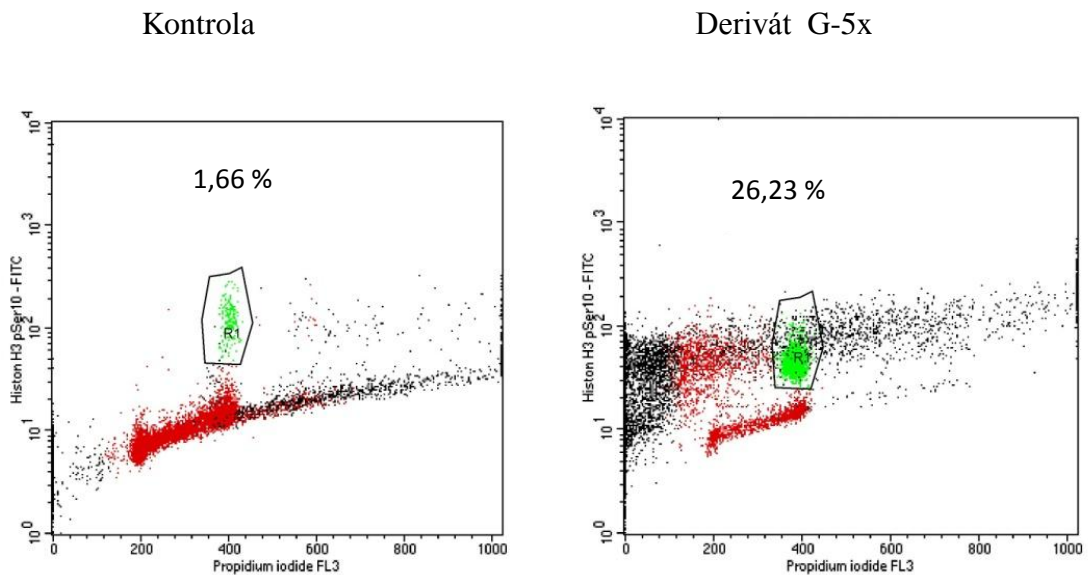
Příloha 1: Ploidie – na ose x je vneseno množství interkalovaného propidium iodidu a na ose y je znázorněn počet buněk. Pík standardu je stanoven na hodnotu intenzity 200, z čehož lze pozorovat změna v ploidiu u histogramu tkáně karcinomu a tkáně karcinomu s přidaným standardem.



Příloha 2: Apoptóza - srovnání histogramu kontroly, která měla hodnotu apoptózy buněk 5,43% a derivátu E o koncentraci 5x IC₅₀ s 44,66% . Na ose x je vneseno množství interkalovaného propidium iodidu a na ose y je znázorněn počet buněk.

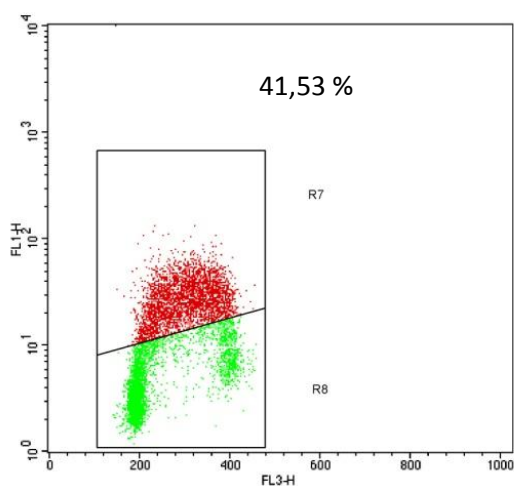


Příloha 3: Buněčný cyklus - srovnání histogramu kontroly a derivátu G-5x a jejich rozdíly v distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu – například derivát G o koncentraci 5x IC_{50} vykazuje ve srovnání s kontrolou inhibiční účinek na G_0/G_1 a S fázi, zato ve fázi G_2/M je patrná akumulace buněk.

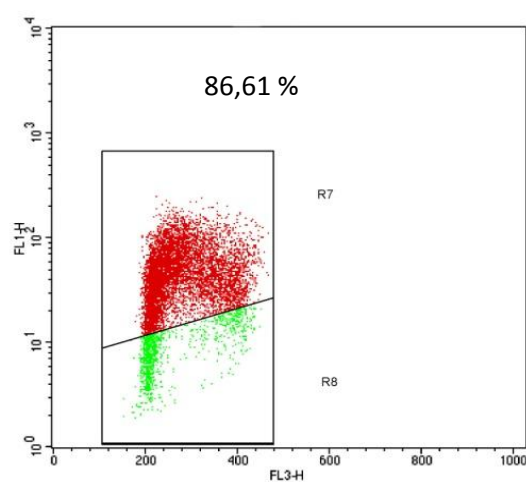


Příloha 4: Fosforylace histonu $H3p^{Ser10}$ - srovnání kontroly, jejíž hodnota fosforylace byla 1,66% a hodnoty derivátu G-5x, u nějž byla zaznamenána mnohokrát vyšší aktivita. Na ose x je vneseno množství propidium iodidu a na ose y fluorescein isokyanátu.

Kontrola

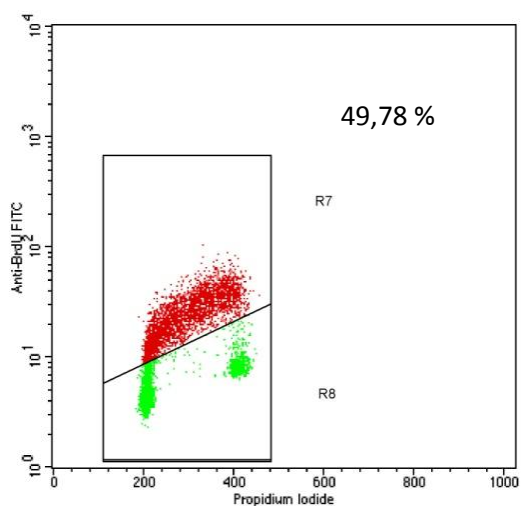


Derivát E-1x

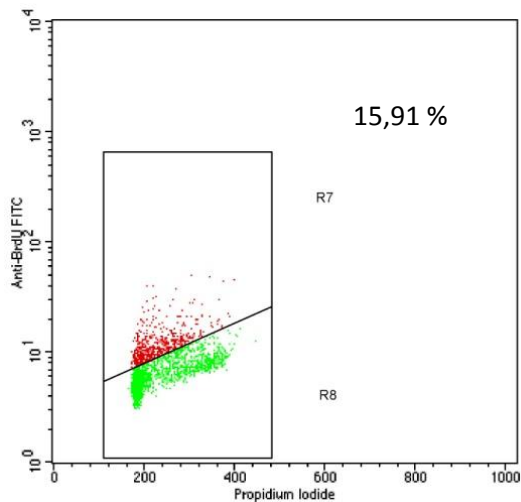


Příloha 5: BrU – srovnání kontroly a derivátu E-1x, u nějž byla aktivita syntézy 2x větší než u zmiňovaného kontrolního vzorku a lze zde pozorovat i markantní kumulaci buněk v rané S fázi.

Kontrola



Derivát E-5x



Příloha 6: BrdU – srovnání hodnot procentuálního zastoupení buněk kontroly a buněk při syntéze DNA. U derivátu E-5x lze pozorovat výrazně nižší aktivitu syntézy RNA, a to o téměř 35%.

Seznam literatury

- [1] Cibula, D., *Onkogynekologie*, 1. vyd., Praha, Grada, **2009**, s.457-496
- [2] Roztočil, A., *Moderní gynekologie*. 1. vyd., Praha, Grada, **2011**, s.343-347
- [3] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., *Molecular Cell Biology: Overview of the Cell Cycle and Its Control*, New York, W. H. Freeman, **2000**, sek. 13.1
- [4] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Základy buněčné biologie.*, 2. vyd., Ústí nad Labem, Espero Publishing s.r.o., **2001**, kap.17-18
- [5] Hampl, F., Rádl, S., Paleček J., *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd., Praha, Vydavatelství VŠCHT, **2007**, s. 379-394
- [6] Klener, P., *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vyd., Praha, Grada, **2010**, s. 13-62
- [7] Nečas, O., *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., Jinočany, H & H, **2000**, s.265-285
- [8] Karp, G., *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, 6. vyd., Hoboken, John Wiley and Sons, **2009**, kap.14
- [9] Becker, H., *Chirurgická onkologie*, 1.vyd., Praha, Grada, **2005**, s.3-10
- [10] Sládek, Z., *Buněčná biologie*, 1.vyd., Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, **2007**, s.85
- [11] Masopust, J. (a spol.), *Patobiochemie buňky*, 1. vyd., Univerzita Karlova - 2. lék. fakulta, Praha, **2003**, s.260-272
- [12] Palmirotta, R., Savonarola, A., Ludovici, G., Marchis, M.L., Covello, R., Ettore, G.M., Ialongo, C., Guadagni, F., *Concurrent mutation in exons 1 and 2 of the K-ras oncogene in colorectal cancer*, *Folia Histochem Cytobiol*, **2011**, 49 (4): s.729-733
- [13] Dvorská, M., Driák, D., Švandová, I., *Časopis Gynekolog: Apoptóza v gynekologii a porodnictví*, **2008**, 4: s.132-140
- [14] Suda, J., *Časopis Živa: Co se skrývá za rostlinou průtokovou cytometrií?* **2005**, 1:s.46

- [15] Hawley, S. T., Hawley, G. R. , *Flow Cytometry protocols*, 2. vyd., Totowa, Humana Press, **2004**, s.1-32
- [16] Bartůňková, J., *Vyšetřovací metody v imunologii*, 1. vyd., Praha, Grada, **2005**, s.60-67
- [17] Svod Analýza, *Incidence a mortalita těla děložního* [online] [cit.2012-03-02]. Dostupné na URL: <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>
- [18] Svod Analýza, *Incidence onemocnění podle věkových skupin žen*[online] [cit.2012-03-02]. Dostupné na URL: <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=vek#>
- [19] Svod Analýza, *Průměrné zastoupení klinických stadií karcinomu endometria v letech 1977 až 2009* [online] [cit.2012-03-02] Dostupné na URL: <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=stadia#>
- [20] Střední zdravotnická škola Karviná, *Buněčný cyklus* [online] [cit 2012-07-19] Dostupné na URL: <http://sszdra-karvina.cz/bunka/bi/07bcy/obr/cyklus1.gif>
- [21] Wikipedie, *Cyklin* [online] [cit 2012-07-19] Dostupné na URL: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/68/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%BD_cyklus_CDK.svg
- [22] Flow cytometry-Basic principles [online] [cit 2012-04-03] Dostupné na URL: http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=852
- [23] Laboratoř HIV/AIDS a infekční imunologie [online] [cit 2012-04-03] Dostupné na URL: <http://www.labaidis.cz/cz/vmenu/cytometrie.aspx>
- [24] Biosciences: BD FACSCalibur flow cytometer [online] [cit 2012-04-03] Dostupné na URL: <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/index.jsp>
- [25] Amant, F., Moerman, P., Neven, P., Timmerman, D., Van Limbergen, E., Vergote, I., *Endometrial cancer*, *Lancet*, **2005**; 366:s.491–505
- [26] Řekli mi: Máte rakovinu! [online] [cit. 2012-07-18] Dostupné na URL: http://img.ahaonline.cz/static/old_aha/big/10_01_17/clipboard02.jpg
- [27] Knudsen, K.E., Knudsen, E.S., *Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response*, *Nature Reviews Cancer*, **2008**, 8: s.714-724
- [28] Sherr, C.J., Roberts, J.M., *Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases*, *Genes & Development*, **1995**, 9: s.1149–1163