

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Michael Sniehotta

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenční
mikroskopie**

Bakalářská práce

Michael Sniehotta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Alžběta Srovnalová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michael SNIEHOTTA**
Osobní číslo: **R20723**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenční mikroskopie**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma protinádorová léčiva a jejich účinek na buněčné úrovni. 2. Práce v laboratoři tkáňových kultur za sterilních podmínek. 3. Studium metod založených na analýze buněčného cyklu. 4. Základy zpracování dat. 5. Určení IC50 protinádorových léčiv pomocí MTS metody.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Yano S, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM. FUCCI Real-Time Cell-Cycle Imaging as a Guide for Designing Improved Cancer Therapy: A Review of Innovative Strategies to Target Quiescent Chemo-Resistant Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2655. Published 2020 Sep 17. doi:10.3390/cancers12092655
2. Yano S, Hoffman RM. Real-Time Determination of the Cell-Cycle Position of Individual Cells within Live Tumors Using FUCCI Cell-Cycle Imaging. *Cells*. 2018;7(10):168. Published 2018 Oct 14. doi:10.3390/cells7100168
3. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*. 2008;132(3):487-498. doi:10.1016/j.cell.2007.12.033
4. Zielke N, Edgar BA. FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(5):469-487. doi:10.1002/wdev.189
5. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003;36(3):131-149. doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x
6. Dembic Z. Antitumor Drugs and Their Targets. *Molecules*. 2020;25(23):5776. Published 2020 Dec 7. doi:10.3390/molecules25235776
7. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9):3233. Published 2020 May 2. doi:10.3390/ijms21093233

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Alžběta Srovnalová, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 28. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 20. prosince 2022

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Michael Sniehotta
Název práce	Analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenční mikroskopie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Alžběta Srovnalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Klíčová slova	buněčný cyklus, cytostatika, fluorescenční mikroskopie, nádorová onemocnění, FUCCI systém, obrazová analýza, cytotoxicita, morfologie jádra
Počet stran	78
Počet příloh	6
Jazyk	Český

Souhrn

Bakalářská práce se zaměřuje na využití obrazové analýzy a FUCCI systému ke studiu změn v dynamice buněčného cyklu a morfologii jádra u buněčné linie U2OS.

Teoretická část práce je zaměřena na problematiku nádorových onemocnění, jejich genetickou podstatu, nádorové hereditární syndromy, buněčný cyklus, účinek protinádorových léčiv na buněčné úrovni, vznik lékové rezistence, systém FUCCI a metody studia buněčného cyklu.

Výsledky ukázaly, že v G1 fázi nejúčinněji blokují buňky cytostatika palbociclib a taxol, v ranné S fázi irinotekan a v pozdní S/G2/M fázi gemcitabin a doxorubicin s vinkristinem. Nejvýraznější změny morfologie jádra byly detekovány po ošetření taxolem jakožto důsledek tvorby multinukleárních buněk. V případě daunorubicinu, irinotekanu, bortezomibu a doxorubicinu s vinkristinem byly změny morfologie jádra způsobeny indukcí apoptózy. Z důvodu silné autofluorescence daunorubicinu a doxorubicinu a schopnosti bortezomibu inhibovat proteozomální degradaci FUCCI fluorescenčních prób nebylo možné stanovit vliv těchto cytostatik na dynamiku buněčného cyklu.

Bibliographic identification

Author's first name and surname	Michael Sniehotta
Title	Cell cycle analysis using fluorescence microscopy
Type of thesis	Bachelor thesis
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Alžběta Srovnalová, Ph.D.
The year of presentation	2023
Keywords	Cell cycle, cytostatic drugs, fluorescence microscopy, cancer, FUCCI system, image analysis, cytotoxicity, nucleus morphology
Number of pages	78
Number of appendices	6
Language	Czech

Abstract

The bachelor's thesis focuses on the use of image analysis and the FUCCI system to study changes in cell cycle dynamics and nuclear morphology in the U2OS cell line.

The theoretical part of the work is focused on the issue of cancer diseases, their genetic nature, hereditary cancer syndromes, cell cycle, the effects of anticancer drugs at the cellular level, emergence of drug resistance, the FUCCI system and cell cycle analysis methods.

The results showed that palbociclib and taxol are the most effective cytostatics at arresting cells in G1 phase, irinotecan in the early S phase, and gemcitabine and doxorubicin with vincristine in the late S/G2/M phase. The most pronounced changes in the morphology of the nucleus were detected after treatment with taxol, as a result of the formation of multinucleated cells. In the case of daunorubicin, irinotecan, bortezomib and doxorubicin with vincristine, changes in nuclear morphology were caused by induction of apoptosis. Due to the strong autofluorescence of daunorubicin and doxorubicin and the ability of bortezomib to inhibit the proteasomal degradation of FUCCI fluorescent probes, it was not possible to determine the effects of these cytostatics on cell cycle dynamics.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Alžběty Srovnalové, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouc dne:

Podpis:

Poděkování:

Rád bych poděkoval Mgr. Alžbětě Srovnalové, Ph.D. za vedení bakalářské práce, cenné rady a čas, který mi věnovala. Poděkování také patří zaměstnancům Laboratoře experimentální medicíny na Ústavu molekulární a translační medicíny za pomoc při práci v laboratoři tkáňových kultur.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Nádorová onemocnění	3
3.2	Geny stojící za rozvojem nádorových onemocnění.....	3
3.2.1	Protoonkogeny	4
3.2.2	Nádorové supresorové geny	6
3.3	Dědičná predispozice rakoviny	8
3.4	Buněčný cyklus.....	10
3.4.1	Cykliny a cyklin dependentní kinázy	11
3.4.2	Kontrolní body buněčného cyklu	13
3.4.3	Buněčný cyklus v nádorových buňkách.....	15
3.5	Chemoterapie.....	16
3.5.1	Alkylační činidla	18
3.5.2	Inhibitory mikrotubulů	18
3.5.3	Antimetabolity.....	19
3.5.4	Inhibitory topoizomeráz	20
3.5.5	Cytostatika se specifickým účinkem	21
3.6	Léková rezistence	22
3.6.1	Mutace genu TP53	22
3.6.2	P-glykoprotein.....	23
3.6.3	Mutace chimérického genu BCR-ABL	24
3.6.4	Mutace genů kódujících topoizomerázy.....	24
3.7	Metody studia buněčného cyklu	25
3.7.1	FUCCI systém	25
3.7.2	Fluorescenční mikroskopie	27

3.7.3	Průtoková cytometrie	29
4	MATERIÁL A METODY	31
4.1	Biologický materiál	31
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	31
4.3	Použité přístroje	34
4.4	Kultivace buněčných linií	34
4.5	Příprava kultivačního média	34
4.6	Pasážování buněčných linií	35
4.7	Počítání buněk	35
4.8	Stanovení cytotoxicity MTS testem	35
4.8.1	Příprava testovaných cytostatik	35
4.8.2	Příprava buněčné linie U2OS pro MTS test	36
4.8.3	Příprava zásobních destiček	36
4.8.4	Příprava pracovní destičky	36
4.8.5	MTS test a jeho vyhodnocení	37
4.9	Obrazová analýza – fluorescenční mikroskopie	37
4.9.1	Příprava buněčné linie U2OS-FUCCI	37
4.9.2	Ošetření buněk	38
4.9.3	Fluorescenční mikroskopie	38
5	VÝSLEDKY	40
5.1	MTS test	40
5.2	Obrazová analýza	40
5.2.1	Změna počtu buněk	41
5.2.2	Změna procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu 44	
5.2.3	Změna velikosti buněčného jádra	48
5.2.4	Změna tvaru buněčného jádra	52

5.2.5	Změna intenzity fluorescence.....	59
6	DISKUSE.....	63
7	ZÁVĚR	66
8	LITERATURA	67
9	PŘÍLOHY	78
9.1	Seznam příloh.....	78

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

5-FU	5-fluoruracil
ABC	ATP-binding cassette
AG	Azami Green
APC/C	anaphase-promoting complex
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATP	adenosin trifosfát
ATR	ATM and RAD3-Related
Bub	budding uninhibited by benzimidazoles
CAK	CDK-activating kinase
CDK	cyklin-dependentní kináza
Cdt1	chromatin licensing and DNA replication factor 1
CKI	cylin-dependent kinase inhibitors
CML	Chronická myeloidní leukémie
<i>c-Myc</i>	protoonkogen pojmenován dle „Cellular myelocytomatosis oncogene“
CNV	copy number variation
CPG	cytosine-phosphate-guanine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DHFT	dihydrofolátreduktáza
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dTMP	deoxythymidin monofosfát
FdUMP	5-fluoro-deoxy-uridin monofosfát
FUCCI	fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator
FUMP	fluorouridinmonofosfát
GAPs	GTPase-activating protein
GDP	guanosin difosfát
GEFs	guanine nucleotide exchange factors
GFP	green fluorescent protein
GTP	guanosin trifosfát
hCdt1	human chromatin licensing and DNA replication factor 1

HIV	human immunodeficiency virus
HPV	humanpapiloma virus
HRAS	protoonkogen pojmenován dle „Harvey Rat sarcoma virus“
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
IC50	half maximal inhibitory concentration
KO	Kushabira Orange
KRAS	protoonkogen pojmenován dle „Kirsten rat sarcoma virus“
MCM	the minichromosome maintenance protein complex
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MDM4	transformed mouse 3T3 cell double minute 4
MDR	multidrug resistance
Mdr1	multidrug resistance gene 1
MNAT1	CDK-activating kinase assembly factor MAT1
MPF	M phase-promoting factor
MTS	(3-[4,5,dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium
NAD+	nikotinamidadenindinukleotid
NF-κB	nuclear factor kappa B
NIC	průměrná hodnota indexu kulatosti jádra (z anglického <i>nucleus circularity index</i>)
NRAS	protoonkogen pojmenován dle „neuroblastoma RAS viral oncogene homolog“
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PBS	fosfátový pufr
Pgp	P-glycoprotein
PKMYT1	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1
PMS	phenazine methyl sulfate
pRb	retinoblastoma protein
Ras	protoonkogen pojmenován dle „rat sarcoma“
RBI	retinoblastoma gene
Rpm	revolutions per minute
SLBP	stem-loop binding proteinem (SLBP)
WEE1	mitosis inhibitor protein kinase Wee1

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Mutace protoonkogenů a nádorových supresorových genů vedoucí k nádorové transformaci buněk.....	4
Obr. 2: Regulace aktivity malých GTPáz prostřednictvím GAPs a GEFs.....	5
Obr. 3: Schématické znázornění Knudsonovy teorie dvou zásahů.....	7
Obr. 4: Schéma tumor supresorové aktivity proteinu p53.....	8
Obr. 5: Jednotlivé fáze buněčného cyklu s vyznačenými regulačními komplexy cyklin-CDK.....	11
Obr. 6: Hladina jednotlivých tříd cyklinů v průběhu buněčného cyklu.....	12
Obr. 7: Kontrolní body buněčného cyklu a jejich významné regulátory.....	14
Obr. 8: Schéma Cell-cycle decoy, trap and kill terapie.....	17
Obr. 9: Schématické znázornění procesu polymerizace a depolymerizace mikrotubulů.....	19
Obr. 10: Struktura 26S proteazomu.....	21
Obr. 11: Mutantní forma p53 vazbou na wild-type p53 inhibuje jeho tumor supresorovou funkci, následkem čehož dochází k onkogenezi.....	23
Obr. 12: Struktura P-glykoproteinu.....	24
Obr. 13: Reciproká oscilace hladiny Cdt1 a gemininu.....	25
Obr. 14: Akumulace FUCCI fluorescenčních prób v buněčném jádře.....	26
Obr. 15: Jablonského diagram se znázorněným principem vzniku zářivých a nezářivých přechodů.....	28
Obr. 16: Histogram distribuce obsahu DNA jader <i>Vicia faba</i> L. izolovaných z kořenové čepičky.....	30
Obr. 17: Parametry třídění buněk do jednotlivých fází buněčného cyklu pomocí softwaru Columbus.....	39
Obr. 18: Autofluorescence daunorubicinu a doxorubicinu a nejvýraznější změny procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.....	47
Obr. 19: Nejvýraznější změny průměrné velikosti buněčného jádra.....	51
Obr. 20: Nejvýraznější změny tvaru buněčného jádra.....	55
Obr. 21: Roztoky cytostatik zásadně zvyšující variační koeficient indexu kulatosti buněčného jádra.....	58
Obr. 22: Fázově nespécifická akumulace FUCCI fluorescenčních prób projevující se intenzivní fluorescencí po ošetření bortezomibem ($49,75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	62

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Vybrané příklady hereditárních nádorových syndromů a odpovídajících nádorových onemocnění se zvýšeným rizikem rozvoje.....	10
Tab. 2: Vybrané příklady fázově specifických a nespecifických cytostatik s uvedenými fázemi, ve kterých vykazují nejvyšší účinnost.....	17
Tab. 3: Použité chemikálie	31
Tab. 4: Použité roztoky a jejich příprava.....	32
Tab. 5: Hodnoty IC50 testovaných cytostatik.	40
Tab. 6: Změny procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.....	45
Tab. 7: Změny průměrné velikosti buněčného jádra.	49
Tab. 8: Změny průměrné hodnoty indexu kulatosti buněčného jádra.	53
Tab. 9: Zásadní změny variačního koeficientu (CV) indexu kulatosti jádra.	57

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Změny počtu buněk ve srovnání s kontrolou.....	42
Graf 2: Změny počtu buněk ve srovnání s kontrolou.....	43
Graf 3: Roztoky cytostatik nejúčinněji blokující buňky v G1 fázi (A), pozdní S/G2/M fázi (B) a ranné S fázi (C) ve srovnání s kontrolou.	46
Graf 4: Roztoky cytostatik indukující nejvýraznější pokles (A) a nárůst (B) průměrné velikosti buněčného jádra ve srovnání s kontrolou.	50
Graf 5: Roztoky cytostatik indukující nejvýraznější pokles (A) a nárůst (B) průměrné hodnoty indexu kulatosti jádra ve srovnání s kontrolou.	54
Graf 6: Nejvýraznější změny CV indexu kulatosti jádra ve srovnání s kontrolou.....	56
Graf 7: Změny průměrných intenzit fluorescencí.	60
Graf 8: Změny průměrných intenzit fluorescencí.	61

1 ÚVOD

Přestože došlo v několika posledních dekáдах k obrovskému pokroku na poli terapie nádorových onemocnění, jedná se stále o druhou nejčastější příčinu úmrtí, která si ročně vyžádá milióny lidských životů. Neustále rostoucí incidence nádorových onemocnění, způsobená především špatným životním stylem a prudce stárnoucí populací, v kombinaci s častým rozvojem mnohočetné lékové rezistence vůči velké části komerčně využívaných cytostatik představuje jeden z nejzávažnějších zdravotnických problémů moderní civilizace. Právě z tohoto důvodu je hledání nových postupů terapie této skupiny chorob zcela zásadní.

Jedním z těchto postupů je kombinace obrazové analýzy a systému FUCCI, který umožňuje vizualizaci a identifikaci jednotlivých fází buněčného cyklu v reálném čase. Metodiku FUCCI lze využít ke studiu morfologie buněčného jádra či k odlišení klidových maligních buněk, které jsou vůči konvenční chemoterapii rezistentní, a buněk aktivně postupujících buněčným cyklem, které vykazují vysokou citlivost především vůči fázově specifickým cytostatikům. Právě vysoké procento klidových maligních buněk je jedním z hlavních problémů terapie solidních nádorů, který lze překonat správně načasovanou aplikací fázově specifických cytostatik ve chvíli, kdy buňky vykazují proti danému cytostatiku nejvyšší citlivost. Právě z tohoto důvodu se má bakalářská práce zaměřuje na problematiku protinádorových léčiv v kombinaci s FUCCI systémem a obrazovou analýzou.

2 CÍLE

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše se zaměřením na protinádorová léčiva a jejich účinek na buněčné úrovni, buněčný cyklus a jeho modifikace v nádorových buňkách, metody využívané při studiu buněčného cyklu a mechanismy vzniku rezistence vůči cytostatikům.

Experimentální část této bakalářské práce zahrnovala seznámení se s prací v laboratoři tkáňových kultur za sterilních podmínek, přípravu roztoků cytostatik, stanovení jejich cytotoxicity pomocí MTS testu a obrazovou analýzu se zaměřením na změny v dynamice buněčného cyklu a morfologii jádra po jednodenní inkubaci reportérové buněčné linie U2OS - FUCCI, připravené lentivirovou transfekcí a stabilně exprimující fluorescenční próby mAG-hGem₁₋₁₁₀ a mKO2-hCdt₁₃₀₋₁₂₀, s předem připravenými roztoky cytostatik.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Nádorová onemocnění

Nádorové onemocnění neboli rakovina je choroba charakterizovaná nekontrolovatelným dělením buněk, které se projevuje tvorbou nádorů či rozvojem rakoviny kostní dřene a krve (Shewach a Kuchta, 2009).

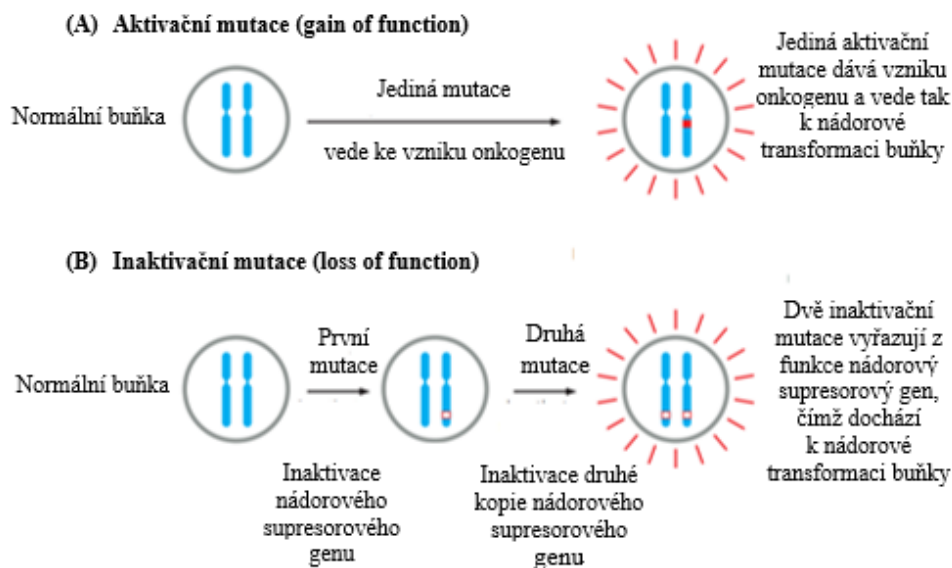
V současné době se jedná o druhou nejčastější příčinu úmrtí na světě. Jen v roce 2015 zemřelo po celém světě na následky nádorových onemocnění 8,7 milionů lidí (Fitzmaurice *et al.*, 2017). Nejčastěji se vyskytujícími typy nádorových onemocnění u žen jsou rakovina prsu, plic, tlustého střeva a štítné žlázy, jejíž incidence je u žen výrazně vyšší než u mužů. U mužů kromě rakoviny plic a tlustého střeva převažuje rakovina prostaty. (Dorak a Karpuzoglu, 2012; Siegel *et al.*, 2016).

Mortalita nádorových onemocnění u mužů je vyšší než u žen (189,5 úmrtí na 100 tisíc mužů a 135,7 úmrtí na 100 tisíc žen), přičemž nejvyšší riziko úmrtí hrozí mužům afroamerického původu (227,3 úmrtí na 100 tisíc mužů) a naopak nejnižší riziko ženám původem z ostrovů v oblasti Asie a Pacifiku (85,6 úmrtí na 100 tisíc žen) (Hayes, 2021). Díky pokrokům na poli léčby, prevence a včasné diagnostiky nádorových onemocnění však dochází k postupnému snižování mortality této skupiny chorob. Jen v USA došlo mezi léty 1991 a 2012 k poklesu mortality rakoviny o téměř 23 %. Velký podíl na tomto snížení má i neustále se snižující popularita užívání tabáku spojeného s rozvojem karcinomu plic. Kouření dosáhlo nejvyšší popularity v průběhu 60. let 20. století a stálo tak za prudkým nárůstem mortality karcinomu plic v průběhu 20. století (Cummings a Proctor, 2014; Siegel *et al.*, 2016)

Přestože první doložené případy nádorových onemocnění člověka pocházejí již ze starověku, došlo teprve až v posledních několika dekádách ve spojitosti se zvýšeným množstvím karcinogenů v prostředí a rapidně stárnoucí populací k prudkému nárůstu jejich prevalence (Faguet, 2014; Sudhakar, 2009).

3.2 Geny stojící za rozvojem nádorových onemocnění

Rakovinu lze definovat jako genetickou chorobu somatických buněk způsobenou aktivací protoonkogenů či inaktivací nádorových supresorových genů (Hanahan a Weinberg, 2000). Geny podílející se na rozvoji rakoviny lze zařadit do jedné z těchto dvou skupin na základě toho, zdali k rozvoji rakoviny dochází z důvodu zvýšené, či naopak snížené aktivity produktů kódovaných těmito geny (Alberts *et al.*, 2014).



Obr. 1: Mutace protoonkogenů a nádorových supresorových genů vedoucí k nádorové transformaci buněk (převzato a upraveno z Alberts, 2014).

3.2.1 Protoonkogeny

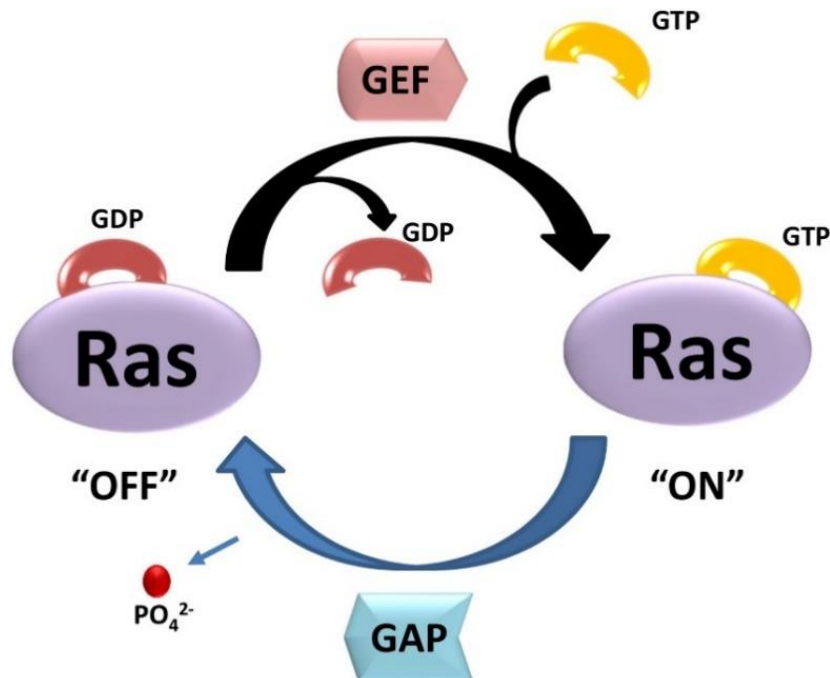
Protoonkogeny, konkrétně jejich mutantní formy zvané onkogeny, jsou první skupinou genů zodpovědnou za rozvoj rakoviny. Protoonkogeny jsou strukturální geny podílející se na regulaci klíčových buněčných procesů, jako je buněčný růst, proliferace a apoptóza. Produkty protoonkogenů fungují jako růstové faktory, jaderné transkripční faktory či signální transduktory (Shortt a Johnstone, 2012). Protoonkogeny mohou být transformovány v onkogeny bodovými mutacemi, chromozomovými translokacemi, genovými amplifikacemi, inzercemi provirů, genovými translokacemi či přeskupením genů (Wei, 1992). Změny vedoucí k aktivaci protoonkogenů jsou spojeny se zvýšenou expresí protoonkogeny kódovaných proteinů, expresí mutantních forem těchto proteinů, které jsou charakterizovány zvýšenou stabilitou či pozměněnou funkcí, nebo s odlišnou buněčnou lokalizací standardních genových produktů způsobenou zvýšenou expresí či pozměněnou strukturou jejich vazebných partnerů (Shortt a Johnstone, 2012).

Příkladem aktivace protoonkogenů prostřednictvím translokace je vznik fúzního genu *BCR-ABL1* na tzv. Filadelfském chromozomu. Filadelfský chromozom vzniká reciprokní translokací mezi dlouhými raménky chromozomů 9 a 22 a běžně se vyskytuje u pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií (CML). Během translokace je protoonkogen *ABL1* kódující tyrosinkinázu z chromozomu 9 translokován na místo zlomu na chromozomu 22 za vzniku fúzního genu *BCR-ABL1* kódujícího fúzní protein s vysokou tyrosinkinázovou

aktivitou, která narušením signálních drah zvyšuje proliferaci a potlačuje diferenciaci lymfocytů (Kang *et al.*, 2016).

Často amplifikovaným protoonkogenem je *c-Myc*. Jedná se o strukturální gen kódující transkripční faktor tvořící heterodimer s proteinem Max. Produkt *c-Myc* se podílí se na expresi několika genových rodin, čímž zásadně ovlivňuje proliferaci a metabolické procesy buňky. *c-Myc* stimuluje expresi genů podílejících se na biosyntéze proteinů a transkripčních faktorů a genů stimujících metabolismus nádorových buněk za současné inhibice exprese vybraných nádorových supresorových genů (Eilers a Eisenman, 2008).

Příkladem aktivace protoonkogenů mutacemi jsou *Ras* protoonkogeny. *Ras* protoonkogeny, konkrétně geny *KRAS*, *HRAS* a *NRAS*, kódují malé GTPázy, které fungují jako molekulární spínače regulující signální dráhy zodpovídající za buněčnou proliferaci. Standardní varianty těchto proteinů jsou přísně regulovány výměnnými faktory guaninového nukleotidu (GEFs), které podporují disociaci GDP a vazbu GTP, čímž aktivují příslušné *Ras*, a proteiny aktivující GTPázovou aktivitu (GAPs) inhibující aktivitu *Ras* hydrolyzou GTP. Rozvoj rakoviny následkem aberantní funkce *Ras* je spojen s výskytem jediné mutace v kodonu 12, 13 či 61, která zabraňuje hydrolyze GTP, následkem čehož zůstává *Ras* konstitutivně aktivní (Quinlan a Settleman, 2009).



Obr. 2: Regulace aktivity malých GTPáz prostřednictvím GAPs a GEFs (převzato a upraveno z Qu *et al.*, 2019).

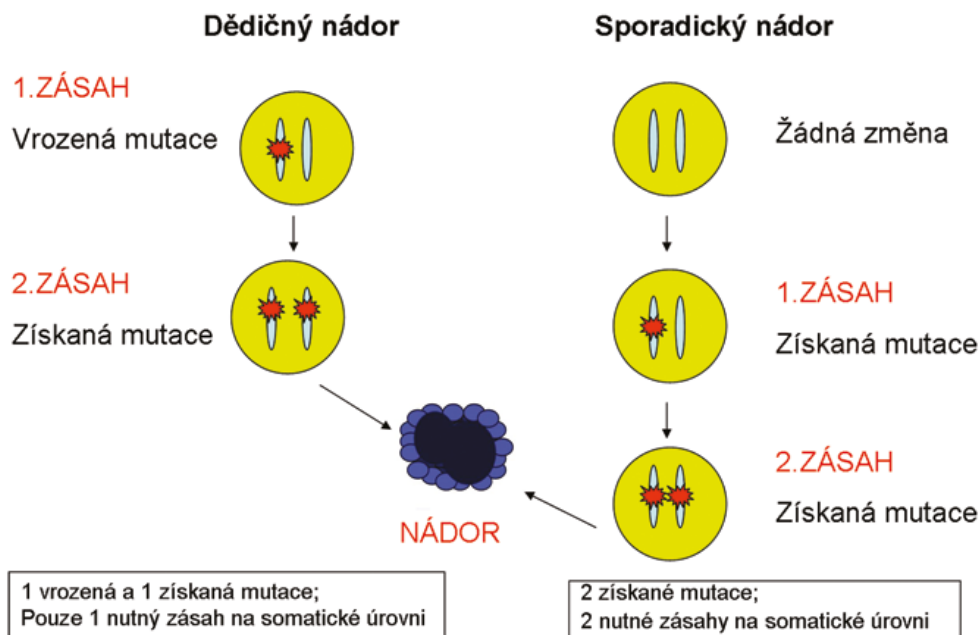
3.2.2 Nádorové supresorové geny

Nádorové supresorové geny jsou geny, jejichž inaktivace je spojena s rozvojem nádorových onemocnění. Jedná se o geny podílející se na regulaci zásadních buněčných procesů včetně indukce apoptózy, inhibice buněčného cyklu či oprav molekuly DNA (Sun a Yang, 2010). Na rozdíl od protoonkogenů je pro vyřazení funkce nádorových supresorových genů nutné, aby došlo k permanentní inaktivaci či ztrátě obou alel konkrétního nádorového supresorového genu. Funkce alely může být ztracena inaktivujícími mutacemi, posunutím čtecího rámce delecí či inzercí segmentu DNA a epigenetickými regulacemi (Liu *et al.*, 2012).

Běžným jevem vyskytujícím se v nádorových buňkách je tzv. ztráta heterozygotnosti. Jedná se o jev, kdy se původně heterozygotní buňka ztrátou jedné ze svých alel daného lokusu stává homozygotní. Děje se tak buďto prostou delecí alely či delecí alely následovanou duplikací zbývající alely. Ztráta heterozygotnosti je spojena se zvýšeným rizikem rozvoje nádorových onemocnění, jelikož k jejich rozvoji v tomto případě postačuje vyřazení funkce pouze jedné zbývající alely. Dojde-li ke ztrátě heterozygotnosti v buňce zárodečné linie, je tato ztráta přenášena do následujících generací, u kterých lze rovněž pozorovat zvýšené riziko rozvoje nádorových onemocnění, což je podstatou hereditárních nádorových syndromů, které jsou detailněji popsány v následující podkapitole (Zhang a Sjöblom, 2021).

Ztrátě heterozygotnosti se mimo jiné věnoval Alfred Knudson, který roku 1971 formuloval tzv. teorii dvou zásahů, v níž stanovil počet mutací potřebných k rozvoji familiárního i nefamiliárního retinoblastomu na dvě. V případě familiárního retinoblastomu se jedna z mutací objevuje sporadicky v průběhu vývoje somatické tkáně, zatímco druhá mutace je zděděna po předkovi. V případě nefamiliárního retinoblastomu se obě inaktivující mutace objevují sporadicky v průběhu života jedince při vývoji somatické tkáně. (Knudson, 1971). Nádorové supresorové geny lze dle jejich účinku rozdělit do tří skupin:

- **Gatekeepers geny** jsou schopné potlačit buněčný růst regulací buněčného cyklu, diferenciací, proliferací a apoptózou.
- **Caretaker geny** jsou charakteristické svou schopností detekovat a opravovat chyby v molekule DNA.
- **Landscaper geny** regulují podmínky buněčného mikroprostředí (Turnbull a Hodgson, 2005).

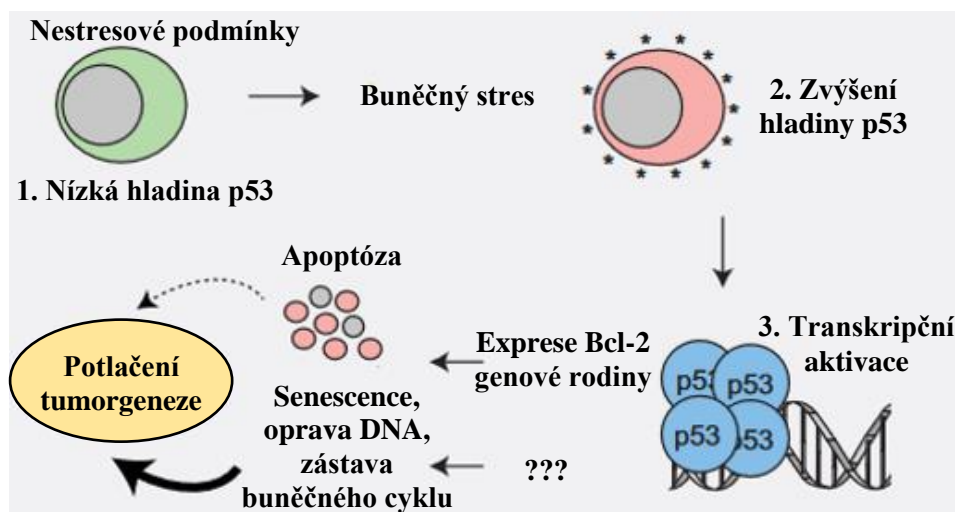


Obr. 3: Schématické znázornění Knudsonovy teorie dvou zásahů (převzato z Bajčiová, 2015).

Významným nádorovým supresorovým genem je *RBI* kódující retinoblastomový protein (pRb) (Engel *et al.*, 2015). pRb je aktivován hypofosforylací komplexu cyklin D-CDK4/CDK6. V aktivním stavu funguje jako transkripční represor inhibující transkripční faktory rodiny E2F indukující expresi genů nezbytných pro přechod z G1 do S fáze. pRb je naopak inaktivován hyperfosforylací katalyzovanou komplexem cyklin E-CDK2 (Ezhevsky *et al.*, 1997). Existuje řada mechanismů, kterými v nádorových buňkách dochází k narušení antiproliferativního účinku *RBI*. Jedná se například o výskyt inaktivujících mutací v *RBI* či inhibici pRb vazbou virových onkoproteinů, jako je například protein E7 kódovaný lidským papilomavirem (HPV), který se váže na řadu dalších proteinů včetně cyklinů A, p130 a p107, čímž potlačuje jejich antiproliferativní účinky (Javanmard *et al.*, 2019).

Nejvýznamnějším nádorovým supresorovým genem je *TP53*, kterému se přezdívá “strážce genomu“, jelikož monitoruje hladinu mnohých stresových faktorů včetně poškození DNA, aktivace onkogenů či hypoxie (Hofseth *et al.*, 2004). Produktem genu je transkripční faktor p53, který indukuje expresi genů podílejících se na opravách molekuly DNA, indukci apoptózy a zástavě buněčného cyklu, čímž se přímo podílí na potlačení tumorigeneze (Goh *et al.*, 2011). Poškození molekuly DNA vede k aktivaci ATM/ATR kináz, které následně fosforylují p53 (Maréchal a Zou 2013). Fosforylací p53 dochází k jeho uvolnění z negativního regulátoru MDM2, který jej označuje pro degradaci ubiquitin-proteazomovou dráhou (Khosravi *et al.*, 1999). Aktivní p53 indukuje expresi genu *BAX* patřícího do Bcl-2 genové rodiny, který kóduje protein BCL2L4 (Apte *et al.*, 1995). BCL2L4 indukuje tzv. vnitřní

(intrinsickou) cestu apoptózy permeabilizací vnější mitochondriální membrány, následkem čehož dochází k uvolnění cytochromu C do cytosolu (Martinou a Youle, 2011). Uvolnění cytochromu C vede k aktivaci proteolytických enzymů zvaných kaspázy, které se podílejí na degradaci širokého spektra proteinů včetně substrátů elektronového transportního řetězce, což má za následek inhibici respirace, akumulaci reaktivních forem kyslíku a eventuálně buněčnou smrt (Kuwana a Newmeyer, 2003). K inaktivaci signální dráhy p53 může dojít výskytem přímé mutace genu TP53, jeho delecí či amplifikací významných negativních regulátorů p53, jako je například již dříve zmíněný MDM2 či MDM4 (Wasylishen a Lozano, 2016).



Obr. 4: Schéma tumor supresorové aktivity proteinu p53 (převzato a upraveno z Auebry *et al.*, 2018).

3.3 Dědičná predispozice rakoviny

Je-li u rodinného příslušníka diagnostikováno nádorové onemocnění, dochází ke zvýšení empirického rizika výskytu stejného či příbuzného typu rakoviny u příbuzných jedinců. Stupeň empirického rizika závisí především na počtu příbuzných jedinců postižených daným typem rakoviny na jedné straně rodiny a na věku jedince v době stanovení diagnózy (Turnbull a Hodgson, 2005). Například v případě rakoviny prostaty je u jedinců s příbuzným prvního stupně, který byl diagnostikován s rakovinou prostaty, zvýšeno celoživotní riziko výskytu tohoto onemocnění téměř 2,5násobně (Zeegers *et al.*, 2003).

Hereditární nádorové syndromy představují skupinu chorob zodpovědnou za rozvoj asi 5 % veškerých případů nádorových onemocnění projevující se výskytem dědičných mutací zvyšujících u jedince riziko rozvoje určitého typu rakoviny. U postižených jedinců dochází k rozvoji konkrétního nádorového onemocnění již v útlém věku, čímž se zásadně liší od

sporadicky se vyskytujících nádorových onemocnění. Ve většině případů nádorových syndromů je zvýšené riziko rozvoje rakoviny způsobeno mutací v jediném genu s vysokou penetrancí. Je-li onemocnění způsobeno mutací jediného genu, hovoříme o tzv. monogenně dědičných chorobách (Rahner a Steinke, 2008; Turnbull a Hodgson 2005). Analogicky dochází k mutacím těchto genů i u sporadicky se vyskytujících nádorových onemocnění, avšak v tomto případě se jedná o mutace somatické vznikající v již diferencovaných buňkách v průběhu života jedince. Z tohoto důvodu nejsou přenášeny do následujících generací. Naopak v případě hereditárních nádorových onemocnění se jedná o mutace zárodečné linie, díky čemuž se přenášejí do následujících generací. Zárodečné mutace se proto vyskytují ve všech buňkách těla budoucího jedince, čímž je výrazně zvýšeno riziko rozvoje rakoviny již v útlém věku (Turnbull a Hodgson, 2005).

Monogenně dědičné choroby nejčastěji vykazují autozomálně dominantní typ dědičnosti s neúplnou penetrancí (Turnbull a Hodgson, 2005). Dle definice autozomálně dominantního typu dědičnosti tedy dochází k rozvoji choroby při výskytu vrozené mutace již v jedné kopii daného genu (Knudson, 1971). Tato definice ovšem platí pouze pro protoonkogeny. V případě nádorových supresorových genů, jejichž mutace vykazují na molekulární úrovni recesivní charakter, je pro rozvoj choroby nezbytná inaktivace obou kopií konkrétního genu prostřednictvím mutací. Je-li jedinec nositelem vrozené mutace v jedné kopii daného genu, a vyskytne-li se v průběhu jeho života somatická inaktivující mutace v druhé kopii tohoto genu, rozvine se u tohoto jedince nádorové onemocnění (Dębniak a Lubiński, 2008).

Jednotlivé hereditární nádorové syndromy jsou charakterizovány specifickým spektrem nádorových onemocnění, jejichž riziko rozvoje tento syndrom zvyšuje, a geny, jejichž mutace vedou k jeho rozvoji (Rahner a Steinke, 2008). Příklady vybraných hereditárních nádorových syndromů jsou uvedeny v následující tabulce (viz tab. 1).

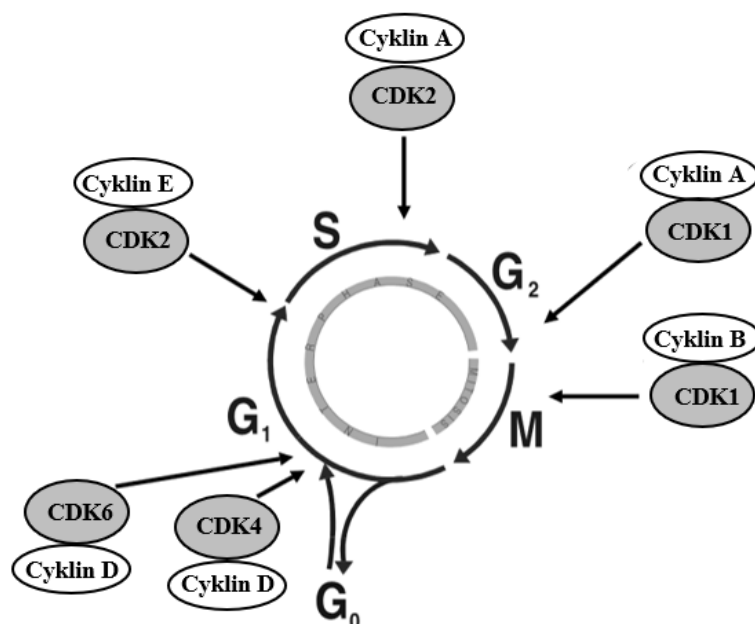
Tab. 1: Vybrané příklady hereditárních nádorových syndromů a odpovídajících nádorových onemocnění se zvýšeným rizikem rozvoje (převzato a upraveno z Rahner a Steinke, 2008).

Hereditární nádorový syndrom	Gen	Incidence	Nádorová onemocnění
Familiární retinoblastom	RB1	1:15 000 až 1:20 000	Bilaterální retinoblastom v dětství, v dospělosti sekundární nádory
Syndrom Li-Fraumeni	TP53	Celosvětově méně než 400 rodin	Široké spektrum nádorů včetně leukémie, sarkomů a nádorů mozku
Syndrom von Hippel-Lindau	VHL	1:36 000	Většinou benigní nádory, světlobuněčný renální karcinom
Hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií	BRCA1, BRCA2	1:500 až 1:1000	Rakovina prsu, prostaty a ovarií
Lynchův syndrom (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom)	MSH2, MLH1, MSH6, PMS2	Přibližně 1:500	Rakovina tlustého a tenkého střeva, endometria, žaludku a uroteliální karcinom
Fanconiho anémie	FANC, A-H	1:100 000	Hematologické nádory
Ataxia telangiectasia (syndrom Louis-Barové)	ATM	1:40 000 až 1:100 000	Non-Hodgkinův lymfom, leukémie

3.4 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je vysoce organizovaný proces, při němž dochází ke zdvojení a přenosu genetické informace do následující generace buněk. Klíčovými kroky tohoto procesu jsou přesná replikace molekuly DNA a rozdělení identických kopií chromozomů do dceřiných buněk.

Buněčný cyklus je rozdělen do čtyř fází probíhajících v tomto pořadí: G1, S, G2 a M (Israels a Israels, 2000). G1, S a G2 fáze se souhrnně označují jako interfáze, která předchází buněčnému dělení probíhajícím v M fázi (Vermeulen *et al.*, 2003). M fáze se skládá z mitózy a cytokineze. Během mitózy jsou replikované chromozomy rozděleny do vznikajících jader, zatímco při navazující cytokinezi dochází k fyzickému rozdělení mateřské buňky a vzniku dvou buněk dceřiných (Johnson a Walker, 1999). Interfáze představuje časový úsek mezi dvěma buněčnými děleními. Během G1 fáze se buňka připravuje na replikaci DNA probíhající v S fázi. Interfáze je zakončena G2 fází, kdy se buňka připravuje na nadcházející buněčné dělení (Vermeulen *et al.*, 2003).

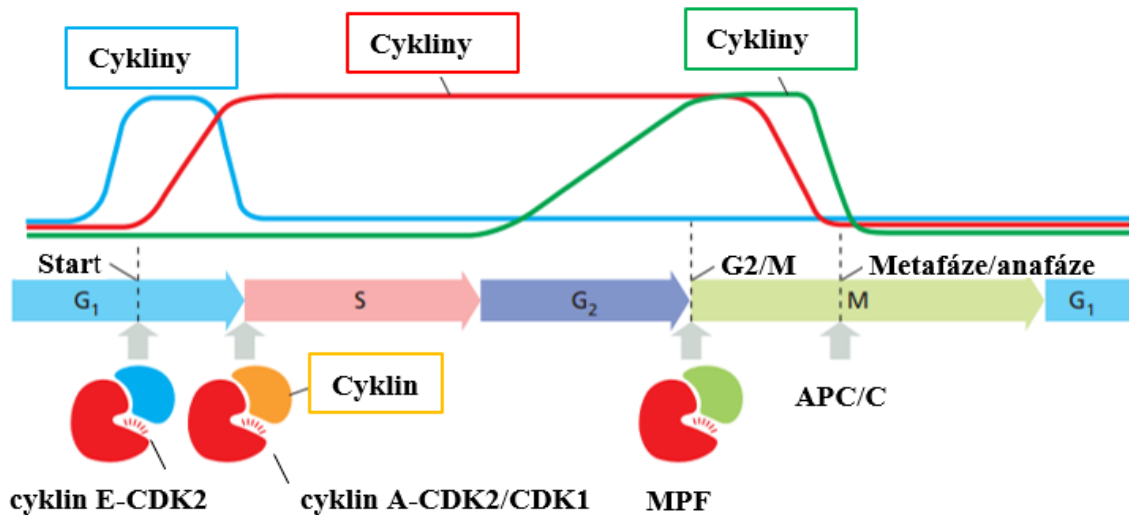


Obr. 5: Jednotlivé fáze buněčného cyklu s vyznačenými regulačními komplexy cyklin-CDK (převzato a upraveno z Vermeulen *et al.*, 2003).

3.4.1 Cykliny a cyklin dependentní kinázy

Přechody mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu jsou na molekulární úrovni regulovány kooperací cyklin dependentních kináz (CDK) a cyklinů. CDK jsou serin/threoninové kinázy, jejichž enzymatická aktivita je podmíněna vytvořením komplexu s jejich regulačními podjednotkami, kterými jsou cykliny (Vermeulen *et al.*, 2003). Na rozdíl od CDK koncentrace cyklinů v průběhu buněčného cyklu oscilují, přičemž je charakteristická jejich akumulace v průběhu interfáze následována prudkým poklesem jejich hladiny během mitózy (Fung a Poon, 2005). Právě díky periodické expresi cyklinů jsou příslušné CDK aktivovány jen ve specifických fázích buněčného cyklu, kdy je v buňce přítomen konkrétní cyklin nezbytný pro vytvoření enzymaticky aktivního komplexu cyklin-CDK. Na fluktuaci hladiny cyklinů v průběhu buněčného cyklu má vliv i jejich degradace, která probíhá ubikvitinací PEST sekvencí bohatých na prolin (P), glutamát (G), serin (S) a threonin (T). Díky tomuto mechanismu jsou přechody mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu doprovázeny degradací cyklinů nezbytných pro průběh předchozí fáze a syntézou cyklinů nezbytných pro průběh fáze následující (Schafer, 1998). V G₁ fázi jsou v buňce přítomny cykliny D (D1, D2 a D3), které se váží na CDK4 a CDK6 za vzniku komplexů cyklin D-CDK nezbytných pro vstup buňky do G₁ fáze (Sherr, 1994). Společně s cykliny D jsou v buňce během G₁ fázi přítomny cykliny E, které tvoří komplex s CDK2, čímž zajišťují přechod buňky z G₁ do S fáze. V průběhu S fáze jsou pro zahájení a správný průběh replikace DNA nezbytné cykliny A tvořící

komplexy s CDK2 (Vermeulen *et al.*, 2003). Během pozdní G2 fáze tvoří cykliny B s CDK1 M-fázi-podporující faktor (MPF), který je nezbytný pro vstup buňky do M fáze (Kishimoto, 2015).



Obr. 6. Hladina jednotlivých tříd cyklínů v průběhu buněčného cyklu (převzato a upraveno z Alberts, 2014).

V lidských buňkách bylo doposud popsáno 20 různých CDK a 29 cyklínů. CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6 a CDK7 regulují přechody mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu, zatímco CDK7-11 regulují transkripci genů (Cicenas a Valius, 2011; Cao *et al.*, 2014).

Kromě vazby cyklínů je pro úplnou aktivaci CDK nezbytná fosforylace jejich tyrosinových a threoninových zbytků katalyzovaná CDK-aktivační kinázou (CAK). Jedná se o enzymaticky aktivní komplex složený z cyklínu H a CDK7. Fosforylace tyrosinových a threoninových zbytků CDK má za následek změnu její konformace, která zvyšuje afinitu CDK k příslušným cyklínům (Vermeulen *et al.*, 2003)

Aktivita CDK je negativně regulována řadou kináz včetně WEE1 a PKMYT1 inhibujících aktivitu komplexu cyklín-CDK. WEE1 a PKMYT1 fosforylují komplex MPF, který je nezbytný pro přechod buňky do M fáze, v pozici Tyr15 a Thr14, čímž je buňkám zabráněno ve vstupu do M fáze. Prostřednictvím tohoto mechanismu je buňkám s pozměněnou sekvencí DNA zabráněno v buněčném dělení (Mueller *et al.*, 1995). MPF zůstává inhibován do té doby, dokud buňka nedosáhne vstupu do M fáze. V případě, že není na pomezí G2 a M fáze detekováno poškození molekuly DNA, je fosforylace na Thr14 a Tyr15 odstraněna působením fosfatázy Cdc25. V jádře pak dochází k sestavení komplexu CAK složeného z CDK7, cyklínu H1 a proteinu MNAT1, který aktivuje komplex MPF fosforylací molekuly CDK1 v pozici

Thr161 (Ghelli Luserna di Rorà *et al.*, 2020)

Dalšími negativními regulátory aktivity CDK jsou CDK-inhibiční proteiny (CKI). CKI inhibují aktivitu CDK vazbou na komplex cyklin-CDK či samotnou CDK. CKI se dělí na rodinu Cip/Kip a INK4 (Vermeulen *et al.*, 2003). Rodina Cip/Kip je v případě savčích buněk tvořena proteiny p21^{Cip1}, p27^{Kip1} a p57^{Kip2}, které primárně inhibují enzymatickou aktivitu CDK1 a CDK2 (Ullah, 2009). Do INK4 rodiny řadíme proteiny p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) a p19 (INK4d). Tyto proteiny se váží na CDK4 a CDK6, čímž zabraňují vazbě cyklinů D (Roussel, 1999).

3.4.2 Kontrolní body buněčného cyklu

Kontrolní body představují soubor mechanismů regulujících postup buňky buněčným cyklem. Dojde-li v průběhu buněčného cyklu k poškození molekuly DNA či nedokončení některého z klíčových procesů dané fáze, na jehož dokončení jsou závislé procesy v následujících fázích, pozastaví kontrolní mechanismy buněčný cyklus, dokud nedojde k opravě molekuly DNA či dokončení příslušných procesů (Paulovich *et al.*, 1997)

Kontrolní bod v pozdní G1 fázi je označován jako restriční bod (Pardee, 1974). Během ranné G1 fáze se na základě extracelulárních signálů, především růstových faktorů, buňka rozhoduje, zdali se zaváže ke vstupu do buněčného cyklu, či nikoliv. Je-li buňka dostatečně stimulována růstovými faktory, dochází ke zvýšené expresi cyklinů D, které tvoří vazbou na CDK4 a CDK6 enzymaticky aktivní komplexy fosforylující pRb, čímž je zajištěn postup buňky G1 fázi. (Matsushime *et al.*, 1991; Johnson a Walker 1999). Při snížené expresi cyklinů D podstupuje buňka diferenciaci, apoptózu nebo vstupuje do klidové G0 fáze, ve které setrvává, dokud nedojde k obnovení stimulace extracelulárními mitotickými signály (Israels a Israels, 2000).

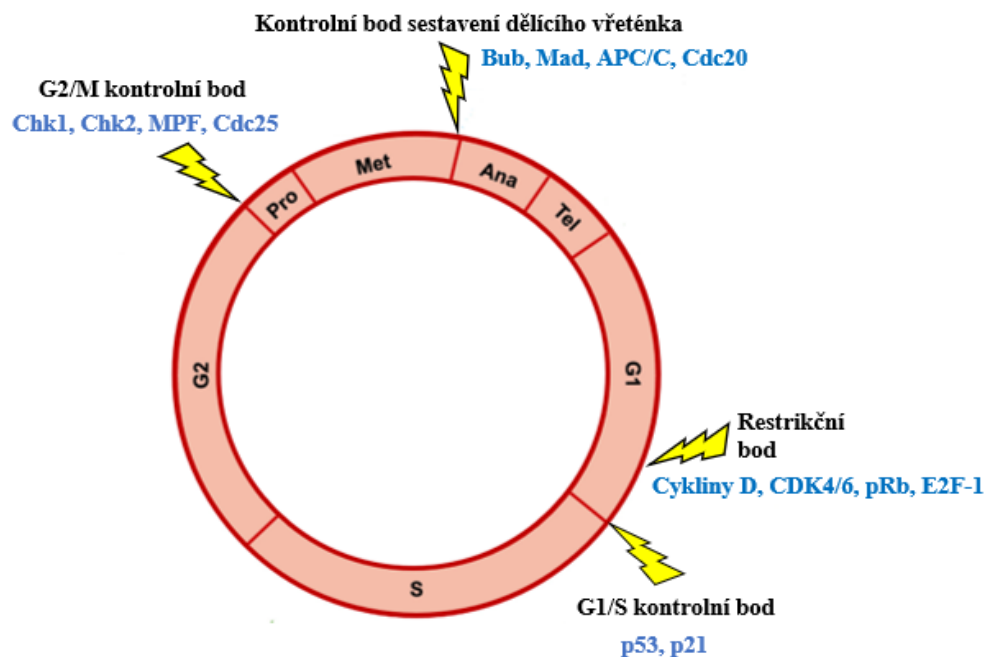
Jakmile buňka překročí v průběhu G1 fáze restriční bod, zavazuje se k postupu buněčným cyklem, a to i v případě vymizení růstových faktorů (Pardee, 1974). Fosforylace pRb komplexy cyklin D-CDK4/CDK6 vede aktivaci transkripčních faktorů E2F-1 a DP-1 indukujících expresi genů kódujících cykliny A, cykliny E a Cdc25, které jsou nutné pro postup buňky do S fáze (Vermeulen *et al.*, 2003). Komplex potřebný pro přechod do S fáze vzniká vazbou cyklinu E na CDK2 (Ohtsubo *et al.*, 1995). Tento komplex udržuje pRb ve fosforylovaném stavu a fosforyluje histon H1, následkem čehož dochází ke změně struktury chromatinu, která je potřebná pro replikaci DNA v nadcházející S fázi (Johnson a Walker, 1999).

Postup buňky G1 fázi je v případě poškození DNA pozastaven v kontrolním bodě na

pomezí G1 a S fáze (kontrolní bod G1/S), dokud nejsou příslušné chyby buněčnými reparačními mechanismy opraveny, čímž je zabráněno replikaci poškozené DNA. Zástava buněčného cyklu, případně apoptóza, je indukována zvýšenou aktivitou p53, jehož hladina v buňce v reakci na poškození DNA prudce stoupá. Zvýšená hladina proteinu p53 vede k aktivaci proteinu p21, který funguje jako inhibitor CDK zajišťujících postup buňky do S fáze. (Pellegata *et al.*, 1996).

Další kontrolní bod se nachází na pomezí G2 a M fáze (kontrolní bod G2/M). V tomto případě je buňce s poškozenou či nekompletně replikovanou DNA zabráněno v buněčném dělení (Pellegata *et al.*, 1996). Poškozená DNA indukuje aktivaci proteinkináz Chk1 a Chk2 ATM signální kaskádou. Chk1 fosforyluje Cdc25 v pozici Ser 216, čímž dochází k vytvoření vazebné domény pro vysoce konzervovanou rodinu 14-3-3 proteinů inhibujících Cdc25, následkem čehož nedochází k aktivaci komplexu MPF nutného pro přechod do M fáze (Smith *et al.*, 2010; Sur a Agrawal, 2016).

Poslední kontrolní bod reguluje přechod mezi metafází a anafází kontrolou správného napojení mikrotubulů dělicího vřeténka na kinetochory. V případě chybného napojení dochází k aktivaci proteinů Bub a Mad, které zastavují buněčný cyklus v metafázi inhibicí Cdc20 podjednotky anafáze podporujícího komplexu (APC/C) zajišťujícího přechod buňky do anafáze (Fang *et al.*, 1998).



Obr. 7: Kontrolní body buněčného cyklu (žluté blesky) a jejich významné regulátory (modře) (převzato a upraveno z Mierke, 2020).

3.4.3 Buněčný cyklus v nádorových buňkách

Nádorové buňky se vyznačují nekontrolovatelnou proliferací, která je způsobena narušením genetických mechanismů regulujících proces buněčného dělení. Jak již bylo zmíněno dříve, narušení těchto genetických mechanismů je způsobeno především výskytem mutací v nádorových supresorových genech, jejichž produkty za standardních podmínek inhibují postup buněčným cyklem, a protoonkogenech, jejichž produkty stimulují buněčnou proliferaci. Deregulace buněčného cyklu v nádorových buňkách může být způsobena především výskytem mutací v genech kódujících CDK, cykliny a CKI (Vermeulen *et al.*, 2003).

Velmi běžným mechanismem podílejícím se na deregulaci buněčného cyklu je zvýšená exprese cyklinů D, především pak cyklinu D1. Zvýšená exprese cyklinů D je považována za jeden z hlavních faktorů podílejících se na rozvoji rakoviny prsu, jícnu, lymfomu z plášťových buněk a rakoviny hlavy a krku. Zvýšená exprese cyklinu D1 je výsledkem genomových alterací, posttranslačních modifikací vedoucích ke zvýšení stability proteinu a posttranskripčních regulací jeho exprese (Kim a Diehl, 2009). Kromě cyklinů D byla v případě rakoviny plic pozorována navíc zvýšená exprese cyklinů A a cyklinů E, přičemž zvýšená exprese cyklinů A je přímo spojena s horší prognózou přežití pacientů trpících tímto typem rakoviny (Dobashi *et al.*, 1998).

Deregulace buněčného cyklu je rovněž výsledkem amplifikací či mutací genů kódujících CDK. Výskyt specifických mutací v genech kódujících CDK, které potlačují vazbu příslušných CKI, byl popsán v případě CDK4 a CDK6. Výskyt mutací v genech kódujících CDK4 a CDK6 vede k potlačení vazby inhibitoru p16, následkem čehož dochází k inaktivaci pRb (Easton *et al.*, 1998). Amplifikace a nadměrná exprese genu kódujícího CDK4 byla pozorována v případě glioblastomu, sarkomu a rakoviny prsu (An *et al.*, 1999).

Mutace nádorových supresorových genů kódujících CKI, jako jsou například již zmíněné proteiny p15, p16 či p27, jsou dalším z možných mechanismů vedoucích k deregulaci buněčného cyklu. Kromě bodových mutací mohou být proteiny p15 a p16, lokalizované v chromozomové oblasti 9p21, inaktivovány výskytem delečních mutací či hypermethylací příslušných CpG ostrůvků. Zásadní roli proteinů p15 a p16 při rozvoji nádorových onemocnění potvrzuje skutečnost, že ztráta heterozygotnosti v chromozomové oblasti 9p21 byla detekována ve více než 50 % případů nádorů močového měchýře a melanomu (Kamb, 1998).

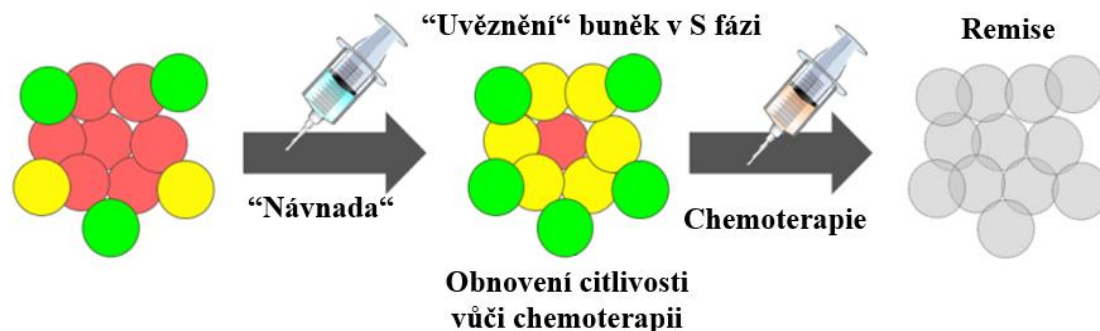
3.5 Chemoterapie

Jelikož představuje rakovina druhou nejčastější příčinou úmrtí na světě, dochází neustále k vývoji nových metod její terapie. Mezi běžně využívané postupy terapie rakoviny patří například radioterapie, chirurgické zákroky, imunoterapie, hormonální léčba, genová terapie a především chemoterapie, která je v dnešní době nejčastěji využívanou metodou terapie nádorových onemocnění (Bukowski *et al.* 2020).

Cytostatika lze z hlediska závislosti jejich účinnosti na konkrétní fázi buněčného cyklu rozdělit na cytostatika fázově specifická (time-dependent) a fázově nespecifická. Fázově specifická cytostatika vykazují účinnost pouze v konkrétních fázích buněčného cyklu aktivně se dělících buněk, zatímco účinnost fázově nespecifických cytostatik není omezena na jednotlivé fáze buněčného cyklu. Fázově nespecifická cytostatika jsou rovněž účinná vůči buňkám nacházejícím se v klidové (G0) fázi (Alagkiozidis *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2021)

Klidové maligní buňky představují zásadní problém především v terapii solidních nádorů, které jsou z větší části tvořeny právě tímto typem buněk, zatímco aktivně se dělící buňky, nacházející se v S, G2 či M fázi, jsou lokalizovány pouze na povrchu nádoru a v bezprostřední blízkosti cév. Rezistence těchto klidových buněk vůči konvenční chemoterapii je spojena se zhoršenou prognózou a častou rekurencí nádorů po ukončení chemoterapie. Buňky se získanou rezistencí vůči používaným cytostatikům se rovněž stávají agresivnějšími a mohou snadněji metastázovat. Z tohoto hlediska se jako užitečný nástroj pro studium dynamiky buněčného cyklu v solidních nádorech jeví FUCCI systém, který lze využít k vývoji cílené protinádorové léčby solidních nádorů a překonání rezistence klidových buněk (Yano *et al.*, 2020).

Jedna ze strategií terapie solidních nádorů založených na systému FUCCI, je terapie využívající geneticky modifikovaného telomerázově-specifického onkolytického adenoviru OBP-301, který funguje jako "návnada" neboli *decoy*. Pomocí FUCCI systému byl po infekci buněk solidního nádoru virem pozorován přechod infikovaných buněk do S, G2 a M fáze. Přechod a následné "uvěznění" buněk v S, G2 a M fázi vedlo k buněčné smrti vyvolané replikací viru a obnovení jejich citlivosti vůči konvenční chemoterapii (Yano *et al.*, 2013). Tento typ terapie se označuje jako *Cell-cycle decoy, trap and kill therapy* (Yano *et al.*, 2020).



Obr. 8: Schéma *Cell-cycle decoy, trap and kill* terapie (převzato a upraveno z Yano *et al.*, 2020).

Legenda: Buňky v G1 fázi jsou označeny červeně, ranné S fázi žlutě a pozdní S/G2/M fázi zeleně.

Tab. 2: Vybrané příklady fázově specifických a nespecifických cytostatik s uvedenými fázemi, ve kterých vykazují nejvyšší účinnost (převzato a upraveno z Katzung a Trevor, 2014).

Fázově specifická cytostatika	Fázově nespecifická cytostatika
Anitmetabolity (S fáze)	Alkylační činidla
5-Fluoruracil	Cholambucil
Gemcitabin	Melfalan
Methotrexát	Dakarbazin
Fludarabin	Temozolomid
Inhibitory topoizomerázy II (G2/M fáze)	Busulfan
Etoposid	Antibiotika
Inhibitory topoizomerázy I (G2/M fáze)	Mitomycin
Irinotekan	Bleomycin
Topotekan	Daktinomycin
Taxany (M fáze)	Platinové analogy
Taxol	Cisplatina
Docetaxel	Oxaliplatina
Vinca alkaloidy (M fáze)	Carboplatina
Vinkristin	Antracykliny
Vinblastin	Daunorubicin
Antibiotika (G2/M fáze)	Doxorubicin
Bleomycin	Mitoxantron

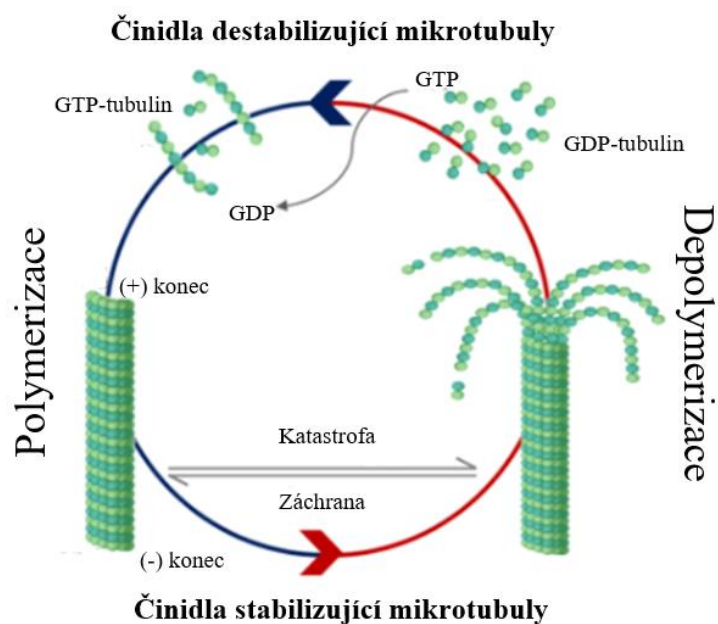
Dle konkrétního mechanismu účinku lze cytostatika rozdělit do následujících skupin: alkylační činidla, inhibitory mikrotubulů, antimetabolity a inhibitory topoizomeráz I. a II. třídy (Nussbaumer *et al.* 2011).

3.5.1 Alkylační činidla

Skupina alkylačních činidel zahrnuje platinové deriváty (cisplatina a oxaliplatina), dusíkaté yperity (chlorambucil a melfalan), oxazafosforiny (cyklofosfamid a ifosfamid) a deriváty hydrazinu (temozolomid) (Bukowski *et al.*, 2020). Alkylační činidla podléhají intramolekulární cyklizaci za vzniku reaktivního elektrofilu, který alkyluje nukleofilní centra představovaná atomy dusíku, kyslíku, fosforu či síry. Cytotoxický efekt alkylačních činidel spočívá ve tvorbě vnitřetězcových a mimořetězcových můstku v molekulách DNA a RNA, které inhibují procesy replikace, transkripce a translace (Egea *et al.*, 2022). Poškození molekuly DNA alkylačními činidly vede k aktivaci DNA reparačního enzymu PARP-1, jehož zvýšená syntéza způsobuje vyčerpání buněčných zásob ATP a NAD⁺, následkem čehož dochází k odumření buněk mechanismem nekrózy (Ethier *et al.*, 2012).

3.5.2 Inhibitory mikrotubulů

Inhibitory mikrotubulů lze rozdělit na dvě skupiny. První skupinou jsou činidla stabilizující mikrotubuly. Do této skupiny řadíme taxany (taxol a docetaxel), discodermolid, eleutherobin a epothilony A a B (Jordan a Willson, 2004). Vazba cytostatik této skupiny na mikrotubuly vede k vytvoření M-smyčky na β -tubulinu, která je nezbytná při laterálních interakcích mezi protofilamentami mikrotubulu, čímž dochází k posunutí rovnováhy tubulinu ve prospěch jeho polymerní formy (Prota *et al.*, 2013). Druhou skupinou jsou činidla destabilizující mikrotubuly, která zahrnuje vinca alkaloidy (vikristin a vinblastin), podofylotoxin a kolchiciny (Jordan a Willson, 2004). Cytostatika této skupiny inhibují polymerizaci a podporují depolymerizaci mikrotubulů vazbou na Vinca vazebnou doménu v blízkosti E-místa na β -podjednotce tubulinu či na Kolchicin vazebnou doménu lokalizovanou na rozhraní monomerů α a β -tubulinu (Karahalil *et al.*, 2019). Obě skupiny cytostatik potlačují správnou funkci mikrotubulů dělicího vřeténka, čímž zabraňují přechodu buňky z metafáze do anafáze a eventuálně indukují apoptózu (Jordan a Willson, 2004).



Obr. 9: Schématické znázornění procesu polymerizace a depolymerizace mikrotubulů (převzato a upraveno z Pal *et al.*, 2022).

3.5.3 Antimetabolity

Antimetabolity představují velmi rozsáhlou skupinu cytostatik, kterou lze rozdělit na několik podskupin: antifoláty (methotrexát a pemetrexed), analogy purinu (6-merkaptopurin a kladribin), antagonisty pyrimidinu (5-FU a gemcitabin), antagonisty purinu (fludarabin) a inhibitory ribonukleotidreduktázy (hydroxyurea). Jedná se o cytostatika, která narušují syntézu nukleových kyselin, zasahují do řady významných biosyntetických drah, způsobují zlomy v molekule DNA, inhibují enzymy nebo se mohou jako strukturální analogy inkorporovat do molekuly DNA (Bukowski *et al.*, 2020).

Antifoláty inhibují enzym dihydrofolátreduktázu (DHFR), která udržuje stálou hladinu intracelulárního tetrahydrofolátu katalýzou redukce dihydrofolátu na tetrahydrofolát. Tetrahydrofolát je významným kofaktorem přenášejícím při syntéze purinových bází, methioninu a thymidilátu jeden či dva jednouhlíkaté fragmenty. Jak puriny, tak thymidilát jsou nezbytnými sloučeninami pro syntézu DNA (Visentin *et al.*, 2012).

Analogy purinů jsou intracelulárně konvertovány činností deoxycytidinkináz do podoby cytotoxických 5-fosforylovaných derivátů. Ve fosforylované formě inhibují deriváty enzym ribonukleotidreduktázu katalyzující přeměnu ribonukleosid difosfátů na odpovídající deoxyribonukleosid difosfáty, které jsou dále fosforylovány za vzniku deoxyribonukleosid trifosfátů. Inhibicí enzymu dochází k vyčerpání intracelulárních zásob deoxyribonukleosid trifosfátů nezbytných pro replikaci DNA. Díky strukturální analogii se mohou analogy dATP

navíc inkorporovat do molekuly DNA a inhibovat polymerizaci nukleotidů (Pettitt, 2003).

Cytotoxický účinek antagonistů pyrimidinu spočívá v jejich schopnosti inkorporovat se do molekul DNA či RNA jako falešné prekurzory a inhibovat proteiny zapojené v metabolismu nukleotidů (Maring *et al.*, 2005). Nejčastěji využívaným cytostatikem této skupiny je 5-fluoruracil (5-FU). Internalizace 5-FU je doprovázená jeho přeměnou do podoby cytotoxického metabolitu. Cytotoxická forma 5-FU vzniká konverzí 5-FU na fluorouridin monofosfát (FUMP) za katalýzy orotátfosforibosyltransferázou. Další možností je přeměna 5-FU na FUMP katalyzovaná uridinfosforylázou a uridinkinázou. V neposlední řadě může být 5-FU konvertován na 5-fluoro-deoxy-uridin monofosfát (FdUMP) za katalýzy thymidinkinázou a thymidinfosforylázou (Diasio a Johnson, 2000). Metabolity 5-FU se váží na enzym thymidylátsyntázu, čímž dochází k její inhibici a vyčerpání intracelulárních zásob deoxythymidin monofosfátu (dTMP) nezbytného pro průběh replikace DNA a její opravy (Longley *et al.*, 2003). Cytotoxický efekt 5-FU je dále umocněn inkorporací jeho metabolitů do molekul DNA a RNA (Maring *et al.*, 2005).

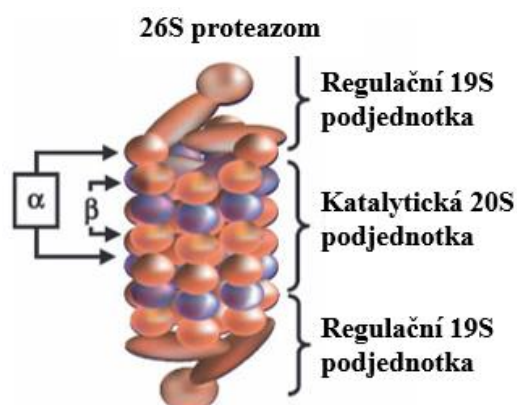
Hydroxyurea je inhibitorem ribonukleotidreduktázy. Inhibicí ribonukleotidreduktázy, dochází stejně jako v případě analogů purinu k vyčerpání intracelulárních zásob deoxyribonukleosid trifosfátů nezbytných pro replikaci DNA (Crona *et al.*, 2016).

3.5.4 Inhibitory topoizomeráz

DNA topoizomerázy jsou enzymy, které tvorbou dočasných zlomů v molekule DNA regulují její topologii, čímž zajišťují správný průběh replikace, transkripce a rekombinace. Rozlišujeme topoizomerázy I. třídy generující dočasné jednořetězcové zlomy DNA, a topoizomerázy II. třídy generující dočasné dvouřetězcové zlomy DNA (Champoux, 2001). Inhibitory topoizomerázy lze dle mechanismu účinku rozdělit na topoizomerázové jedy a katalytické inhibitory (Buzun *et al.*, 2020). Topoizomerázové jedy, jako je například etoposid, stabilizují kovalentní komplex DNA s navázanou topoizomerázou, následkem čehož dochází k akumulaci poškození v molekule DNA. Účinek topoizomerázových jedů je však spojen s řadou vedlejších účinků, jako je například vznik sekundárních malignit a výrazná kardiotoxicita (Drwal *et al.*, 2014). Druhou skupinou jsou katalytické inhibitory inhibující aktivitu topoizomerázy zabráněním vazby topoizomerázy na molekulu DNA či blokadí vazby ATP na příslušnou topoizomerázu (Jason *et al.*, 2013).

3.5.5 Cytostatika se specifickým účinkem

Bortezomib je reversibilní inhibitor 26S proteazomu. 26S proteazom je proteinový komplex složený z katalytické 20S podjednotky a dvou regulačních 19S podjednotek, který je nezbytný pro metabolický obrat intracelulárních proteinů prostřednictvím degradace proteinů označených polyubikvitinovým řetězcem. Inhibice 26S proteazomu je indukována reversibilní vazbou bortezomibu na katalytickou podjednotku, následkem čehož dochází k potlačení buněčného růstu a indukci apoptózy (Bladé *et al.*, 2005). Bortezomib navíc potlačuje NF- κ B signální dráhy, čímž inhibuje aktivaci antiapoptoických genů, jejichž exprese je regulována transkripčním faktorem NF- κ B (Hideshima *et al.*, 2009).



Obr. 10: Struktura 26S proteazomu (převzato a upraveno z Bladé *et al.*, 2005).

L-Asparagináza je cytostatikem využívaným při léčbě lymfoblastické leukémie. Jedná se o enzym štěpící asparagin. Asparagin je neesenciální aminokyselina, která je v nenádorových buňkách syntetizována z kyseliny asparagové za katalýzy asparaginsyntetázou nebo je přijímána z potravy. V nádorových buňkách asparagin buďto zcela chybí, nebo je přítomen jen ve velmi omezeném množství. Působením L-asparaginázy tedy dochází v nádorových buňkách k vyčerpání intracelulárních zásob asparaginu, což se projevuje značně sníženou syntézou proteinů, DNA a RNA, potlačením růstu buněk a indukci apoptózy (Muller a Boos, 1998).

Některá cytostatika mají charakter antibiotik. Jedná se například o aktinomycin D, bleomycin či antracyklinová cytostatika. Aktinomycin D se podobně jako strukturální analogy inkorporuje do molekuly DNA, čímž narušuje průběh transkripce. Bleomycin indukuje tvorbu zvýšeného množství volných radikálů poškozujících molekulu DNA. Akumulace poškození DNA vede k zástavě buněčného cyklu v G2 fázi. Cytotoxicita antracyklinů spočívá kromě již zmíněných mechanismů i v jejich schopnosti inhibovat topoizomerázu II (Bukowski *et al.*, 2020).

3.6 Léková rezistence

Chemoterapie se potýká s řadou komplikací, které negativně ovlivňují její účinnost. Jednou z těchto komplikací je schopnost nádorových buněk odolávat cytotoxickým účinkům používaných chemoterapeutik. Rozlišujeme primární a sekundární rezistenci. Jsou-li nádorové buňky rezistentní vůči danému cytostatiku již při prvním podání, jedná se o primární rezistenci. Pokud se však nádorové buňky stávají rezistentními až v průběhu chemoterapie, což vede k postupnému snižování její účinnosti, hovoříme o sekundární (získané) rezistenci (Noskova *et al.*, 2000a).

Jedním z možných řešení vzniku rezistence proti konkrétnímu cytostatiku je administrace několika typů cytostatik s rozdílným mechanismem účinku současně. Tento postup se označuje jako polychemoterapie (Crofton, 1959). V mnohých případech však dochází k rozvoji zkřížené rezistence, při níž je buňka rezistentní vůči dvěma strukturně příbuzným cytostatikům současně. Popřípadě může dojít k rozvoji mnohočetné lékové rezistence (MDR), kdy je buňka současně rezistentní proti několika strukturně nepříbuzným cytostatikům, které se navíc liší svým mechanismem účinku.

Vznik lékové rezistence je spojen se změnou cytokinetiky, farmakokinetiky a strukturálními a funkčními změnami buňky. Ke změně cytokinetiky dochází především v průběhu růstu nádoru, při němž většina buněk přechází do klidové G0 fáze. Jak již bylo zmíněno dříve, vykazují buňky v klidové fázi podstatně nižší citlivost ke konvenční chemoterapii než aktivně se dělící buňky. Růst nádoru je rovněž doprovázen akumulací spontánních mutací, které zvyšují heterogenitu buněčné populace, čímž vznikají skupiny klonů charakterizované odlišnou citlivostí k léčbě. Díky tomu dochází k selekci a množení rezistentní frakce buněk, která je proti léčbě odolná.

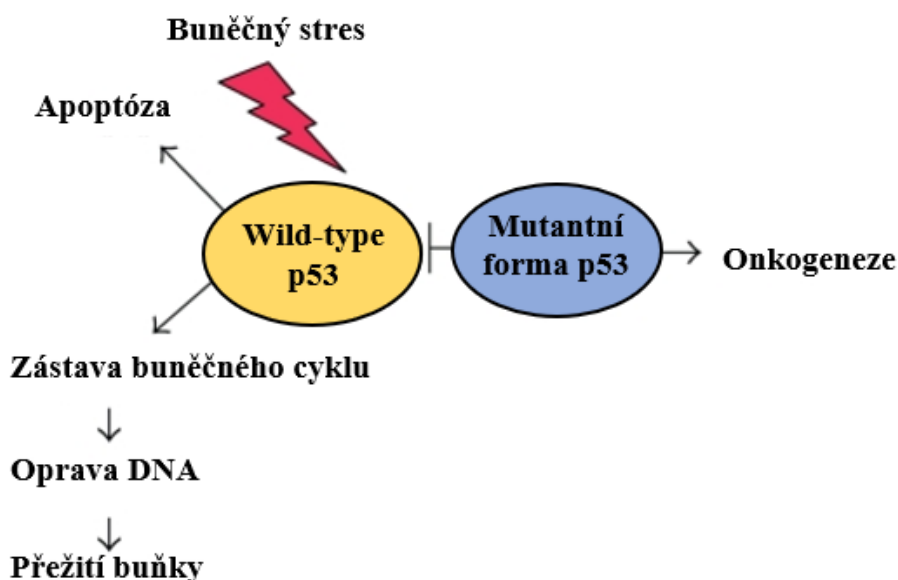
Farmakokinetika je pozměněna zrychlením biotransformace xenobiotik, snížením resorpce léčiv a urychleným vylučováním či inaktivací léčiv.

Strukturální a funkční změny buňky jsou spojeny s ovlivněním přenosu cytostatika přes buněčnou membránu, sníženou nebo zvýšenou aktivitou či expresí enzymů, zvýšenou intenzitou oprav DNA a změnou v distribuci cytostatika v rámci buňky (Nosková *et al.*, 2000a).

3.6.1 Mutace genu TP53

Nejčastěji mutovaným genem v lidských nádorových buňkách je nádorový supresorový gen *TP53* (Szymańska a Hainaut, 2003). Dojde-li mutací *TP53* ke ztrátě jeho kontrolní aktivity, bude se buňka kontinuálně replikovat nezávisle na rozsahu poškození DNA způsobeném

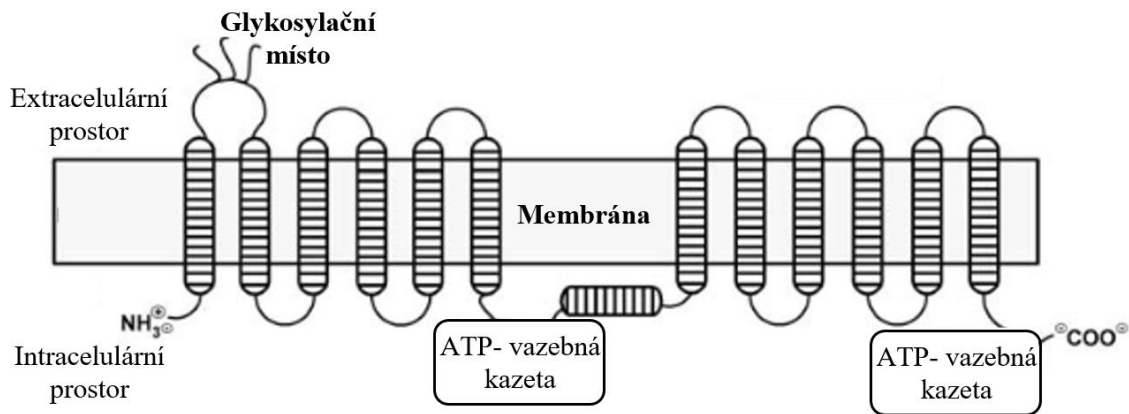
konkrétním cytostatikem, čímž se vůči němu stává rezistentním (Mantovani *et al.*, 2019). V nádorových buňkách vykazujících MDR fenotyp je běžná zvýšená exprese genu *mdr1* kódujícího P-glykoprotein (Pgp). Jedná se o membránový protein fungující jako efluxní pumpa, která brání akumulaci cytostatik uvnitř buňky (Liu *et al.*, 2010). Exprese genu *mdr1* je regulována p53, přičemž wild-type p53 inhibuje *mdr1* promotor, zatímco jeho mutantní forma jej aktivuje (Chin *et al.*, 1992).



Obr. 11: Mutantní forma p53 vazbou na wild-type p53 inhibuje jeho tumor supresorovou funkci, následkem čehož dochází k onkogenezi (převzato a upraveno z Ozaki a Nakagawara, 2011).

3.6.2 P-glykoprotein

P-glykoprotein (Pgp) patří do superrodiny ABC-transportních proteinů. Jedná se o skupinu proteinů plazmatické membrány zodpovídající za transport cytotoxických látek ven z buňky, které ve své struktuře obsahují ATP-vazebnou kazetu (ATP-binding cassette) (Higgins, 1992). Kromě toho, že funguje jako ATP-dependentní membránová pumpa, se Pgp rovněž podílí na regulaci iontových kanálů. Byla prokázána zvýšená aktivita chloridového kanálu způsobená zvýšenou expresí Pgp. (Abraham *et al.*, 1993). Zvýšená exprese Pgp je kromě mutací v genu *TP53* způsobena výskytem mutací či amplifikací samotného *mdr1* genu (Riordan *et al.*, 1985). Zvýšená exprese může být dále způsobena výskytem jednonukleotidových polymorfismů či epigenetickými modifikacemi (Genovese *et al.*, 2017).



Obr. 12: Struktura P-glykoproteinu (převzato a upraveno z Hatok *et al.*, 2006).

3.6.3 Mutace chimérického genu BCR-ABL

V případě chronické myeloidní leukémie je rezistence vůči inhibitorům BCR-ABL tyrosinové kinázy, mezi něž patří například imatinib, způsobena mutacemi chimérického genu *BCR-ABL* lokalizovaného na Filadelfském chromozomu. Za standardních podmínek lze indukovat apoptózu nádorových buněk podáním imatinibu, který blokuje vazbu ATP na BCR-ABL kinázový receptor. Dojde-li výskytem mutací ve fúzním genu *BCR-ABL* ke změně struktury domény vážící cytostatika, stává se nádorová buňka vůči cytostatikům cíleným na tuto doménu rezistentní (Greenfield *et al.*, 2019; Chandrasekhar *et al.*, 2019).

3.6.4 Mutace genů kódujících topoizomerázy

Některá cytostatika, jako je například doxorubicin či irinotekan, fungují jako inhibitory topoizomerázy I a topoizomerázy II. Dojde-li prostřednictvím mutací ke změně primární struktury těchto enzymů či snížení jejich intracelulární hladiny, stávají se topoizomerázy nepřístupné k vazbě jejich inhibitorů. Cytostatický účinek inhibitorů topoizomeráz značně závisí na koncentraci aktivních molekul topoizomerázy, a proto vede snížení jejich intracelulární hladiny k rozvoji lékové rezistence (Nosková *et al.*, 2000b).

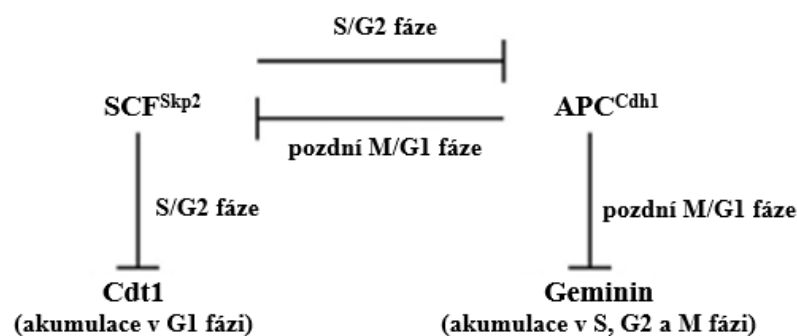
3.7 Metody studia buněčného cyklu

3.7.1 FUCCI systém

FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) je metodika využívaná k vizualizaci a identifikaci jednotlivých fází buněčného cyklu v reálném čase. FUCCI systém využívá k vizualizaci buněčného cyklu dvou fluorescenčně značených substrátů E3 ligáz: Cdt1 a gemininu (Sakaue-Sawano *et al.*, 2008).

Cdt1-licenční faktor zodpovídá za to, aby replikace DNA proběhla v průběhu buněčného cyklu pouze jednou. Cdt1 se v buňce hromadí v průběhu G1 fáze a jeho odbourávání je zahájeno ihned po započetí S fáze. Naopak geminin se hromadí v buňce v průběhu S, G2 a M fáze, zatímco během G1 fáze dochází k jeho degradaci (Nishitani *et al.*, 2004). Cdt1 tvoří v pozdní G1 fázi společně s MCM2-7 helikázou prereplikační komplex, jehož sestavení je regulováno gemininem, který vazbou na Cdt1 mění jeho stechiometrii. Díky této regulaci je zajištěno, že proběhne replikace DNA v průběhu buněčného cyklu pouze jednou (Kerns *et al.*, 2007).

Fluorescenčně značené substráty jsou degradovány ubikvitin E3 ligázami: APC/C^{Cdh1} a SCF^{Skp2}. Geminin je degradován APC/C^{Cdh1} ubikvitin ligázou, která je aktivní v pozdní M fázi a G1 fázi, zatímco Cdt1 je degradován SCF^{Skp2} ligázou, která je aktivní během S fáze a G2 fáze (Arias *et al.*, 2007). Podobně jako fluorescenčně značené substráty i ubikvitin E3 ligázy během buněčného cyklu recipročně oscilují, jelikož je SCF^{Skp2} současně substrátem pro APC/C^{Cdh1} (Wei *et al.*, 2004).

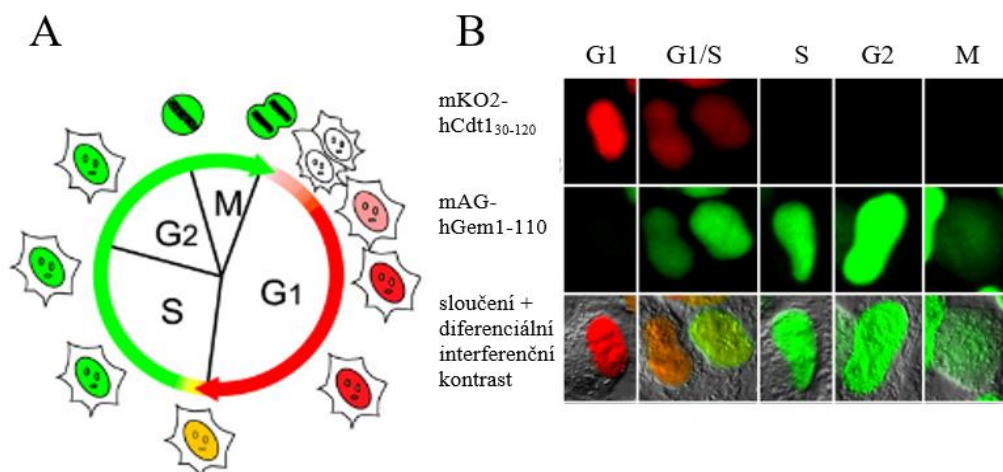


Obr. 13: Reciproká oscilace hladiny Cdt1 a gemininu (převzato a upraveno ze Sakaue-Sawano *et al.*, 2008).

Pro přípravu fluorescenčně značeného lidského Cdt1 byla připravena řada delečních konstruktů. Bylo zjištěno, že N-terminální fragment hCdt1 (hCdt1₃₀₋₁₂₀) si v rámci buněčného cyklu zachovává stejnou oscilaci jako původní hCdt1, jelikož je rovněž degradován v S a G2

fázi. Fragment obsahuje Cy motiv, dlouhý 68 až 70 aminokyselin, nezbytný pro proteozomální degradaci zprostředkovanou SCF^{Skp2} ubikvitin ligázou a postrádá geminin-vazebnou doménu a PIP box (Nishitani *et al.*, 2006). Právě absence PIP boxu je nezbytnou podmínkou pro přípravu funkčního G1 senzoru (Sakaue-Sawano *et al.*, 2008). Pro přípravu S/G2/M senzoru byl využit N-terminální fragment lidského gemininu (hGem₁₋₁₁₀), který postrádá Cdt1 vazebnou doménu. Fragment hCdt1₃₀₋₁₂₀ byl fúzován s fluorescenčním proteinem mKO2 (Kusabira Orange) emitujícím červené světlo za vzniku fúzního proteinu mKO2-hCdt1₃₀₋₁₂₀ a fragment hGem₁₋₁₁₀ s fluorescenčním proteinem mAG (Azami Green) emitujícím zelené světlo za vzniku fúzního proteinu mAG-hGem₁₋₁₁₀ (Lee *et al.*, 2004; Sakaue-Sawano *et al.*, 2008).

Buněčné jádro je emitací fluorescence zbarveno do zelena, červená či žluta v závislosti na hladině gemininu a Cdt1 v konkrétní fázi buněčného cyklu. Buňky s červeným jádrem se nacházejí v G1 fázi, buňky se zeleným jádrem v pozdní S, G2 a M fázi a buňky se žlutým jádrem v ranné S fázi, kdy je v buňce současně přítomen Cdt1 i geminin (Sakaue-Sawano *et al.*, 2008).



Obr. 14: Akumulace FUCCI fluorescenčních prób v buněčném jádře.

Fluorescenčně značené substráty zbarvují jádra v pozdní S/G2/M fázi do zelena a jádra v G1 fázi do červená (A). Fotografie buněk HeLa z fluorescenčního mikroskopu (B) (převzato a upraveno ze Sakaue-Sawano *et al.*, 2008).

FUCCI systém umožňuje na rozdíl od jiných metod analýzy buněčného cyklu vizualizovat postup buněk buněčným cyklem ve skutečném čase. Metodika FUCCI rovněž prokázala, že fáze buněčného cyklu, ve které se buňky v solidním nádoru nacházejí, rozhoduje o účinnosti chemoterapie. Metodiku FUCCI lze tedy kromě vizualizace buněčného cyklu využít i k vývoji nových forem chemoterapie solidních nádorů (Yano *et al.*, 2020).

V dnešní době existuje již několik variant původního FUCCI systému. FUCCI2 nabízí

ve srovnání s původní variantou vyšší barevný kontrast. Červené záření je v tomto případě emitováno fluorescenčním proteinem mCherry fúzovaným s N-terminálním fragmentem Cdt1 a zelené záření fluorescenčním proteinem mVenus fúzovaným s N-terminálním fragmentem gemininu (Abe *et al.*, 2013). Systém FUCCI4 umožňuje jasnou vizualizaci všech čtyř fází buněčného cyklu. Specifické vizualizace S fáze je dosaženo fúzí proteinu mTurquoise emitujícího modré záření s S fází specifickým stem-loop binding proteinem. V případě M fáze je specifická vizualizace zajištěná fúzí fluorescenčního proteinu mMaroon s histonem H-1.0, který je využíván pro svou schopnost vizualizovat v průběhu mitózy kondenzaci chromatinu (Bajar *et al.*, 2016). Jedna z variant FUCCI systému využívá konstrukt složeného z fluorescenčního proteinu mVenus a defektní formy p27 k vizualizaci přechodu buňky z G0 do G1 fáze (Oki *et al.*, 2014).

FUCCI buněčné linie jsou nejčastěji připravovány metodou lentivirové transfekce, kdy jsou jako vektory k přenosu genetické informace do hostitelské eukaryotní buňky využívány rekombinantní lentiviry obsahující genetické elementy HIV viru (human immunodeficiency virus). Lentiviry využívají hostitelského enzymatického aparátu k amplifikaci konkrétního transgenu, který je následně integrován do hostitelského genomu. (Elegheert *et al.*, 2018). V dnešní době jsou již dostupné plazmidy obsahující oba FUCCI transgeny, tedy mKO2-hCdt1₃₀₋₁₂₀ a mAG-hGem₁₋₁₁₀, což značně usnadňuje a urychluje proces lentivirové transfekce. Jedná se například o plazmid pBOB-EF1-FastFUCCI-Puro, který byl v této bakalářské práci využit pro přípravu reportérové buněčné linie U2OS-FUCCI pro potřeby obrazové analýzy (Koh *et al.*, 2017).

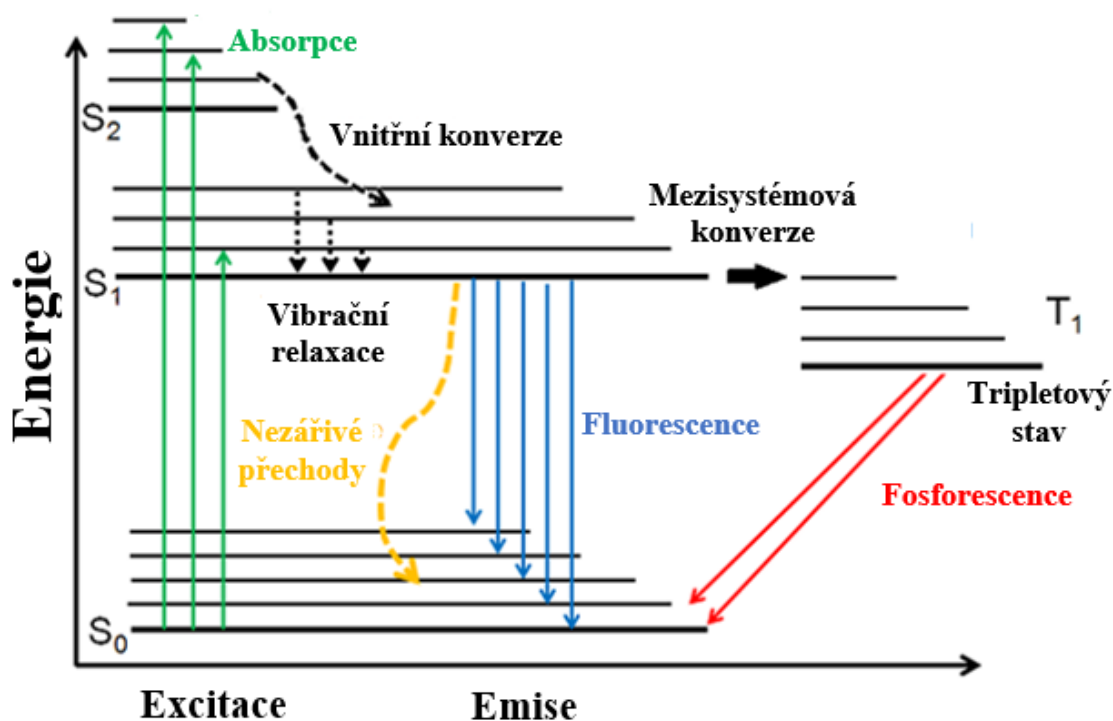
3.7.2 Fluorescenční mikroskopie

Při fluorescenci dochází k absorpci excitačního záření, které excituje elektron do energeticky bohatšího orbitalu. V rámci femtosekund se elektron vrací z excitovaného stavu zpět do stavu základního za současného uvolnění energie ve formě emisního záření. Vlnová délka excitačního záření je zpravidla kratší či rovna vlnové délce emisního záření, Rozdíl vlnových délek, respektive energií, excitačního a emisního záření se označuje jako Stokesův posun (Lichtman a Conchello, 2005).

Molekuly vykazující fluorescenci se nazývají fluorofory. Fluorescenci vyazuje i řada přirozeně se v buňce vyskytujících látek. V tomto případě hovoříme o vlastní fluorescenci neboli autofluorescenci. Pro fluorescenční mikroskopii se využívá převážně syntetických fluoroforů aromatického charakteru, které se váží na rozličné struktury vzorku, čímž je vizualizují. Látky aromatického charakteru se využívají především díky přítomnosti

delokalizovaných elektronů, k jejichž excitaci postačuje relativně malé množství energie (Lichtman a Conchello, 2005). Jednotlivé fluorofory jsou charakterizovány excitačními a emisními spektry. Excitační spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emisního záření a emisní spektrum závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitačního záření (Zhadin a Alfano, 1998).

Elektronové stavy molekuly detailněji popisuje Jablonského diagram. Fluorofor se nachází buďto v singletovém stavu, v němž elektrony s opačným spinem tvoří pár v rámci jednoho orbitalu, čímž dochází k vyrušení jejich magnetických momentů, či v tripletovém stavu, v němž má elektron následkem excitace do energeticky bohatšího orbitalu opačný spin než elektron, se kterým původně tvořil elektronový pár. Díky tomu je směr magnetického momentu této konfigurace paralelní, antiparalelní či kolmý ke směru magnetického pole. Absorbicí záření je elektron excitován do energeticky bohatšího orbitalu, následkem čehož přechází molekula fluoroforu ze základního do excitovaného stavu o vyšší energii. Do základního stavu se molekula vrací prostřednictvím zářivých přechodů, jako je například fluorescence či fosforescence, či nezářivých přechodů, jako je vibrační relaxace či mezisystémová a vnitřní konverze (Lichtman a Conchello, 2005).



Obr. 15: Jablonského diagram se znázorněným principem vzniku zářivých a nezářivých přechodů (převzato a upraveno ze Schvelzer *et al.*, 2021).

3.7.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie představuje velmi účinnou a všestrannou metodu využívanou při kvantitativní a kvalitativní analýze na úrovni jednotlivých buněk či jiných mikroskopických částic (Schmit *et al.* 2021).

Průtokový cytometr se skládá z fluidiky, optiky a elektroniky. Fluidika zahrnuje plášťovou tekutinu, kterou jsou částice studovaného vzorku ve formě suspenze unášeny jedna po druhé skrze excitační optiku složenou ze série laserů (McKinnon, 2018). Díky rozdílům v tlaku a rychlosti proudění vzorku a plášťové tekutiny procházejí částice skrze excitační optiku jednotlivě. Jedná se o techniku tzv. hydrodynamické fokusace. (Frankowski *et al.*, 2013). Světelný signál emitovaný částicí při průchodu laserem je zachycen sběrnou optikou složenou z fotonásobičů, fotodiod a sady dichroických filtrů. Světlo je po dopadu na detektor převedeno do formy digitálního signálu, který lze vyhodnotit s využitím počítače. Data jsou nejčastěji zaznamenávána v podobě dvouparametrového histogramu (McKinnon 2018).

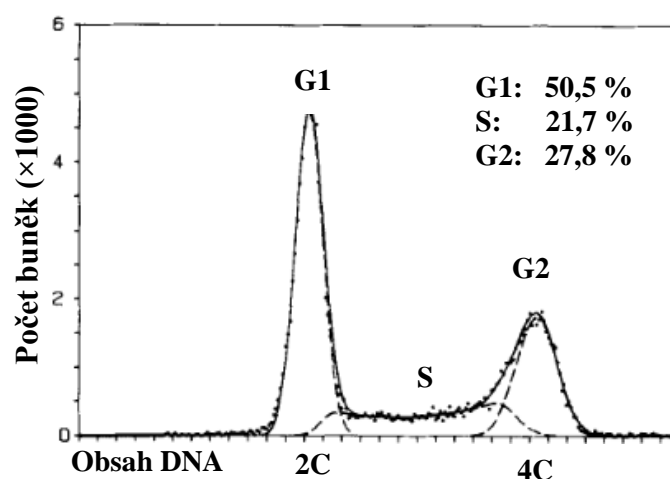
Při průchodu částice laserem je detektorem ve viditelné části spektra zaznamenáván přímý rozptyl, jehož intenzita je úměrná velikosti částice, a boční rozptyl, který odráží granularitu a vnitřní komplexitu analyzovaných částic (Drescher *et al.*, 2021). Vzorky mohou být rovněž označeny fluorescenčními barvivy vážícími se na molekulu DNA (propidium jodid, DAPI, Hoechst 33342) či fluorescenčně značenými protilátkami. Další možností značení je transfekce buněk a následná exprese fluorescenčních proteinů, jako je například GFP, mCherry či mOrange (McKinnon 2018).

Metodu průtokové cytometrie lze využít ke stanovení obsahu DNA, kdy je k suspenzi permeabilizovaných buněk či izolovaných jader nejdříve přidáno fluorescenční barvivo stechiometricky se vážící na molekulu DNA, jako je například propidium jodid, Hoechst 33342 či DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) (Nunez, 2001; Darzynkiewicz *et al.*, 2017). Následně je v průtokovém cytometru změřena intenzita fluorescence značeného materiálu. Principem metody je přímá úměra mezi množstvím inkorporovaného barviva a obsahem DNA ve vzorku. Intenzita emitovaného fluorescenčního signálu je tedy přímo úměrná obsahu DNA. Ke stanovení obsahu DNA je nezbytné srovnání výsledků měření se standardem o známém obsahu DNA. Nejčastěji využívanými standardy jsou kuřecí erytrocyty či lidské leukocyty. Obsah jaderné DNA je určen z poměru polohy vrcholu (neboli píku, z anglického *peak*) standardu a vzorku DNA (Nunez, 2001).

Při stanovování velikosti genomu a obsahu DNA se pracuje s tzv. C-hodnotou, která je definována jako obsah DNA jedné haploidní sady chromozomů (Doležel, 1991). Množství DNA lze rovněž vyjádřit absolutně jakožto počet páru bází či hmotnost v pikogramech, přičemž

1 pg DNA představuje 978 megapárů bází. (Doležel *et al.*, 2003).

Na základě obsahu DNA lze identifikovat jednotlivé fáze buněčného cyklu. V průběhu G1 fáze je obsah jaderné DNA roven hodnotě 2C. V průběhu S fáze je tento obsah zdvojnásoben na hodnotu 4C. Během G2 fáze je obsah DNA udržován na hodnotě 4C. Po G2 fázi následuje mitóza, při níž dochází ke vzniku dvou dceřiných buněk, každé s obsahem DNA 2C (Doležel, 1991). S využitím příslušného softwaru lze stanovit procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Na rozdíl od metodiky FUCCI však tento postup neumožňuje odlišení M a G2 fáze, které jsou charakterizovány stejným obsahem jaderné DNA (Nunez, 2001). Buňky v M fázi lze identifikovat například s využitím specifických protilátek anti-phospho(Ser10)-histone H3 konjugovaných s fluorochromy, které se váží na histon H3 fosforylovaný v pozici Ser10. Fosforylace histonu H3 souvisí s kondenzací chromozomů v průběhu mitózy, díky čemuž ji lze využít jako spolehlivý mitotický marker pro identifikaci a kvantifikaci buněk nacházejících se v M fázi (Vingon *et al.*, 2013).



Obr. 16: Histogram distribuce obsahu DNA jader *Vicia faba* L. izolovaných z kořenové čepičky (převzato a upraveno z Doležel, 1991).

Jak již bylo zmíněno dříve, představuje průtoková cytometrie všestrannou metodu, která má kromě studia buněčného cyklu celou řadu dalších uplatnění. Jednou z možných aplikací je třídění buněk pro další analýzu na základě předem zvolených parametrů. Dále lze průtokovou cytometrii využít k imunofenotypizaci, při níž jsou v buněčných populacích imunofluorescenčně prokazovány rozličné antigeny na povrchu buněk. V neposlední řadě lze průtokovou cytometrii využít ke studiu exprese proteinů, při níž jsou buňky transfekovány plazmidem obsahujícím kromě promotoru a genu, jehož exprese má být studována, gen kódující fluorescenční protein (GFP, mCherry, mRubby), který plní roli indikátoru exprese studovaného genu (McKinnon, 2008).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

K experimentům byla využita buněčná linie U2OS (HTB-96, ATCC) odvozená z lidského osteosarkomu a lentivirem transfekovaná buněčná linie U2OS-FUCCI připravená za pomoci plazmidu pBOB-EF1-FastFUCCI-Puro.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Tab. 3: Použité chemikálie

Název:	Výrobce:	Katalogové číslo:
DMEM	Lonza	12-604F
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich	D8418
TrypLE™ Express	Gibco™	12604-054
Puromycin	Gibco™	A1113803-03
Fetální bovinní sérum (FBS)	Gibco™	10270
Etoposide Teva	Teva Pharmaceuticals	0011389
Gemcitabin Ebewe	EBEWE Pharma	0160676
Methotrexat Lachema 1000	PLIVA-Lachema	0093965
Oxaliqid	Ebewe Pharma	0154833
Mitomycin-C Kyowa	NORDIC Pharma	0052547
Doxorubicin Pharmagen	PHARMAGEN CZ	0204622
Irinotecan Pharmagen	PHARMAGEN CZ	0197099
Bortezomib	Sigma Aldrich	5043140001
Palbociclib	Sigma Aldrich	PZ03835-MG
Bleomycin Accord	Accord Healthcare Polska	0241296
Mitoxantrone dihydrochloride	Sigma Aldrich	M6545-10MG
5-Fluoruracil	Sigma Aldrich	F6627-10G
Dexamethason	Sigma Aldrich	D4902-25MG
Litalir	Bristol-Myers Squibb	0057345
Paclitaxel Mylan	Mylan	0136246
Daunoblastina	Pfizer	96122
Vincristine Teva	Teva Pharmaceuticals	0011420
Aktinomycin D	APExBIO	A4448

Pokračování **Tab. 3:** Použité chemikálie

Teniposide	Sigma Aldrich	SML0609-10MG
PMS (phenazine methosulfate)	Sigma Aldrich	P9625
CellTiter96 Aqueous MTS Reagent Powder	Promega	G1111
Denaturovaný ethanol	VWR	85824.360
Chlorid sodný (NaCl)	MikroChem	7647-14-5
Chlorid draselný (KCl)	Lach:ner	30076-APO
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Lach:ner	30016-APO,
Hydroxid sodný (NaOH)	Sigma Aldrich	06203
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydát (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	Lach:ner	30061-APO
Kyselina chlorovodíková (HCl)	mikroCHEM	7647-01-0
Deionizovaná voda	-	-

Tab. 4: Použité roztoky a jejich příprava

Název roztoku:	Příprava:
10× PBS	80 g NaCl 2 g KCl 32,1 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ Chemikálie rozpustit v 800 ml sterilní vody (pro účely laboratoře tkáňových kultur), pH upravit na 6,8-7,2 pomocí 1mol·l ⁻¹ NaOH či HCl, doplnit do výsledného objemu 1 l a sterilizovat autoklávováním při 121 °C. Skladovat při 4 °C.
1× PBS	100 ml 10× PBS doplnit do výsledného objemu 1000 ml deionizovanou vodou. Skladovat při 4 °C.
10mol·l ⁻¹ roztok irinotekanu	293 µl Irinotecan Pharmagen doplnit do 1 ml DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok gemcitabinu	66 µl Gemcitabin Ebewe doplnit do 1 ml DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok etoposidu	294 µl Etoposide Teva doplnit do 1 ml DMSO

Pokračování **Tab. 4:** Použité roztoky a jejich příprava

10mol·l ⁻¹ roztok methotrexátu	91 µl Methotrexat Lachema 1000 doplnit do 1 ml DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok oxaliplatinu	794 µl Oxaliquid doplnit do 1 ml DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok mitomycinu C	1,7 µ µl Mitomycin-C Kyowa doplnit do 1 ml DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok doxorubicinu	5,435 mg Doxorubicin Pharmagen doplnit do 1 ml DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok taxolu	142 µl Paclitaxel Mylan doplnit do 1 ml DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok daunorubicinu	5,275 mg Daunoblastina doplnit do 1 ml DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok dexamethasonu	3,300 mg Dexamethasone doplnit do 841 µl DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok hydroxyurey	0,750 mg Litalir doplnit 986 µl destilované H ₂ O
10mol·l ⁻¹ roztok mitoxantronu	1,600 mg Mitoxantrone dihydrochloride doplnit do 362,4 µl DMSO
10mol·l ⁻¹ roztok 5-fluoruracilu	1,320 mg 5-Fluoruracil doplnit do 1015 µl DMSO
70µmol·l ⁻¹ roztok bleomycinu	200 µl Bleomycin Accord doplnit do 200 µl DMSO
0,1µmol·l ⁻¹ roztok vinkristinu	83 µl Vincristine Teva doplnit do 1 ml DMSO
15mol·l ⁻¹ roztok PMS	Rozpustit PMS v 1× PBS. Skladovat při teplotě -20°C.
2mg·l ⁻¹ roztok MTS	Ve světluvzdorné nádobě rozpustit MTS v 1× PBS. Roztok míchat na magnetické míchače, dokud není MTS zcela rozpuštěn. Upravit pH na 6,0 až 6,5 pomocí 1mol·l ⁻¹ HCl. Sterilizovat přefiltrováním přes filtr s velikostí pórů 0,22 µm do sterilní světluvzdorné nádoby a skladovat při teplotě -20°C.
MTS/PMS roztok	Smíchat 1 díl 15mM PMS s 99 díly 2mg/ml MTS. Míchat na magnetické míchače. Přípravit těsně před použitím.
70% ethanol	Smíchat 7 dílů 100% ethanolu se 3 díly deionizované vody. Skladovat při pokojové teplotě.

4.3 Použité přístroje

- Centrifuga 5810R (Eppendorf)
- Počítačka buněk Vi-CELL XR (Beckman Coulter)
- Vodní lázeň WNB (Mettler)
- Inverzní mikroskop IX51 (Olympus)
- Přesná váha 420-3F (KERN)
- Kapalinový manipulátor Echo 550 (LabCyte)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
- pH metr inoLab pH 7110 (WTW)
- Multidrop Combi (Thermo Fisher Scientific)
- Magnetická míchačka MSH 300 (Biosan)
- Pipetovací nástavec Pipetus (Hirschmann)
- Automatický konfokální mikroskop Cell Voyager CV8000 (Yokogawa)
- EnVision 2105 Multimode Plate Reader (PerkinElmer)
- Laminární box MSC Advantage (Thermo Fisher Scientific)
- Mraznička Ultra-Low Temperature Freezer Innova U725 (Eppendorf)
- Inkubátor s CO₂ atmosférou Heracell™ 150i (Thermo Fisher Scientific)

4.4 Kultivace buněčných linií

Obě adherentní buněčné linie byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's MODIFIED Eagle Medium) s přidávkou puromycinu a 10% FBS. Kultivace probíhala v kultivačních lahvích T-75 (Techno Plastic Products) v inkubátoru s 5% obsahem CO₂, 95% vlhkostí a při teplotě 37°C.

4.5 Příprava kultivačního média

Kultivační médium bylo připraveno za sterilních podmínek ve flowboxu MSC Advantage (Thermo Fisher Scientific). Nejdříve bylo smícháno 450 ml média DMEM (Lonza) s 50 ml fétálního bovinního séra (Gibco™) a 2,5 µl puromycinu (Gibco™). Takto připravené médium bylo následně přefiltrováno přes filtr 500 rapid-Filtermax (Techno Plastic Products) napojeným na vývěvu do sterilní plastové nádoby. Přefiltrované médium bylo přelito do sterilní skleněné lahve, uzavřeno sterilním víčkem se septem, které bylo následně obaleno alobalem a dezinfikováno 70% ethanolem. Kultivační médium bylo skladováno v chladicí místnosti při 4 °C.

4.6 Pasážování buněčných linií

Buněčnou linii bylo potřeba dvakrát týdně, či dle potřeby, pasážovat. Před každým pasážováním byly buňky pozorovány pod inverzním mikroskopem IX51 (Olympus). Pasáž byla provedena v případě, přesahovala-li konfluence hodnotu 80 %. Veškeré chemikálie nezbytné pro pasážování byly nejdříve ohřáty ve vodní lázni WNB (Mettler) na teplotu 37°C. Pasážování buněk probíhalo ve sterilním prostředí flowboxu MSC Advantage (Thermo Fisher Scientific).

Z kultivační lahve bylo nejdříve do odpadní nádoby slito staré médium. Kultivační lahev byla následně propláchnuta dvakrát 5 ml roztoku 1× PBS. Po propláchnutí byly do kultivační lahve přidány 2 ml TrypLE™ Express (Gibco™). Kultivační lahev byla ponechána v inkubátoru Heracell™ 150i (Thermo Fisher Scientific) po dobu pěti minut, čímž došlo k enzymatickému uvolnění buněk z povrchu kultivační lahve. Úspěšnost trypsinizace byla potvrzena pozorováním buněk pomocí inverzního mikroskopu IX51. TrypLE™ express byl neutralizován přidáním 5 ml média, pomocí kterého byl vnitřní povrch kultivační lahve důkladně opláchnut. V závislosti na hodnotě konfluence byl požadovaný objem buněčné suspenze doplněn živným médiem do finálního objemu 15 ml.

4.7 Počítání buněk

Počet buněk byl stanoven pomocí počítačky buněk Vi-CELL XR (Beckman Coulter). Do víálky bylo napipetováno 500 µl důkladně promíchané buněčné suspenze. Víálka s buněčnou suspenzí byla vložena do počítačky buněk a bylo stanoveno množství živých buněk v 1 ml buněčné suspenze.

4.8 Stanovení cytotoxicity MTS testem

4.8.1 Příprava testovaných cytostatik

MTS testem byla stanovena cytotoxicita celkem 16 různých cytostatik. Nejdříve byly připraveny do 1,5ml mikrozkušavek (Eppendorf) zásobní roztoky jednotlivých cytostatik. Jako rozpouštědlo byl použit DMSO (Sigma Aldrich) s výjimkou zásobních roztoků oxaliplatinu a hydroxyurey, kdy byla jako rozpouštědlo využita deionizovaná voda. Postup přípravy zásobních roztoků je popsán v kapitole 4.2 *Použité chemikálie, soupravy a roztoky* v tab. 4 *Použité roztoky a jejich příprava*.

4.8.2 Příprava buněčné linie U2OS pro MTS test

Den před provedením MTS testu bylo potřeba provést vyšetí buněk na 384-jamkovou pracovní destičku (LabCyte). V případě buněčné linie U2OS připadá na jamku $8 \cdot 10^2$ buněk. Bylo tedy potřeba připravit 20 ml buněčné suspenze o koncentraci $2,7 \cdot 10^4$ buněk·ml⁻¹. Z inkubátoru byly vyjmuty dvě kultivační lahve T-75. Následně bylo provedeno pasážování buněk dle postupu uvedeného v kapitole 4.6 *Pasážování buněčných linií*. Obsah zpasážovaných lahví byl slit do 50ml kónické centrifugační zkumavky (Thermo Plastic Products). 500 µl buněčné suspenze bylo odebráno do viálky a vloženo do počítačky buněk Vi-CELL XR. Početnost byla rovna $2,73 \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹. Proto bylo 198 µl buněčné suspenze doplněno DMEM médiem do objemu 20 ml.

Vyšetí buněk do 384-jamkové pracovní destičky bylo provedeno zařízením Multidrop Combi (Thermo Fisher Scientific). Buněčná suspenze byla napipetována po 30 µl do sloupců 2 až 23. Do sloupců 1 a 24 bylo napipetováno po 30 µl DMEM média. Víčko pracovní destičky bylo náležitě popsáno názvem inkubované buněčné linie a datem vyšetí. Destička byla do následujícího dne inkubována v inkubátoru Heracell™ 150i.

4.8.3 Příprava zásobních destiček

V den provedení MTS testu byla připravena zásobní 384-jamková destička pro testovanou cytostatiku a druhá destička pro použité kontroly (Labcyte). Ze zásobních roztoků cytostatik uvedených v Tab. 4 byly ředící řadou připraveny do 1,5ml mikrozkuavek (Eppendorf) desetinasobně a stonásobně zředěné roztoky. Zásobní roztoky a z nich připravené zředěné roztoky byly následně po 10 µl přepipetovány na zásobní destičku. Schéma zásobní destičky lze vidět v příloze 1.

Následně byla připravena 384-jamková zásobní destička pro použité kontroly. Jako pozitivní kontrola byl použit roztok aktinomycinu D (APExBIO) o koncentraci $0,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mitomycinu C (NORDIC Pharma) o koncentraci $30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jako negativní kontrola byl použit DMSO (Sigma Aldrich). Roztoky jednotlivých kontrol byly napipetovány po 5 µl do zásobní destičky. Schéma zásobní destičky s roztoky kontrol lze vidět v příloze 2.

4.8.4 Příprava pracovní destičky

Aby se zabránilo vzniku vzduchových bublinek, byly obě zásobní destičky stočeny na centrifuze 5810R (Eppendorf) při 1000 rpm po dobu 60 sekund.

Následně byla z inkubátoru vyjmuta pracovní destička s vyšetými buňkami. Destička

byla vložena do kapalinového manipulátoru Echo 550 (LabCyte). Pomocí Echo Dose-Response Software (LabCyte) bylo do jednotlivých jamek pracovní destičky nejdříve přeneseno po 100 nl roztoků kontrol. Následně byly na pracovní destičku přeneseny zásobní roztoky cytostatik ve specifických objemech tak, aby vznikla sestupná ředící řada o sedmi koncentracích, přičemž byla každá koncentrace testována ve dvou replikátech. Schéma takto ošetřené pracovní destičky lze vidět v příloze 3 a 4. Destička byl poté přikryta víčkem a inkubována 72 hodin v inkubátoru Heracell™ 150i.

4.8.5 MTS test a jeho vyhodnocení

Po třech dnech byla pracovní destička vyjmuta z inkubátoru. Pomocí zařízení Multidrop Combi (Thermo Fischer Scientific) byl na pracovní destičku přenesen roztok MTS/PMS (4 µl na jamku). Po přenesení roztoku MTS/PMS byla destička inkubována v inkubátoru Heracell™ 150i a pravidelně kontrolována, dokud nebylo v jamkách pozorovatelné dostatečně intenzivní fialové zbarvení.

Jakmile došlo k vývoji intenzivního fialového zbarvení, byla pracovní destička vložena do multimodálního destičkového readeru EnVision Multimode Plate Reader (PerkinElmer), v němž byla proměřena absorbance při 490 nm. Získaná data byla uložena a následně zpracována v programu Microsoft Excel.

4.9 Obrazová analýza – fluorescenční mikroskopie

4.9.1 Příprava buněčné linie U2OS-FUCCI

Pro potřeby fluorescenční mikroskopie byla využita buněčná linie U2OS-FUCCI připravená za pomoci plazmidu pBOB-EF1-FastFUCCI-Puro lentivirovou transfekcí. Kultivační lahev T-75 byla vyjmuta z inkubátoru Heracell™ 150i. Následně bylo provedeno pasážování buněk dle postupu uvedeného v kapitole 4.6 *Pasážování buněčných linií*. Obsah zpasážované kultivační lahve byl převeden do 50ml kónické centrifugační zkumavky. 500 µl buněčné suspenze bylo odebráno do viálky a vloženo do počítačky buněk Vi-CELL XR pro stanovení počtu buněk v 1 ml buněčné suspenze. Početnost byla rovna $0,882 \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹. Jelikož bylo potřeba připravit 20 ml buněčné suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk·ml⁻¹, bylo 2,27 ml buněčné suspenze v centrifugační zkumavce doplněno do 20 ml kultivačním médiem.

Do zařízení Multidrop Combi byla vložena pracovní 384-jamková Cell Carrier destička (Perkin Elmer). Do jamek sloupců 1 až 12 bylo přeneseno po 25 µl dříve připravené buněčné suspenze. Destička byla inkubována do následujícího dne v inkubátoru Heracell™ 150i.

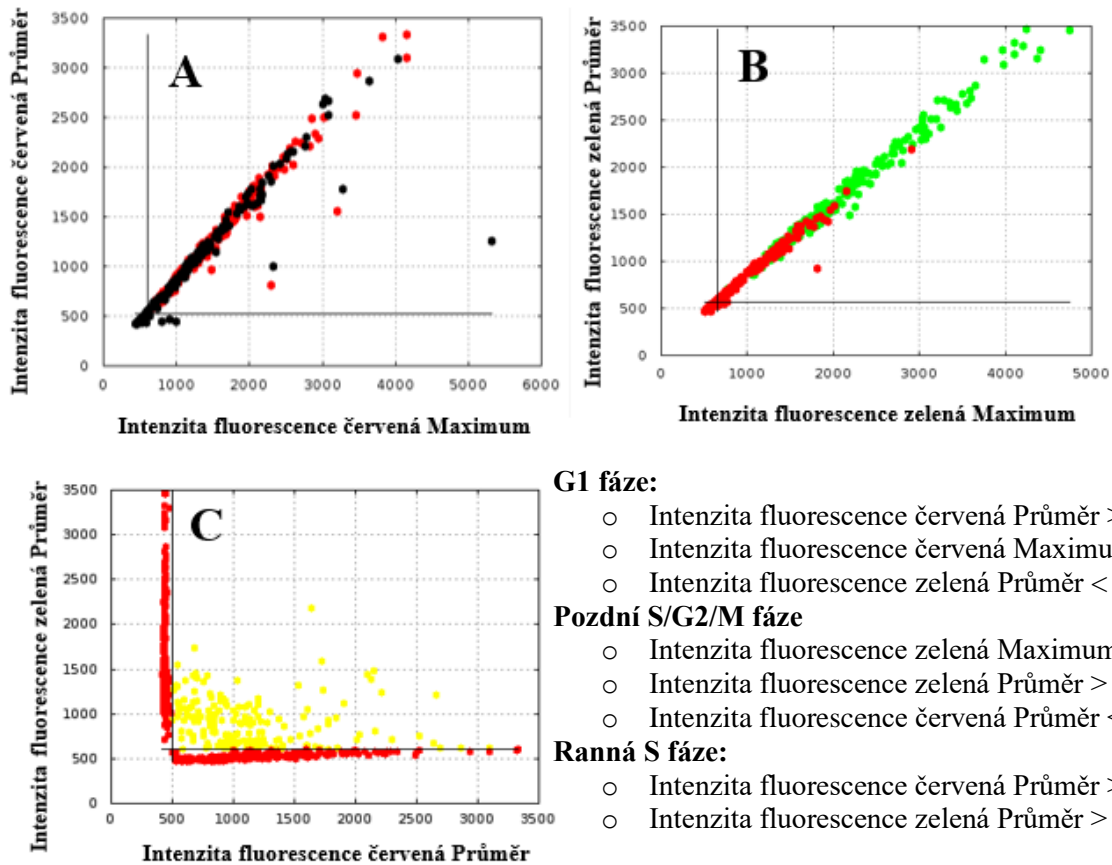
4.9.2 Ošetření buněk

Následující den byla pracovní destička s vyšetými buňkami vyjmuta z inkubátoru Heracell™ 150i a vložena do kapalinového manipulátoru Echo 550. Pro ošetření buněk byla využita zásobní destička s roztoky cytostatik připravená pro potřeby MTS testu. Dále byla připravena další zásobní 384-jamková destička (Labcyte). Do jamky B1 bylo napipetováno 10 µl roztoku palbociclibu o koncentraci 1 mmol·l⁻¹ a do jamky L1 10 µl roztoku bortezomibu o koncentraci 10 mmol·l⁻¹.

K přenosu cytostatik na pracovní destičku byl využit kapalinový manipulátor Echo 550. Přenosem specifických objemů zásobních roztoků cytostatik byly připraveny roztoky cytostatik o čtyřech rozdílných koncentracích, přičemž byla každá z koncentrací daného cytostatika testována ve dvou replikátech. V případě palbociclibu byl připraven pouze jeden roztok o požadované koncentraci a v případě bortezomibu dva roztoky o rozdílných koncentracích. Buňky vyšeté do řádku K (sloupec 1 až 8) pracovní destičky byly současně ošetřeny doxorubicinem a vinkristinem. Schéma takto ošetřené pracovní destičky lze vidět v příloze 5 a 6. Destička byla poté inkubována do následujícího dne v inkubátoru Heracell™ 150i.

4.9.3 Fluorescenční mikroskopie

Následující den byla pracovní destička vyjmuta z inkubátoru. Pro účely fluorescenční mikroskopie a pořízení mikroskopických snímků byl využit automatický konfokální fluorescenční mikroskop Cell Voyager CV8000 (Yokogawa). Sonda mAG-hGem₁₋₁₁₀ byla excitována laserem o vlnové délce 488 nm a sonda mKO2-hCdt₃₀₋₁₂₀ laserem o vlnové délce 561 nm. Fluorescence byla v případě mAG-hGem₁₋₁₁₀ snímána v rozmezí 525–550 nm a mKO2-hCdt₃₀₋₁₂₀ v rozmezí 600–637 nm. V případě třetího kanálu byla vlnová délka laseru nastavena na 405 nm a fluorescence byla snímána při 445 nm. Zvětšení objektivu bylo ve všech třech kanálech nastaveno na 20x a délka expozice na 90 ms. V každé jamce pracovní destičky byly pořízeny snímky devíti různých zorných polí, které byly následně analyzovány a vyhodnoceny pomocí softwaru Columbus (PerkinElmer). Buňky byly do jednotlivých fází buněčného cyklu rozříděny dle parametrů uvedených v obr. 17.



Obr. 17: Parametry třídění buněk do jednotlivých fází buněčného cyklu pomocí softwaru Columbus.

(A) G1 fáze, (B) pozdní S/G2/M fáze a (C) ranná S fáze.

5 VÝSLEDKY

5.1 MTS test

Míra cytotoxicity byla vyhodnocena po 72hodinové kultivaci buněčné linie U2OS odvozené z lidského osteosarkomu s roztoky testovaných cytostatik o sedmi různých koncentracích pomocí MTS testu, přičemž byly jednotlivé koncentrace roztoků cytostatik testovány ve dvou replikátech. Hodnoty IC₅₀ testovaných cytostatik jsou uvedeny v následující tabulce. U neuvedených cytostatik byly stanovené hodnoty IC₅₀ příliš vysoké, a proto nebyly výsledky obrazové analýzy v případě těchto cytostatik vyhodnoceny.

Tab. 5: Hodnoty IC₅₀ testovaných cytostatik.

Cytostatikum	IC ₅₀ [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
Irinotekan	124,738
Gemcitabin	2,811
Etoposid	6,000
Dexamethason	$6,596 \cdot 10^{-5}$
Bleomycin	$2,405 \cdot 10^{-3}$
Daunorubicin	26,662
5-Fluoruracil	$5,450 \cdot 10^{-2}$
Taxol	1,508
Vinkristin	$1,266 \cdot 10^{-5}$

5.2 Obrazová analýza

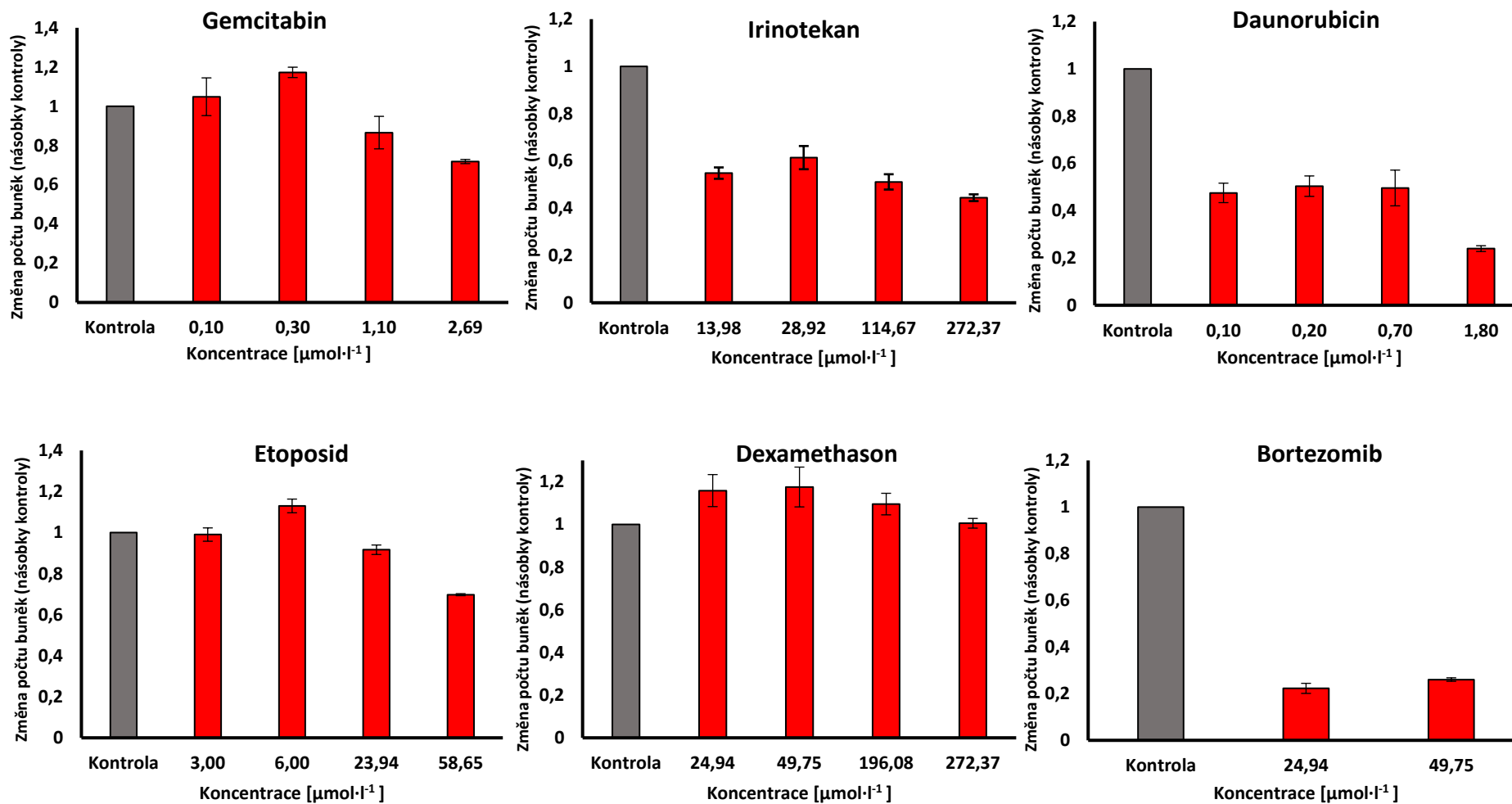
Pomocí obrazové analýzy byly získány následující parametry: změna počtu buněk, změna velikosti jádra a jeho tvaru, změna variačního koeficientu indexu kulatosti jádra, změna intenzity fluorescence emitované próbami mAG-hGem₁₋₁₁₀ a mKO2-hCdt₁₃₀₋₁₂₀ a změna procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po jednodenní inkubaci s roztoky cytostatik, přičemž byla každá koncentrace testována ve dvou replikátech, ze kterých byly vypočteny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky zmíněných parametrů. Jamky, do kterých bylo přeneseno 25 μl buněčné suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk·ml⁻¹ byly použity jako kontrola.

5.2.1 Změna počtu buněk

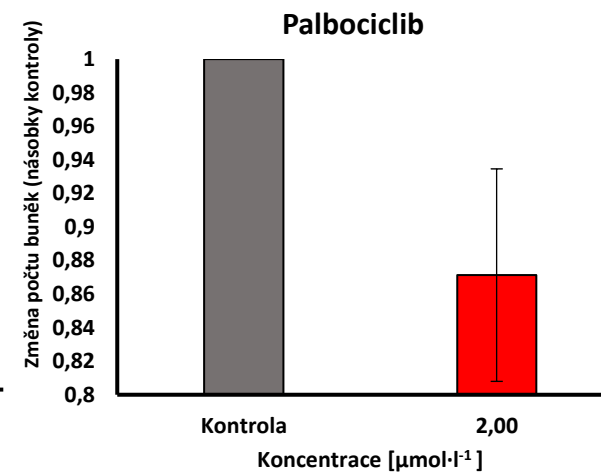
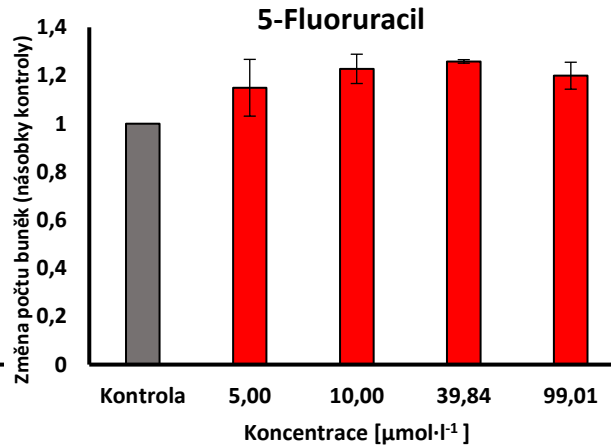
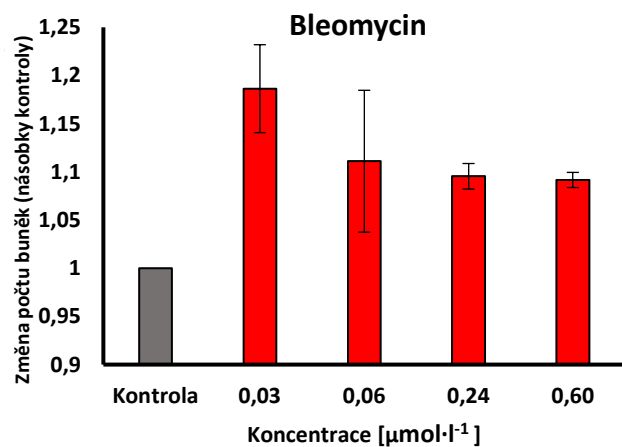
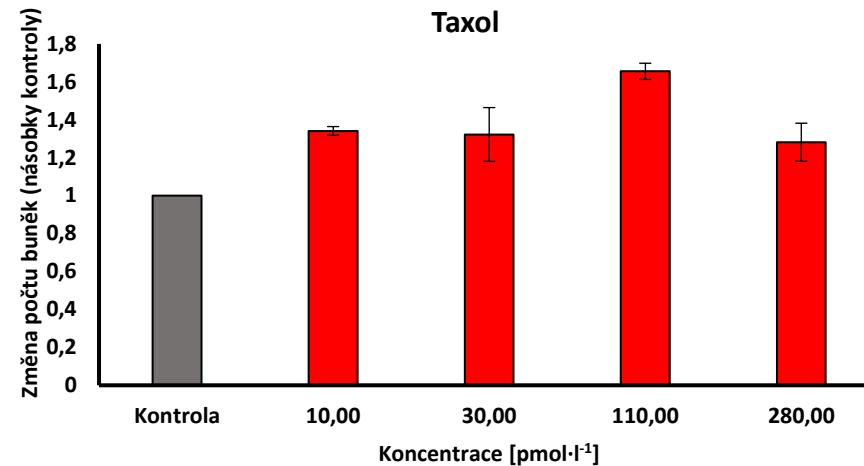
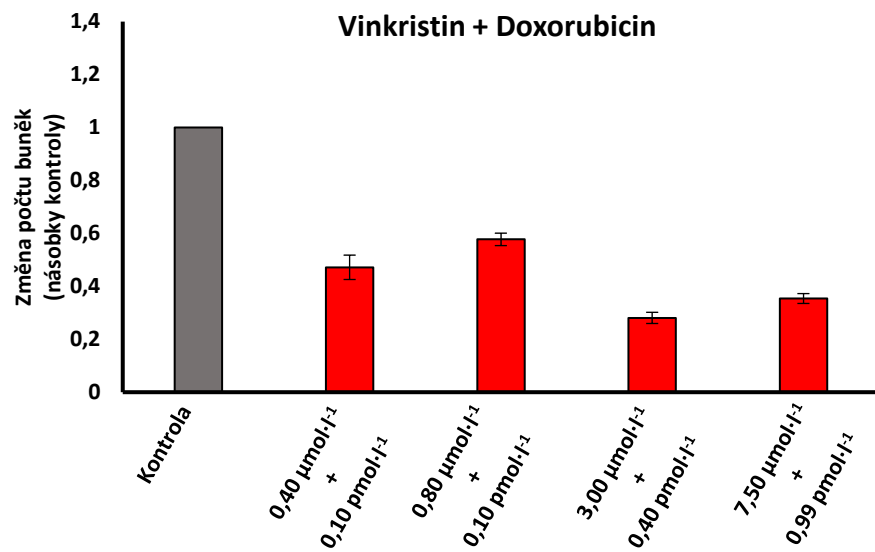
Výrazné snížení počtu buněk ve srovnání s kontrolou bylo detekováno po ošetření irinotekanem, daunorubicinem, bortezomibem a doxorubicinem s vinkristinem, méně výrazné poté po ošetření gemcitabinem, etoposidem a palbociclibem.

Naopak zásadní snížení počtu buněk ve srovnání s kontrolou nebylo detekováno v případě ošetření dexamethasonem, bleomycinem a 5-fluoruracilem.

Zdánlivý nárůst počtu buněk ve srovnání s kontrolou byl v případě taxolu pravděpodobně způsoben tvorbou velkého množství drobných jader za vzniku multinukleárních buněk. Změny počtu buněk ve srovnání s kontrolou jsou uvedeny v grafu 1 a 2



Graf 1: Změny počtu buněk ve srovnání s kontrolou.



Graf 2: Změny počtu buněk ve srovnání s kontrolou

5.2.2 Změna procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu

Roztoky cytostatik zásadně zvyšující procento buněk zablokovaných v jednotlivých fázích buněčného cyklu jsou uvedeny v tab. 6 a grafu 3.

Největší procento buněk zablokovaných v G1 fázi bylo detekováno po ošetření palbociclibem, který byl díky svému mechanismu účinku využit jako pozitivní kontrola, kdy podíl buněk zablokovaných v G1 fázi ve srovnání s kontrolou vzrostl téměř dvojnásobně. V případě taxolu byl velký nárůst procenta buněk zablokovaných v G1 fázi způsoben narušením průběhu mitózy a vznikem multinukleárních buněk, které jsou výsledkem tzv. *mitotic slippage*, kdy dochází k ukončení mitózy před samotným dělením buňky (Hart *et al.*, 2021).

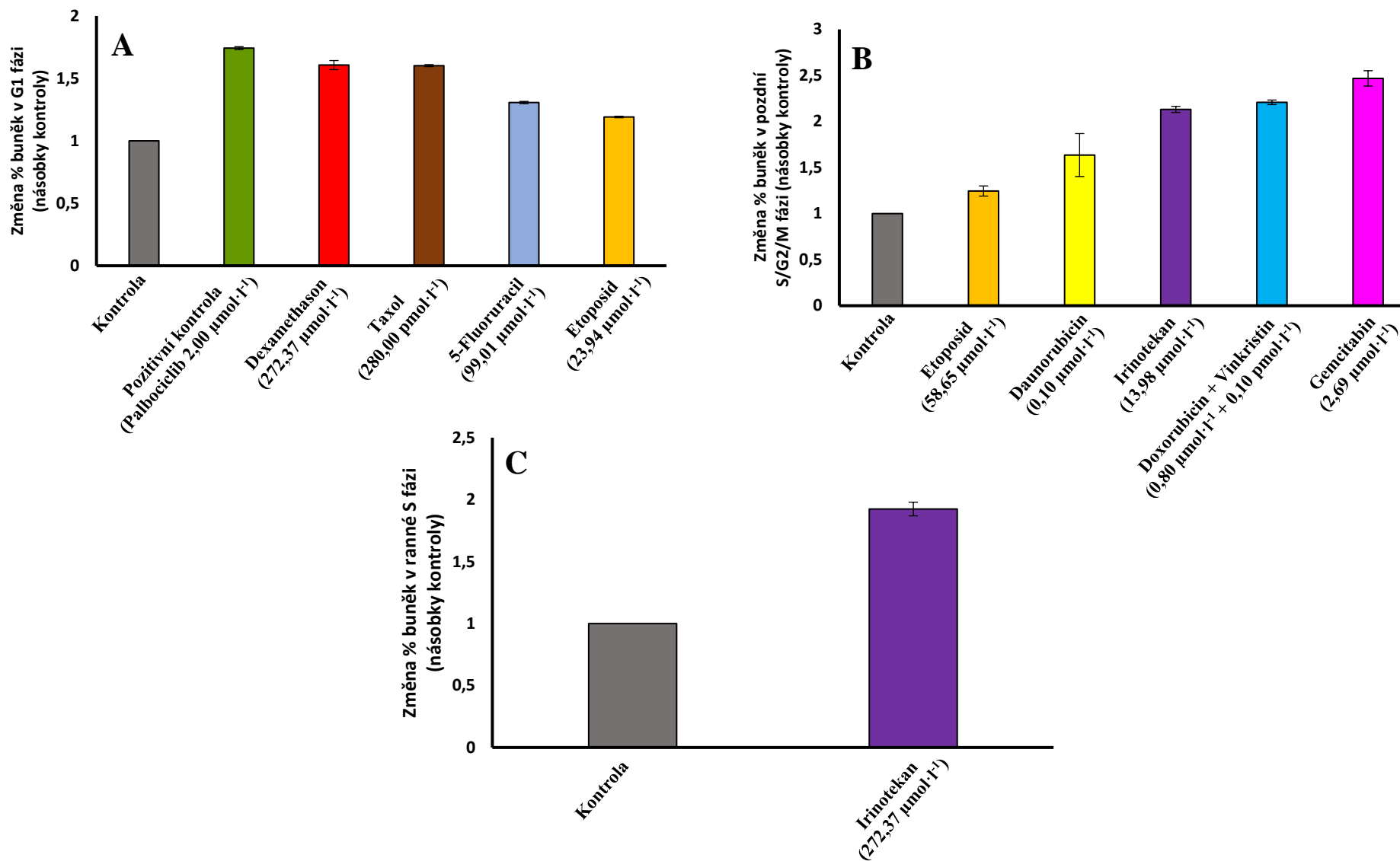
Největší procento buněk zablokovaných v pozdní S/G2/M fázi bylo detekováno po ošetření gemcitabinem, kdy ve srovnání s kontrolou vzrostl podíl buněk v této fázi až téměř 2,5násobně. Podobné účinky vykazuje i bortezomib, přestože je dle tab. 6 většina buněk zablokována v ranné S fázi, jelikož bortezomib inhibuje proteozomální degradaci FUCCI prób, které se následně současně akumulují v jádře (Beaumont *et al.*, 2020). Zvýšené procento buněk zablokovaných v pozdní S/G2/M fázi vyplývá z grafu 7, kdy průměrná intenzita zelené fluorescence (mAG-hGem₁₋₁₁₀) převyšuje intenzitu fluorescence červené (Mko2-hCdt1₃₀₋₁₂₀).

Z důvodu autofluorescence doxorubicinu a daunorubicinu nelze s přesností určit procento buněk zablokovaných v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ošetření těmito cytostatiky, jelikož se emisní maxima obou cytostatik pohybují okolo 590 nm, tedy ve žluté oblasti spektra, následkem čehož dochází ke zdánlivému nárůstu procenta buněk zablokovaných v ranné S fázi (Tian *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2018). Tento fakt podporuje skutečnost, že zvýšené procento buněk zablokovaných v ranné S fázi bylo detekováno pouze po ošetření vysoce koncentrovanými roztoky doxorubicinu a daunorubicinu, jejichž akumulace a následná autofluorescence zbarvuje jádro a jeho blízké okolí do žluta (viz obr. 18A a 18B), čímž se liší od buněk v ranné S fázi, kdy je do žluta zbarveno pouze jádro buňky (viz obr. 18C). Naopak nízkokoncentrované roztoky těchto cytostatik zablokovaly buňky v pozdní S/G2/M fázi, přičemž u nich nebyla pozorována výrazná autofluorescence.

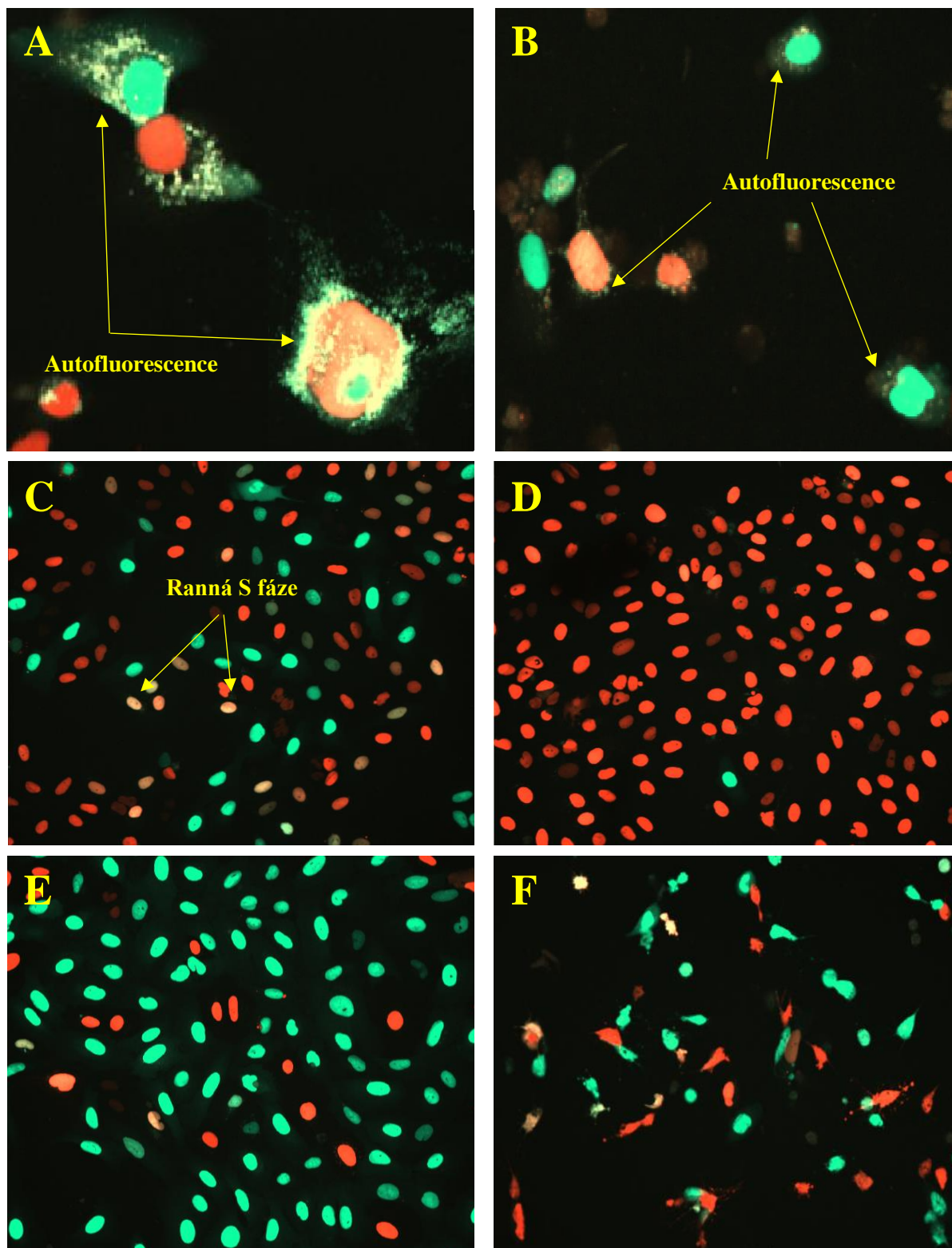
Roztoky cytostatik zásadně ovlivňující procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu jsou v následující tabulce barevně označeny: červeně roztoky cytostatik zvyšující procento buněk zablokovaných v G1 fázi nad 60 %, zeleně v pozdní S/G2/M fázi nad 40 %, žlutě v ranné S fázi nad 25 % a modře roztoky cytostatik snižující procento buněk v G1 fázi pod 40 %, v pozdní S/G2/M fázi pod 25 % a v ranné S fázi pod 10 %.

Tab. 6: Změny procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.(koncentrace v závorkách jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, taxol a vinkristin v $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

	G1 fáze [%]	S/G2/M fáze [%]	Ranná S fáze [%]
Kontrola	51,65	33,10	15,26
Irinotekan (13,98)	23,23	70,53	6,23
Irinotekan (28,92)	25,70	68,52	5,78
Irinotekan (114,67)	50,44	40,39	9,16
Irinotekan (272,37)	32,34	38,30	29,36
Gemcitabin (1,10)	16,87	75,20	7,93
Gemcitabin (2,69)	11,67	81,68	6,65
Etoposid (23,94)	61,51	2,51	10,98
Etoposid (58,65)	50,92	41,21	7,87
Daunorubicin (0,10)	36,71	54,13	9,16
Daunorubicin (0,20)	37,22	45,92	16,85
Daunorubicin (0,70)	1,05	49,34	49,61
Daunorubicin (1,80)	24,79	1,48	73,73
5-Fluoruracil (99,01)	67,50	21,72	10,79
Doxorubicin + Vinkristin (0,40 + 0,10)	30,34	64,09	5,56
Doxorubicin + Vinkristin (0,80 + 0,10)	11,37	73,08	15,55
Doxorubicin + Vinkristin (3,00 + 0,40)	43,87	4,00	52,13
Doxorubicin + Vinkristin (7,50 + 0,99)	39,22	2,05	58,73
Taxol (10,00)	65,92	22,58	11,50
Taxol (30,00)	76,57	14,45	8,98
Taxol (110,00)	82,17	7,91	9,92
Taxol (280,00)	82,73	8,53	8,74
Palbociclib (2,00)	90,00	7,74	2,26
Bortezomib (24,94)	1,56	4,55	93,89
Bortezomib (49,75)	0,82	7,96	91,22
Dexamethason (196,08)	81,28	13,49	5,23
Dexamethason (272,37)	82,98	14,39	2,63



Graf 3: Roztoky cytostatik nejúčinněji blokující buňky v G1 fázi (A), pozdní S/G2/M fázi (B) a ranné S fázi (C) ve srovnání s kontrolou.



Obr. 18: Autofluorescence daunorubicinu a doxorubicinu a nejvýraznější změny procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

(**A**) daunorubicin ($1,80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), (**B**) doxorubicin + vinkristin ($7,50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} + 0,99 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$).
 (**C**) kontrola, (**D**) palbociclib ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), (**E**) gemcitabin ($2,69 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), (**F**) irinotekan ($272,37 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

5.2.3 Změna velikosti buněčného jádra

Roztoky cytostatik zásadně ovlivňující průměrnou velikost buněčného jádra jsou uvedeny v tab. 7 a grafu 4.

Největší pokles průměrné velikosti jádra byl detekován po ošetření taxolem, kdy jeho velikost ve srovnání s kontrolou klesla až téměř dvojnásobně jakožto důsledek vzniku multinukleárních buněk s velkým množstvím drobných jader (viz obr. 19C). V případě dexamethasonu byl pokles průměrné velikosti jádra způsoben zvýšeným procentem buněk zablokovaných v G1 fázi (viz Tab. 6), v níž je velikost jádra v rámci všech fází buněčného cyklu nejmenší (Cantwell a Nurse, 2019). Díky jejich vysoké cytotoxicitě a schopnosti indukovat apoptózu (viz graf 1 a 2), která se projevuje fragmentací jádra, kondenzací chromatinu či tvorbou mikrojader, bylo zásadní snížení velikosti jádra detekováno po ošetření daunorubicinem, bortezomibem a doxorubicinem s vinkristinem (Meintières *et al.*, 2001).

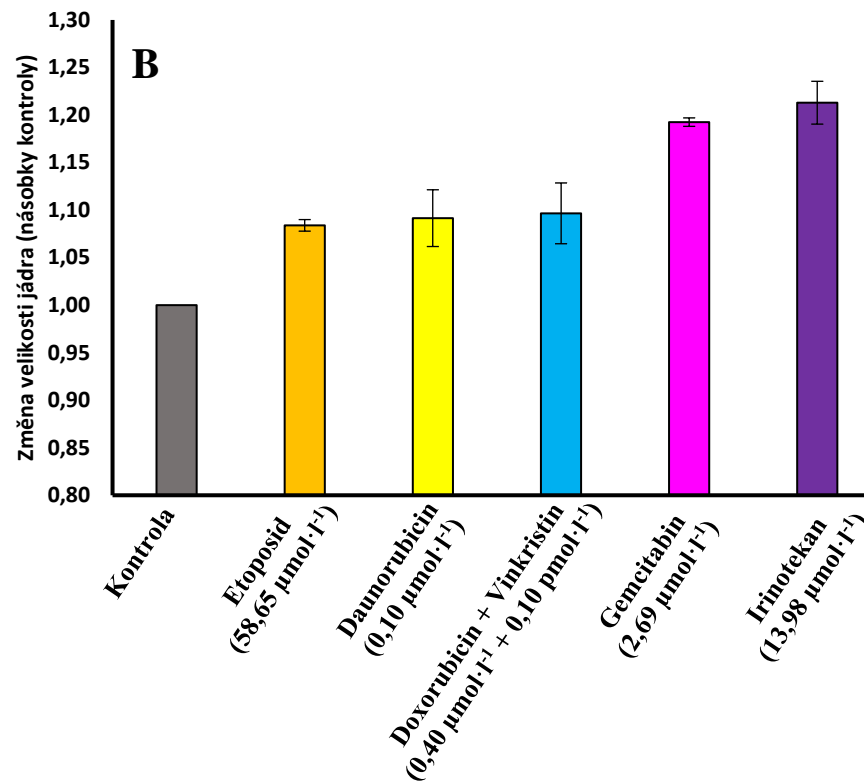
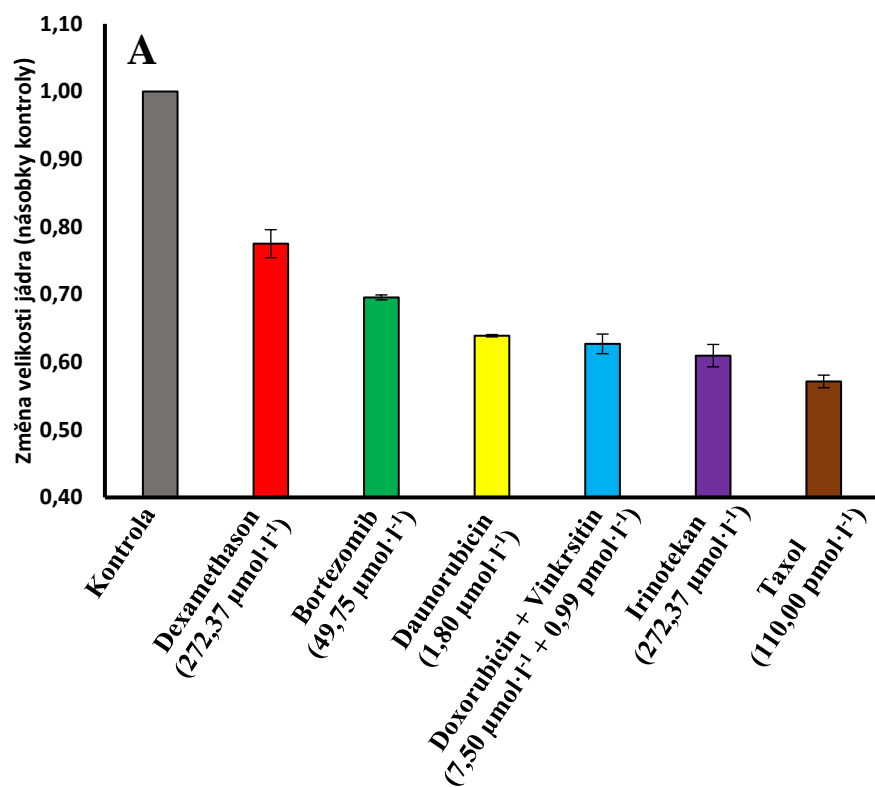
Největší nárůst průměrné velikosti jádra ve srovnání s kontrolou byl detekován po ošetření irinotekanem a gemcitabinem, kdy velikost jádra ve srovnání s kontrolou vzrostla až 1,2násobně. Nárůst velikosti jádra ve srovnání s kontrolou byl způsoben zvýšeným procentem buněk zablokovaných v pozdní S/G2/M fázi (viz tab. 6), jelikož se ranná S a pozdní S/G2/M fáze ve srovnání s G1 fází vyznačují větším objemem buněčného jádra, které se v průběhu buněčného cyklu postupně zvětšuje za zachování konstantního poměru velikosti jádra a cytoplazmy (Cantwell a Nurse, 2019).

Roztoky cytostatik zásadně ovlivňující průměrnou velikost jádra jsou v následující tabulce barevně označeny: červeně roztoky cytostatik způsobující pokles velikosti vůči kontrole o více než $20 \mu\text{m}^2$ a modře roztoky cytostatik indukující zvýšení této hodnoty o více než $20 \mu\text{m}^2$ vůči kontrole.

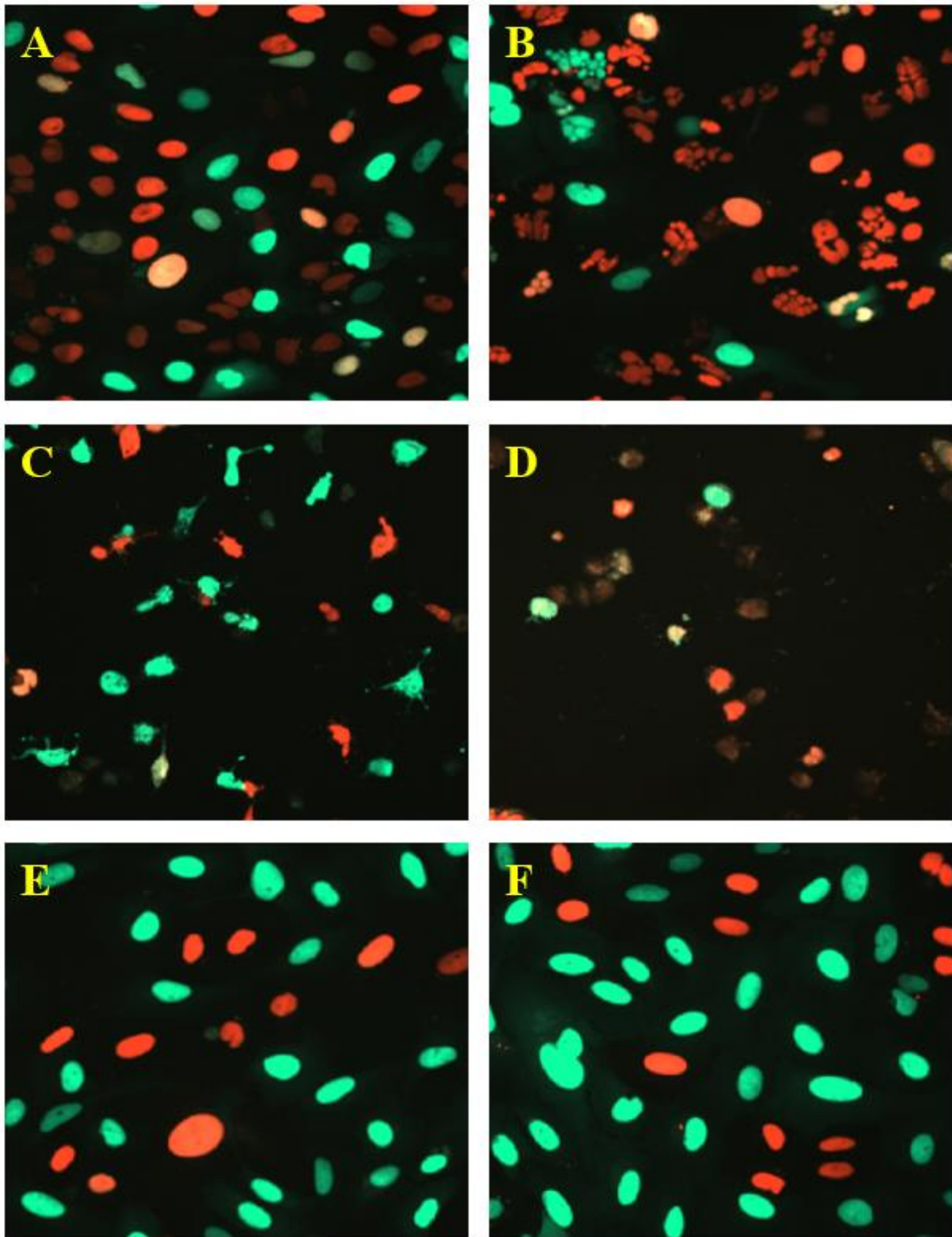
Tab. 7: Změny průměrné velikosti buněčného jádra.

(koncentrace v závorkách jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, taxol a vinkristin v $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

	Průměrná velikost jádra [μm^2]		Průměrná velikost jádra [μm^2]
Kontrola	270,36	Bortezomib (24,94)	216,65
Irinotekan (13,98)	327,93	Bortezomib (49,75)	188,06
Irinotekan (28,92)	319,96	Doxorubicin + Vinkristin (0,40 + 0,10)	296,46
Irinotekan (114,67)	249,85	Doxorubicin + Vinkristin (3,00 + 0,40)	184,53
Irinotekan (272,37)	164,79	Doxorubicin + Vinkristin (7,50 + 0,99)	169,52
Gemcitabin (1,10)	313,89	Taxol (10,00)	225,44
Gemcitabin (2,69)	322,41	Taxol (30,00)	211,23
Etoposid (58,65)	293,05	Taxol (110,00)	154,50
Daunorubicin (0,10)	295,10	Taxol (280,00)	158,91
Daunorubicin (1,80)	172,76	Dexamethason (196,08)	233,57
		Dexamethason (272,37)	209,55



Graf 4: Roztoky cytostatik indukující nejvýraznější pokles (**A**) a nárůst (**B**) průměrné velikosti buněčného jádra ve srovnání s kontrolou.



Obr. 19: Nejvýraznější změny průměrné velikosti buněčného jádra.

(**A**) kontrola, (**B**) taxol ($110,00 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$), (**C**) irinotekan ($272,37 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), (**D**) doxorubicin + vincristin ($7,50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} + 0,99 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$), (**E**) irinotekan ($13,98 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a (**F**) gemcitabin ($2,69 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$).

5.2.4 Změna tvaru buněčného jádra

Změna tvaru buněčného jádra byla stanovena z jeho průměrné hodnoty indexu kulatosti NCI (z anglického *Nuclear Circularity Index*) ve srovnání s kontrolou. Nabývá-li jádro při pozorování v mikroskopu tvaru dokonalého kruhu, je hodnota indexu rovna 1. Naopak čím více se tato hodnota vzdaluje od 1 směrem k 0, tím méně se jádro při pohledu v mikroskopu jeví jako dokonalý kruh (Janssen *et al.*, 2022). Roztoky cytostatik výrazně ovlivňující NCI jádra jsou uvedeny v tab. 8 a grafu 5A a 5B.

Největší pokles NCI byl detekován po ošetření daunorubicinem, taxolem a doxorubicinem s vinkristinem, kdy NCI klesla ve srovnání s kontrolou až téměř o čtvrtinu (viz graf 5A).

U roztoků cytostatik vyvolávajících zásadní snížení NCI (viz graf 5A), vyjma dexamethasonu, bylo detekováno snížení počtu buněk o více než polovinu ve srovnání s kontrolou (viz graf 1 a 2), což nasvědčuje jejich vysoké cytotoxicitě a schopnosti indukovat apoptózu projevující se výraznými změnami tvaru buněčného jádra, stejně jako tomu bylo v případě jeho velikosti. V případě taxolu byl tvar jádra, stejně jako jeho velikost, výrazně ovlivněn tvorbou multinukleárních buněk, což se současně projevilo zdánlivým nárůstem počtu buněk ve srovnání s kontrolou.

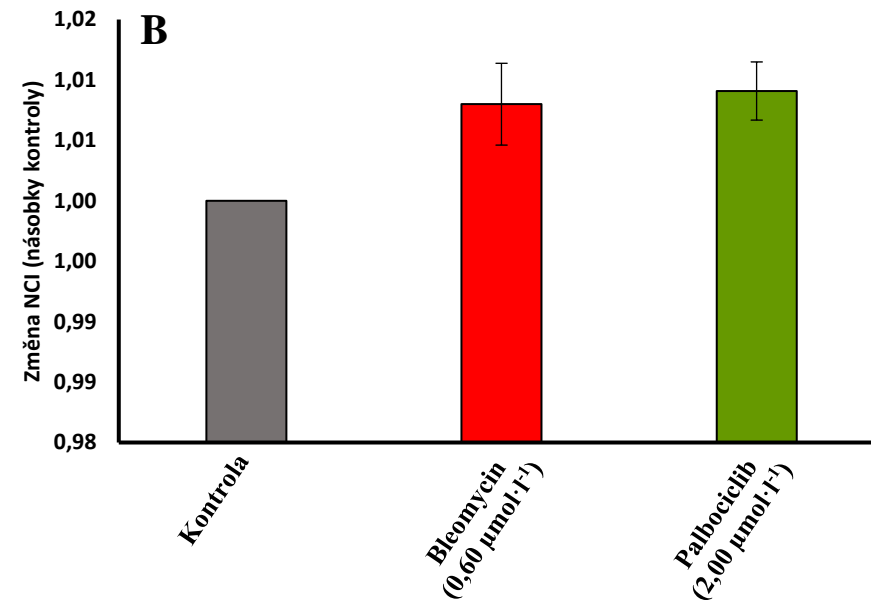
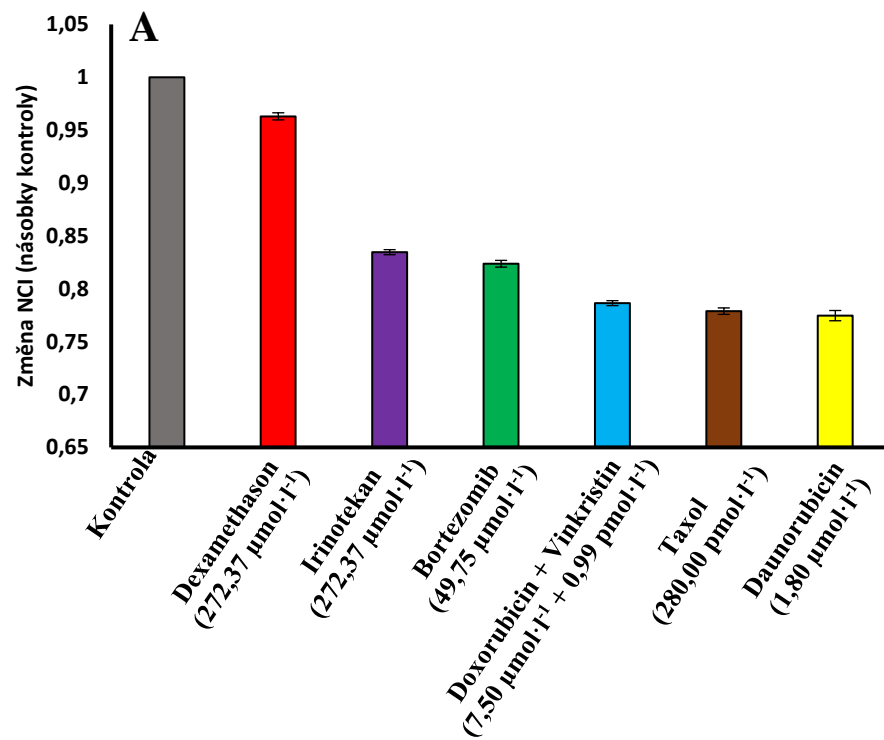
Jen nepatrný nárůst NCI ve srovnání s kontrolou byl detekován po ošetření bleomycinem a palbociclibem, u kterých nebylo díky jejich nízké cytotoxicitě detekováno zásadní snížení počtu buněk ve srovnání s kontrolou.

Roztoky cytostatik zásadně ovlivňující NCI jsou v následující tabulce barevně označeny: červeně roztoky indukující snížení hodnoty NCI pod 0,900, oranžově pod 0,900 a modře roztoky způsobující nárůst této hodnoty nad 0,920.

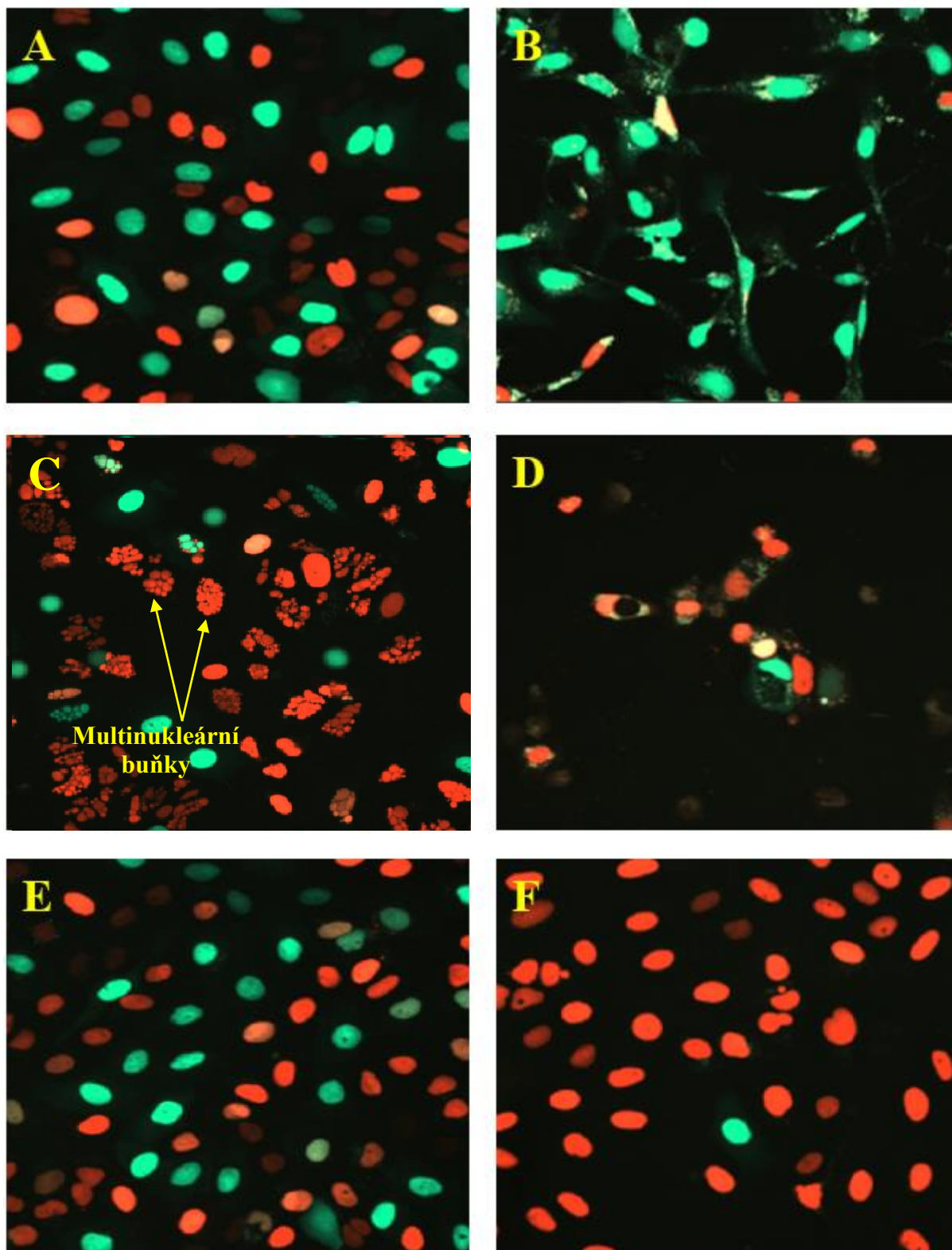
Tab. 8: Změny průměrné hodnoty indexu kulatosti buněčného jádra.

(koncentrace v závorkách jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, taxol a vinkristin v $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

	Průměrná hodnota indexu kulatosti		Průměrná hodnota indexu kulatosti
Kontrola	0,915	Doxorubicin + Vinkristin (0,40 + 0,10)	0,864
Irinotekan (114,67)	0,854	Doxorubicin + Vinkristin (0,80 + 0,10)	0,841
Irinotekan (272,37)	0,763	Doxorubicin + Vinkristin (3,00 + 0,40)	0,733
Daunorubicin (0,10)	0,876	Doxorubicin + Vinkristin (7,50 + 0,99)	0,719
Daunorubicin (0,20)	0,812	Taxol (10,00)	0,843
Daunorubicin (0,70)	0,713	Taxol (30,00)	0,822
Daunorubicin (1,80)	0,708	Taxol (110,00)	0,760
Dexamethason (196,08)	0,898	Taxol (280,00)	0,712
Dexamethason (272,37)	0,881	Palbociclib (2,00)	0,923
Bleomycin (0,06)	0,920	Bortezomib (24,94)	0,784
Bleomycin (0,24)	0,920	Bortezomib (49,75)	0,753
Bleomycin (0,60)	0,922		



Graf 5: Roztoky cytostatik indukující nejvýraznější pokles (A) a nárůst (B) průměrné hodnoty indexu kulatosti jádra ve srovnání s kontrolou.



Obr. 20: Nejvýraznější změny tvaru buněčného jádra.

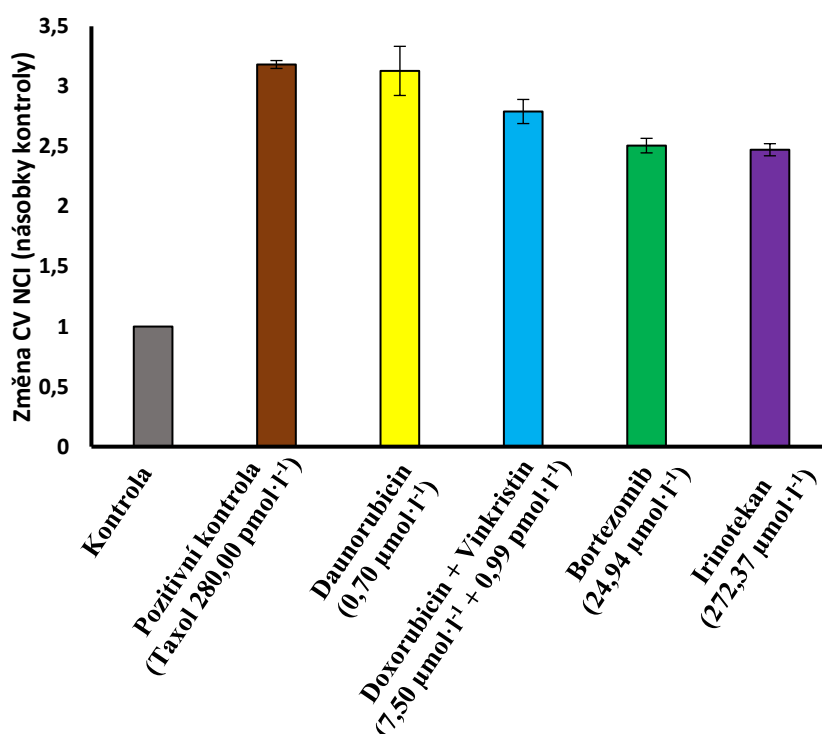
(**A**) kontrola, (**B**) daunorubicin ($1,80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), (**C**) taxol ($280,00 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$), (**D**) doxorubicin + vinkristin ($7,50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} + 0,99 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$), (**E**) bleomycin ($0,60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a (**F**) palbociclib ($2,00 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Do hodnocení změn morfologie buněčného jádra byl zahrnut variační koeficient (CV) indexu kulatosti jádra (NCI), který byl stanoven jakožto podíl směrodatné odchylky NCI a aritmetického průměru NCI, za účelem analýzy fragmentovaných jader, kdy byl jako pozitivní kontrola využit roztok taxolu o koncentraci $280,00 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ díky jeho výraznému vlivu na morfologii jádra.

Roztoky cytostatik indukující nárůst CV NCI přes 11 % jsou uvedeny v tab. 9. V grafu 6 jsou poté uvedeny roztoky cytostatik indukující největší nárůst CV ve srovnání s kontrolou.

Lze si povšimnout silné korelace mezi změnami velikosti jádra (viz graf 4A) a jeho tvaru (viz graf 5A) a zvýšenou hodnotou CV indexu kulatosti jádra (viz graf 6). Ošetření buněk roztoky cytostatik zásadně ovlivňujícími morfologii jádra je doprovázeno nárůstem CV NCI díky velkým rozdílům ve tvaru jader (NCI) u takto ošetřených buněk.

Jak již bylo zmíněno dříve, byly výrazné změny v morfologii jádra po ošetření daunorubicinem, bortezomibem, irinotekanem a doxorubicinem s vinkristinem způsobeny jejich vysokou cytotoxicitou a schopností indukovat apoptózu projevující se mimo jiné fragmentací jádra a tvorbou mikrojadern (Meintières *et al.*, 2001). Vybrané snímky znázorňující výskyt mikrojadern a fragmentovaných jader lze vidět na Obr. 20.

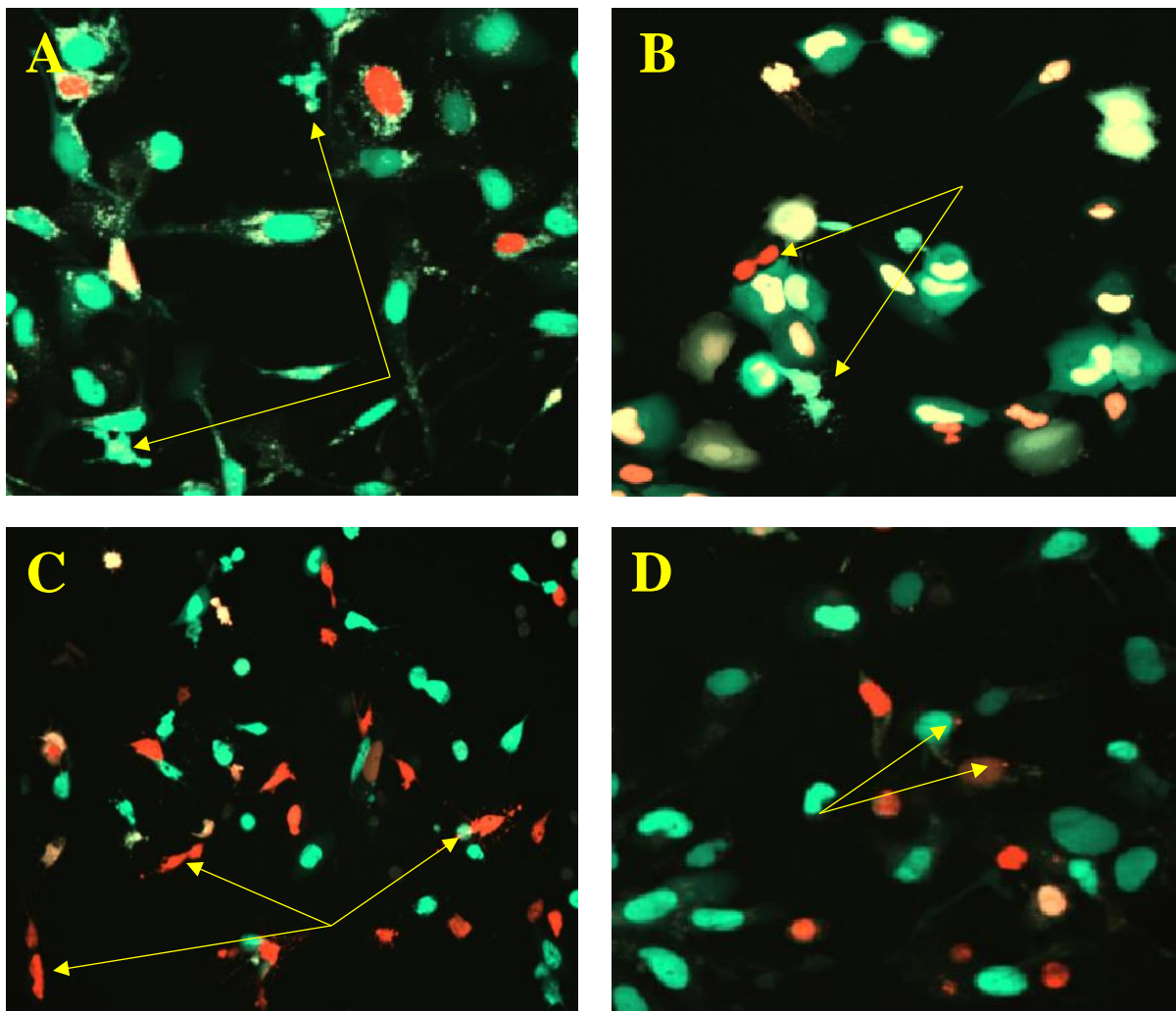


Graf 6: Nejvýraznější změny CV indexu kulatosti jádra ve srovnání s kontrolou.

Tab. 9: Zásadní změny variačního koeficientu (CV) indexu kulatosti jádra.

(koncentrace v závorkách jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, taxol a vinkristin v $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

	Variační koeficient indexu kulatosti jádra [%]		Variační koeficient indexu kulatosti jádra [%]
Kontrola	7,003	Doxorubicin + Vinkristin (0,40 + 0,10)	11,857
Irinotekan (114,67)	16,218	Doxorubicin + Vinkristin (0,80 + 0,10)	14,768
Irinotekan (272,37)	17,313	Doxorubicin + Vinkristin (3,00 + 0,40)	19,261
Daunorubicin (0,20)	17,398	Doxorubicin + Vinkristin (7,50 + 0,99)	19,543
Daunorubicin (0,70)	21,910	Taxol (10,00)	12,606
Daunorubicin (1,80)	19,221	Taxol (30,00)	14,037
Bortezomib (24,94)	17,554	Taxol (110,00)	18,739
Bortezomib (49,75)	15,411	Taxol (280,00)	22,283



Obr. 21: Roztoky cytostatik zásadně zvyšující variační koeficient indexu kulatosti buněčného jádra.

Tvorba fragmentovaných jader po ošetření: (A) daunorubicinem ($0,70 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), (B) bortezomibem ($24,94 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), (C) irinotekanem ($272,37 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a tvorba mikrojadra po ošetření: (D) doxorubicinem s vinkristinem ($0,80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} + 0,10 \text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

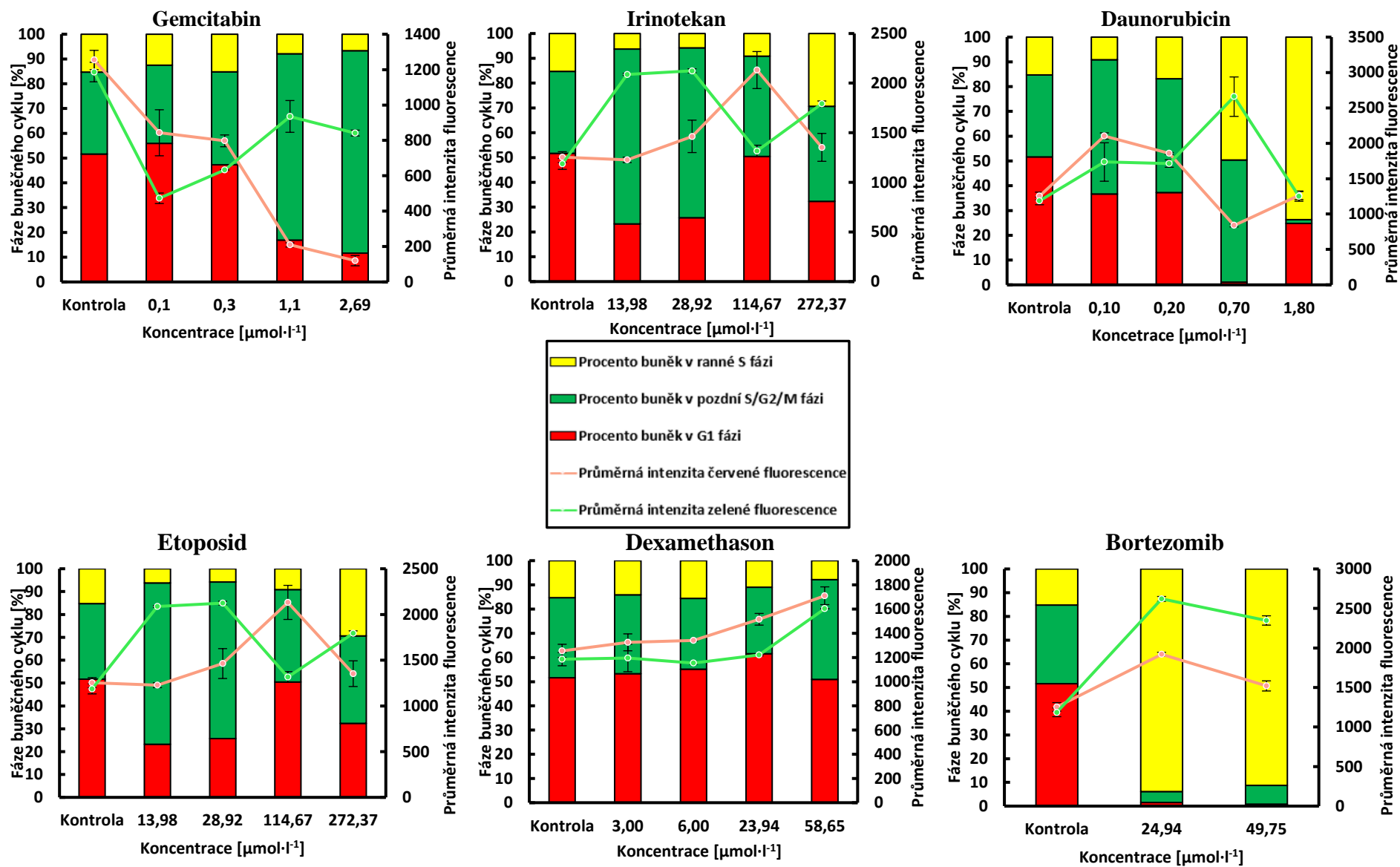
5.2.5 Změna intenzity fluorescence

Na závěr byly vyhodnoceny změny průměrné intenzity fluorescence v zelené oblasti spektra emitované mAG-hGem₁₋₁₁₀ a v červené oblasti emitované mKO2-hCdt₃₀₋₁₂₀ v jednotlivých jamkách pracovní destičky ve srovnání s kontrolou. Grafy 7 a 8 zachycují změny průměrné intenzity červené a zelené fluorescence. Hlavní osa Y znázorňuje procentuální zastoupení buněk v G1, ranné S a pozdní S/G2/M fázi, aby byla zdůrazněna souvislost mezi intenzitami fluorescencí a procentem buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

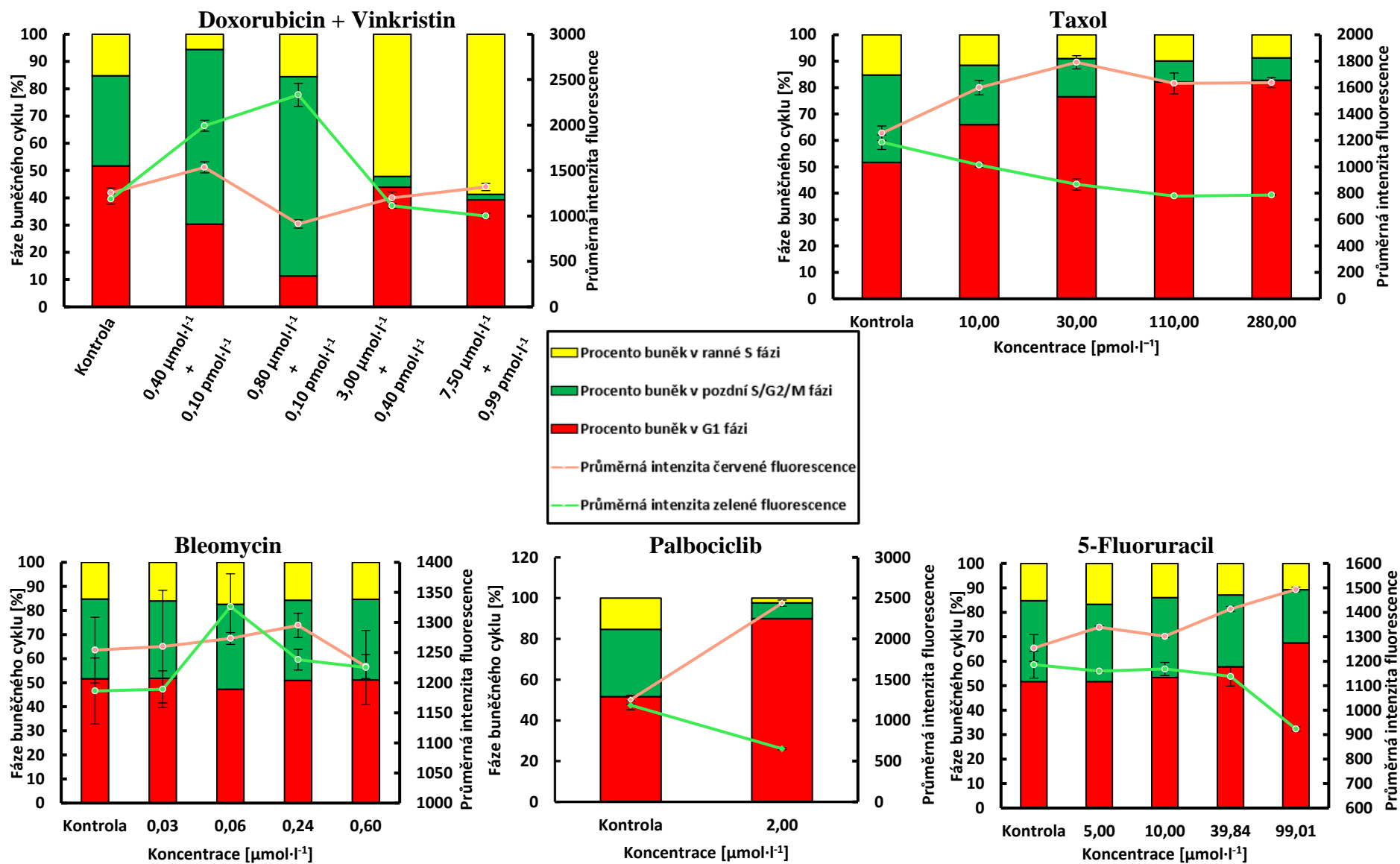
Nejvýraznější nárůst průměrné intenzity červené fluorescence, na úkor zelené, byl detekován po ošetření roztokem palbociclibu o koncentraci 2,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, který současně nejúčinněji blokoval buňky v G1 fázi. Naopak největší nárůst průměrné intenzity zelené fluorescence, na úkor červené, byl detekován po ošetření roztokem bortezomibu o koncentraci 49,75 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což nasvědčuje tomu, že bortezomib skutečně blokuje buňky v pozdní S/G2/M fázi (viz obr. 22).

Je nutno vzít v potaz, že snížení počtu buněk ve srovnání s kontrolou (viz graf 1 a 2) vede ke snížení průměrné intenzity fluorescence i přes značný nárůst procenta buněk zablokovaných v dané fázi buněčného cyklu. Například roztok gemcitabinu o koncentraci 2,69 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ indukoval největší nárůst procenta buněk zablokovaných v pozdní S/G2/M fázi, avšak průměrná intenzita zelené fluorescence je podstatně nižší než v případě kontroly.

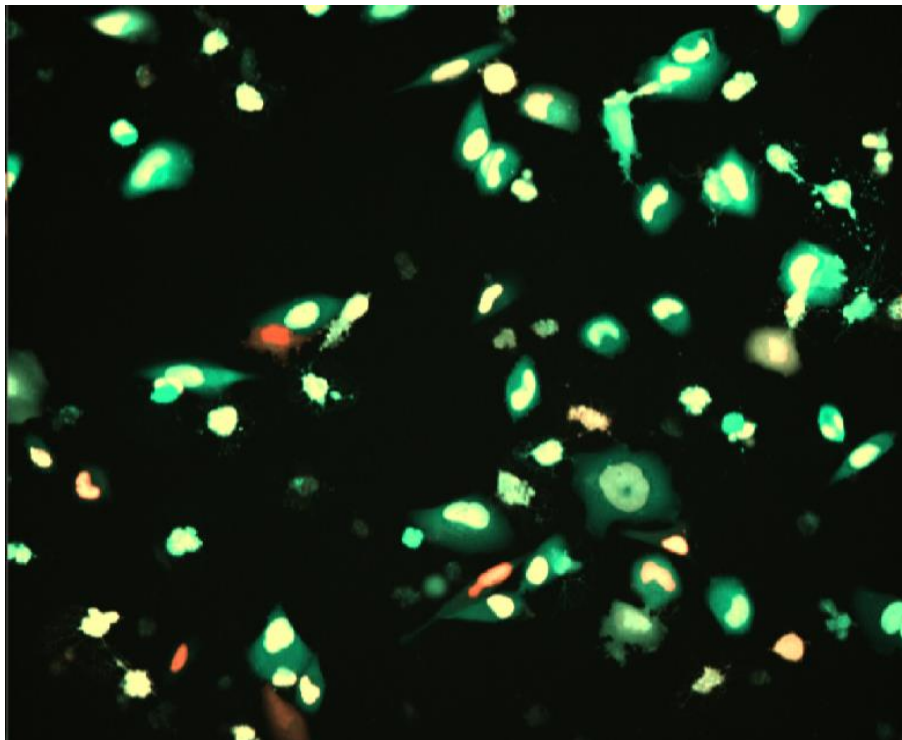
Částečné vyrovnání rozdílu mezi průměrnými intenzitami obou fluorescencí byl po ošetření vysoce koncentrovanými roztoky daunorubicinu a doxorubicinu s vinkristinem, které zdánlivě blokují buňky v ranné S fázi, s nejvyšší pravděpodobností způsoben snížením rozdílu mezi procentuálním zastoupením buněk v G1 a pozdní S/G2/M fázi.



Graf 7: Změny průměrných intenzit fluorescencí.



Graf 8: Změny průměrných intenzit fluorescencí.



Obr. 22: Fázově nespecifická akumulace FUCCI fluorescenčních prób projevující se intenzivní fluorescencí po ošetření bortezomibem ($49,75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

6 DISKUSE

Připravené roztoky cytostatik byly nejdříve podrobeny MTS testu za účelem potvrzení jejich cytotoxicity. Data z obrazové analýzy byla následně vyhodnocena pro ta cytostatika, u kterých byla MTS testem potvrzena jejich cytotoxicita. Pro diskusi byly vybrána cytostatika nejzásadněji ovlivňující morfologii buněčného jádra a procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu ve srovnání s kontrolou.

Největší procento buněk zablokovaných v G1 fázi bylo dle očekávání detekováno po ošetření palbociclibem, který byl vzhledem ke svému mechanismu účinku využit jako pozitivní kontrola, jelikož se jedná o selektivní inhibitor CDK4/6 běžně využívaný k synchronizaci buněčného cyklu (Trotter a Hagan, 2020). Procento buněk zablokovaných v G1 fázi ve srovnání s kontrolou vzrostlo více než 1,7násobně.

Podobný účinek vykazoval taxol, přestože se jedná o inhibitor mikrotubulů standardně blokuje buňky v M fázi, kdy procento buněk v G1 fázi po ošetření taxolem vzrostlo vůči kontrole až 1,6násobně (Wang *et al.*, 2013). Zvýšené procento buněk v G1 fázi bylo v tomto případě výsledkem chybného rozchodu chromozomů způsobeného stabilizací struktury mikrotubulů působením taxolu, který vedl ke vzniku multinukleárních buněk, jelikož byla mitóza ukončena před samotným dělením buňky (Mitchinson *et al.*, 2017; Hart *et al.*, 2021). Vznik multinukleárních buněk s velkým množstvím drobných jader se projevil výraznými změnami jaderné morfologie. Po ošetření taxolem byl detekován největší pokles průměrné velikosti jádra a druhý nejvýraznější pokles NCI ve srovnání s kontrolou ze všech testovaných cytostatik. Přestože taxol standardně blokuje buňky v M fázi, Demidenko *et al.* (2008) prokázali, že koncentrace taxolu do $3 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ zpočátku způsobuje pouze zpomalení, nikoliv však zástavu, mitózy a produkci dvou až tří hypoploidních či hyperploidních. Tyto buňky jsou následně zablokovány v G1 fázi jakožto důsledek zpomaleného průběhu mitózy, během níž je inhibována transkripční aktivita buňky. Trvá-li tato inhibice po dobu alespoň 2 hodin, dochází k výrazné akumulaci proteinu p53, jelikož se jedná o čas potřebný k odbourání řady intracelulárních proteinů s krátkou životností včetně MDM2, který označuje p53 k degradaci. Jakmile buňka dokončí dělení, či předčasně opustí mitózu před jejím dokončením, dojde díky vysoké hladině p53 k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi (Demidenko *et al.*, 2008). Proces *mitotic slippage* je však také často následován postmitotickou apoptózou z důvodu výrazného poškození molekuly DNA, které vede k silné indukci proteinu p53 parciálně aktivujícího kaspázy (Cheng a Crasta, 2017). Tuto skutečnost potvrdil Zhu *et al.* (2014), kdy potlačení poškození DNA a knock-down p53 siRNA transfekcí vedl k výraznému snížení frekvence

výskytu postmitotické apoptózy po ošetření taxolem.

Největší nárůst procenta buněk zablokovaných v pozdní S/G2/M fázi ve srovnání s kontrolou, až 2,5násobný, byl detekován po ošetření gemcitabinem. Gemcitabin je antagonistou pyrimidinu, který stejně jako ostatní DNA poškozující cytostatika blokuje buňky v S či G2 fázi mechanismem zahrnujícím kinázu Chk1 (Montano *et al.*, 2017; Bukowski *et al.*, 2020). Co se týče morfologie, vyvolal gemcitabin jen mírný nárůst velikosti jádra ve srovnání s kontrolou díky zvýšenému procentu buněk zablokovaných v pozdní S/G2/M fázi, které se v porovnání s buňkami v G1 fázi vyznačují většími rozměry jádra (Cantwell a Nurse, 2019).

Vysoký podíl buněk v pozdní S/G2/M fázi byl dále detekován po ošetření nízkokoncentrovanými roztoky doxorubicinu, který interkalací a oxidativním poškozením blokuje buňky na pomezí G2 a M fáze, s vinkristinem, který jakožto destabilizátor mikrotubulů blokuje buňky v M fázi (Kim *et al.*, 2009; Kothari *et al.*, 2016). Podobný účinek lze předpokládat i u vysoce koncentrovaných roztoků těchto cytostatik, avšak z důvodu silné autofluorescence doxorubicinu nelze spolehlivě stanovit procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (Liang *et al.*, 2018). Po ošetření doxorubicinem s vinkristinem bylo detekováno třetí největší snížení průměrné velikosti jádra a NCI ve srovnání s kontrolou ze všech testovaných cytostatik, přičemž počet buněk v tomto případě klesl ve srovnání s kontrolou téměř na třetinu. Lze proto předpokládat, že výrazné změny v morfologii jádra byly způsobeny indukci apoptózy projevující se kondenzací chromatinu, fragmentací jádra a tvorbou mikrojader (Meintières *et al.*, 2001). Jelikož se vinkristin společně s taxolem řadí do skupiny cytostatik zvaných vinca alkaloidy, charakteristických pro svou schopnost indukovat tvorbu mikrojader, lze u nich předpokládat zásadnější vliv mikrojader na změny morfologie buněčného jádra než u zbylých cytostatik.

Jak již bylo zmíněno dříve, nelze z důvodu výrazné autofluorescence doxorubicinu a daunorubicinu a nescifické akumulace mAG-hGem₁₋₁₁₀ a mKO2-hCdt₃₀₋₁₂₀ v buňce po ošetření bortezomibem přesně stanovit vliv těchto cytostatik na změny procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, přestože zdánlivě blokuje buňky v ranné S fázi (Tian *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2018; Beaumont *et al.*, 2020). Výrazné zvýšení procenta buněk zablokovaných v ranné S fázi však lze s jistotou potvrdit po ošetření irinotekanem, kdy byl pozorován až téměř dvojnásobný nárůst procenta buněk zablokovaných v této fázi ve srovnání s kontrolou. Irinotekan rovněž vyvolal druhý největší pokles průměrné velikosti jádra a pátý největší pokles NCI ve srovnání s kontrolou ze všech testovaných cytostatik. Jelikož bylo po ošetření irinotekanem detekováno více než dvojnásobné snížení počtu buněk ve srovnání s kontrolou, lze předpokládat, že změny v morfologii jádra byly stejně

jako v případě doxorubicinu s vinkristinem způsobeny indukci apoptózy, čemuž nasvědčuje četný výskyt fragmentovaných jader.

Z hlediska vlivu na morfologii jádra nelze opomenout daunorubicin, jehož mechanismus účinku spočívá v interkalaci do molekuly DNA, produkci reaktivních forem kyslíku a inhibici topoizomerázy II (Al-Aamri *et al.*, 2019). Daunorubicin díky své vysoké cytotoxicitě a schopnosti indukovat apoptózu vyvolal nejvýraznější snížení NCI a pátý největší pokles průměrné velikosti jádra ve srovnání s kontrolou ze všech testovaných cytostatik.

Jak již bylo zmíněno dříve, je kombinace obrazové analýzy a systému FUCCI ideální pro studium změn v dynamice buněčného cyklu a morfologii jádra v reálném čase. Z výsledků je však zřejmé, že tento postup skýtá i řadu nevýhod. Jako hlavní omezení systému FUCCI se ukázala antracyklinová cytostatika doxorubicin a daunorubicin vyznačující se ve vyšších koncentracích intenzivní autofluorescencí zkreslující výsledky analýzy procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Dalším omezením tohoto systému se ukázalo cytostatikum bortezomib inhibující proteozomální degradaci fluorescenčních práb mAG-hGem₁₋₁₁₀ a mKO2-hCdt₃₀₋₁₂₀, které se následně fázově nespecificky akumulují v buněčném jádře a podobně jako doxorubicin a daunorubicin zkreslují výsledky analýzy dynamiky buněčného cyklu (Beaumont *et al.*, 2020). Je tedy zřejmé, že pro získání optimálních výsledků je nutné doplnit studium dynamiky buněčného cyklu pomocí obrazové analýzy a FUCCI systému jinými metodami umožňujícími identifikaci jednotlivých fází buněčného cyklu, jako je například již zmíněna metoda průtokové cytometrie.

7 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše se zaměřením na problematiku nádorových onemocnění, buněčný cyklus, mechanismus účinku protinádorových léčiv na buněčné úrovni, rozvoj rezistence vůči konvenční chemoterapii a metody analýzy buněčného cyklu.

V experimentální části bakalářské práci byly kombinací obrazové analýzy a systému FUCCI studovány změny v morfologii buněčného jádra a dynamice buněčného cyklu u reportérové buněčné linie U2OS-FUCCI, stabilně exprimující fázově specifické fluorescenční próby mAG-hGem₁₋₁₁₀ a mKO2-hCdt₃₀₋₁₂₀, po jednodenní inkubaci s připravenými roztoky vybraných cytostatik, u kterých byla MTS testem potvrzena jejich cytotoxicita u buněčné linie U2OS. Pro analýzu změn morfologie buněčného jádra byly vyhodnoceny změny jeho velikosti, indexu kulatosti a variačního koeficientu indexu kulatosti. Vliv cytostatik na dynamiku buněčného cyklu byl vyhodnocen ze změn procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Kombinace obrazové analýzy a FUCCI systému byla využita díky možnosti vizualizace a identifikace jednotlivých fází buněčného cyklu v reálném čase, díky čemuž se jedná o atraktivní metodu pro studium dynamiky buněčného cyklu v nádorových buňkách, a to především ve spojitosti s rozvojem jejich rezistence vůči konvenční chemoterapii.

I přes zmíněné nedostatky kombinace obrazové analýzy a systému FUCCI ke studiu morfologie jádra a dynamiky buněčného cyklu lze říci, že cíle práce byly úspěšně splněny.

8 LITERATURA

Abe T., Sakaue-Sawano A., Kiyonari H., Shioi G., Inoue K., Horiuchi T., Nakao K., Miyawaki A., Aizawa S., Fujimori T. (2013): Visualization of cell cycle in mouse embryos with Fucci2 reporter directed by Rosa26 promoter. *Development* 140: 237–246.

Abraham E. H., Prat A. G., Gerweck L., Seneveratne T., Arceci R. J., Kramer R., Guidotti G., Cantiello H. F. (1993): The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 312–316.

Al-Aamri H. M., Ku H., Irving H. R., Tucci J., Meehan-Andrews T., Bradley C. (2019): Time dependent response of daunorubicin on cytotoxicity, cell cycle and DNA repair in acute lymphoblastic leukaemia. *BMC Cancer* 19: 1–12.

Alagkiozidis I., Facciabene A., Tsiatas M., Carpenito C., Benencia F., Adams S., Jonak Z., June C. H., Powell D. J. Jr., Coukos G. (2011): Time-dependent cytotoxic drugs selectively cooperate with IL-18 for cancer chemo-immunotherapy. *Journal of Translational Medicine* 9: 1–12.

An H. X., Beckmann M. W., Reifenberger G., Bender H. G., Niederacher D. (1999): Gene Amplification and Overexpression of CDK4 in sporadic Breast Carcinomas Is Associated with High Tumor Cell Proliferation. *The American Journal of Pathology* 154: 113–118.

Apte S. S., Mattei M. G., Olsen B. R. (1995): Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* 26: 592–594.

Arias E. E., Walter J. C. (2007): Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes & Development* 21: 497–518.

Auebry B. J., Kelly G. L., Janic A., Herold M. J., Strasser A. (2018): How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation* 25: 104–113.

Bajar. B. T., Lam A. J., Badiee R. K., Oh YH., Chu J., Zhou X. X., Kim N., Kim B. B., Chung M., Yablonovitch A. L., Cruz B. F., Kulalert K., Tao J. J., Meyer T., Su XD., Lin M. Z. (2016): Fluorescent indicators for simultaneous reporting of all four cell cycle phases. *Nature Methods* 13: 993–996.

Bajčiová V. (2015): K nádorům predisponujícím syndromy v dětském věku – role pediatra primárního kontraktu. *Pediatric pro praxi* 16: 300–304.

Bau J. T., Kang Z., Austin C. A., Kurz E. U. (2014): Salicylate, a catalytic inhibitor of topoisomerase II, inhibits DNA cleavage and is selective for the α isoform. *Molecular Pharmacology* 85: 198–207.

Beaumont K. A., Hill D. S., Daignault S. M., Lui G. Y. L., Sharp D. M., Gabrielli B., Weninger W., Haas N. K. (2016): Cell Cycle Phase-Specific Drug Resistance as an Escape Mechanism of Melanoma Cells. *The Journal of Investigative Dermatology* 136: 1479–1489.

- Bladé J., Cibeira M. T., Rosiñol L. (2005): Bortezomib: a valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma. *Acta Oncologica* 44: 440–448.
- Bukowski K., Kciuk M., Kontek R. (2020): Mechanism of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1–24.
- Buzun K., Bielawska A., Bielawski K., Gornowicz A. (2020): DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35: 1781–1799.
- Cantwell H., Nurse P. (2019): Unravelling nuclear size control. *Current Genetics* 65: 1281–1285.
- Cao L., Chen F., Yang X., Xu W., Xie J., Yu L. (2014): Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evolutionary Biology* 14: 1–16.
- Cicenas J., Valius M. (2011): The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137: 1409–1418.
- Crofton J. (1959): Chemotherapy of Pulmonary Tuberculosis. *British Medical Journal* 1: 1610–1614.
- Crona M., Codó P., Jonna V. R., Hofer A., Fernandes A. P., Tholander F. (2016): A ribonucleotide reductase inhibitor with deoxyribonucleoside-reversible cytotoxicity. *Molecular Oncology* 10: 1375–1386.
- Cummings K. M., Proctor R. N. (2014): The Changing Public Image of Smoking in the United States 1964–2014. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 23: 32–36.
- Darzynkiewicz Z., Huang X. (2004): Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Current Protocols in Immunology* 5: 1-18.
- Dębniak T., Lubiński J. (2008): Principles of genetic predisposition to malignancies. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 6: 69–72.
- Demidenko Z. N., Kalurupalle S., Hanco C., Lim C. U., Broude E., Blagosklonny M. V. (2008): Mechanism of G1-like arrest by low concentrations of paclitaxel: next cell cycle p53-dependent arrest with sub G1 DNA content mediated by prolonged mitosis. *Oncogene* 27: 4402–4410.
- Diasio R. B., Johnson M. R. (2000): The role of pharmacogenetics and pharmacogenomics in cancer chemotherapy with 5-fluorouracil. *Pharmacology* 61: 199–203.
- Dobashi Y., Shoji M., Jiang S. X., Kobayashi M., Kawakubo Y., Kameya T. (1998): Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *The American Journal of Pathology* 153: 963–972.
- Doležel J. (1991): Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143–154.

- Doležel J., Bartos J., Voglmayr H., Greilhuber J. (2003): Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A* 51: 127–128.
- Dorak M. T., Karpuzoglu E. (2012): Gender differences in cancer susceptibility: and inadequately addressed issue. *Frontiers in Genetics*. 3: 1–11.
- Drescher H., Weiskirchen S., Weiskirchen R. (2021): Flow Cytometry: A Blessing and a Curse. *Biomedicines* 9: 1–12.
- Drwal M. N., Marinello J., Manzo S. G., Wakelin L. P. G., Capranico G., Griffith R. (2014): Novel DNA Topoisomerase II α Inhibitors from Combined Ligand- and Structure-Based Virtual Screening. *PLoS One* 9: 1–16.
- Easton J., Wei T., Lahti J. M., Kidd V. J. (1998): Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. *Cancer Research* 58: 2624–2632.
- Egea J., López-Muñoz F., Fernández-Capetillo O., Reiter R. J., Romero A. (2022): Alkylating Agent-Induced Toxicity and Melatonin-Based Therapies. *Frontiers in Pharmacology* 13: 1–4.
- Eilers M., Eisenman R. N. (2008): Myc's broad reach. *Genes & Development* 22: 2755–2766.
- Elegheert J., Behiels E., Bishop B., Scott S., Woolley R. E., Griffiths S. C., Byrne E. F. X, Chang V. T., Stuart D. I., Jones E. Y., Siebold C., Aricescu A. R. (2018): Lentiviral transduction of mammalian cells for fast scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. *Nature Protocols* 13: 2991–3017.
- Engel B. E., Cress W. D., Santiago-Cardona P. G. (2015): THE RETINOBLASTOMA PROTEIN: A MASTER TUMOR SUPPRESSOR ACTS AS A LINK BETWEEN CELL CYCLE AND CELL ADHESION. *Cell Health Cytoskeleton* 7: 1–10.
- Ethier C., Tardiff M., Arul L., Poirier G. G. (2012): PARP-1 modulation of mTOR signaling in response to a DNA alkylating agent. *PloS one* 7: 1–17.
- Ezhevsky S. A., Nagahara H., Vocero-Akbani A. M., Gius D. R., Wei M. C., Dowdy S. F. (1997): Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D: Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 10699–10704.
- Faguet G. B. (2015): A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer* 136: 2022–36.
- Fang G., Yu H., Kirschner M. W. (1998): The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & Development* 12: 1871–1873.

Fitzmaurice C., Allen C., Barber R. M., Barregard L., Bhutta Z. A., Brenner H., Dicker D. J., Chimed-Orchir O., Dandona R., Dandona L., Fleming T., Forouzanfar M. H., Hancock J.M., Hay R. J., Hunter-Merrill R., Huynh C., Hosgood H. D., Johnson C. O., Jonas J. B., Khubchandani J., Kumar G. A., Kutz M., Lan Q., Larson H. J., Liang X., Lim S. S., Lopez A. D., MacIntyre M. F., Marczak L., Marquez N., Mokdad A. H., Pinho C., Pourmalek F., Salomon J. A., Sanabria J. R., Sandar L., Sartorius B., Schwartz S. M., Shackelford K. A., Shibuya K., Stanaway J., Steiner C., Sun J., Takahashi K., Vollset S. E., Vos T., Wagner J. A., Wang H., Westerman R., Zeeb H., Zoeckler L., Abd-Allah F., Ahmed M. B., Alabed S., Alam N. K., Aldhahri S. F., Alem G., Alemayohu M. A., Ali R., Al-Raddadi R., Amare A., Amoako Y., Artman A., Asayesh H., Atnafu N., Awasthi A., Saleem H. A., Barac A., Bedi N., Bensenor I., Berhane A., Bernabé E., Betsu B., Binagwaho A., Boneya D., Campos-Nonato I., Castañeda-Orjuela C., Catalá-López F., Chiang P., Chibueze C., Chittheer A., Choi JY., Cowie B., Damtew S., Neves J. d., Dey S., Dharmaratne S., Dhillon P., Ding E., Driscoll T., Ekwueme D., Endries A. Y., Farvid M., Farzadfar F., Fernandes J., Fischer F., GHIWOT T. T., Gebru A., Gopalani S., Hailu A., Horino M., Horita N., Hussein A., Huybrechts I., Inoue M., Islami F., Jakovljevic M., James S., Javanbakht M., Jee S. H., Kasaeian A., Kedir M. S., Khader Y. S., Khang YH., Kim D., Leigh J., Linn S., Lunevicius R., El Razek H. M. A., Malekzadeh R., Malta D. C., Marcenes W., Markos D., Melaku Y. A., Meles K. G., Mendoza W., Mengiste D. T., Meretoja T. J., Miller T. R., Mohammad K. A., Mohammadi A., Mohammed S., Moradi-Lakeh M., Nagel G., Nand D., Nguyen Q. L., Nolte S., Ogbo F. A., Oladimeji K. E., Oren E., Pa M., Park EK., Pereira D. M., Plass D., Qorbani M., Radfar A., Rafay A., Rahman M., Rana S. M., Søreide K., Satpathy M., Sawhney M., Sepanlou S. G., Shaikh M. A., She J., Shiue I., Shore H. R., Shrimme M. G., So S., Soneji S., Stathopoulou V., Stroumpoulis K., Sufiyan M. B., Sykes B. L., Tabarés-Seisdedos R., Tadesse F., Tedla B. A., Tessema G. A., Thakur J. S., Tran B. X., Ukwaja K. N., Uzochukwu B. S. C., Vlassov V. V., Weiderpass E., Terefe M. W., Yebyo H. G., Yimam H. H., Yonemoto N., Younis M. Z., Yu C., Zaidi Z., Zaki M. E. S., Zenebe Z. M., Murray C. J. L., Naghavi M. (2017): Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology* 3: 524–548.

Fluiter K., Housman D., Ten Asbroek A. L., Baas F. (2003): Killing cancer by targeting genes that cancer cells have lost: allele-specific inhibition, a novel approach to the treatment of genetic disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 834–843.

Frankowski M., Theisen J., Kummrow A., Simon P., Ragusch H., Bock N., Schmidt M., Neurkammer J. (2013): Microflow Cytometers with Integrated Hydrodynamic Focusing. *Sensors* 13: 4674–4693.

Fung T. K., Poon R. Y. C. (2005): A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16: 335–342.

Genovese I., Ilari A., Assaraf Y. G., Fazi F., Colotti G. (2017): Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug Resistance Updates* 32: 23–46.

Ghelli Luserna di Rorà A., Cerchione C., Martinelli G., Simonetti G. (2020): A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target. *Journal of Hematology & Oncology* 13: 1–17.

- Goh A. M., Coffill C. R., Lane D. P. (2011): The role of mutant p53 in human cancer. *The Journal of Pathology* 223: 116–126.
- Greenfield G., McMullan R., Robson N., McGimpsey J., Catherwood M., McMullin M. F. (2019): Response to Imatinib therapy is inferior for e13a2 BCR-ABL1 transcript type in comparison to e14a2 transcript type in chronic myeloid leukaemia. *BMC Hematology* 19: 1–9.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70
- Hatok J., Račay P., Hudeček J., Dobrota D. (2006): Genes of multidrug resistance in haematological malignancies. *Biologie* 61: 247–256.
- Hideshima T., Ikeda H., Chauhan D., Okawa Y., Raje N., Podar K., Mitsiades C., Munshi N. C., Richardson P. G., Carrasco R. D., Anderson K. C. (2009): Bortezomib induces canonical nuclear factor- κ B activation in multiple myeloma cells. *Blood* 114: 1046–1052.
- Higgins C. F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8: 67–113.
- Hofseth L. J., Hussian S. P., Harris C. C. (2004): p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* 25: 177–181.
- Champoux J. J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 70: 369–413.
- Chandrasekhar C., Kumar P. S., Sarma P. V. G. K. (2019): Novel mutations in the kinase domain BCR-ABL gene causing imatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients. *Science Reports* 9: 1–17.
- Cheng B., Crasta K. (2017): Consequences of mitotic slippage for antimicrotubule drug therapy. *Endocrine-Related Cancer* 24: 97–106.
- Chin K. V., Ueda K., Pastan I., Gottesman M. M. (1992): Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255: 459–462.
- Israels E. D., Israels L. G. (2000): The cell cycle. *The Oncologist* 5: 510–513.
- Janssen. A.F.J., Breusegem S.Y., Larrieu D. (2022): Current Methods and Pipelines for Image-Based Quantitation of Nuclear Shape and Nuclear Envelope Abnormalities. *Cells* 11: 1–16.
- Javanmard D., Moein M., Esghaei M., Naseripour M., Monavari S. H., Bokharaei-Salim F., Sadeghipour A. (2019): Molecular evidence of human papillomaviruses in the retinoblastoma tumor. *Virusdisease* 30: 360–366.
- Johnson D. G., Walker C. L. (1999): Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 295–312.
- Jordan M. A., Wilson L. (2004): Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* 4: 256–265.

- Kamb A. (1998): Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 227: 139–148.
- Kang Z. J., Liu Y. F., Xu L. Z., Long Z. J., Huang D., Yang Y., Liu B., Feng J. X., Pan Y. J., Yan J. S., Liu Q. (2016): The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese Journal of Cancer* 35: 1–15.
- Karahalil B., Yardim-Akaydin S., Baytas S. N. (2019): An overview of microtubule targeting agents for cancer therapy. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 70: 160–172.
- Kern S. L., Torke S. J., Benjamin J. M., McGarry T. J. (2007): Geminin prevents rereplication during xenopus development. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 5514–5521.
- Khosravi R., Maya R., Gottlieb T., Oren M., Shiloh Y., Shkedy D. (1999): Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14973–14977.
- Kim HS., Lee YS., Kim DK. (2009): Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle arrest and Fas-mediated cell death. *Pharmacology* 84: 300–309.
- Kim J. K., Diehl J. A. (2009): Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *Journal of Cellular Physiology* 220: 292–296.
- Kishimoto T. (2015): Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF. *Chromosoma* 124: 417–428.
- Knudson A. G. Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 820–823.
- Koh SB., Mascalchi P., Rodriguez E., Lin Y., Jodrell D. I., Richards F. M., Lyons S. K. (2017): A quantitative FastFUCCI assay defines cell cycle dynamics at a single-cell level. *Journal of Cell Science* 130: 512–520.
- Kothari A., Hittelman W. N., Chambers T. C. (2016): Cell Cycle-Dependent Mechanisms Underlie Vincristine-Induced Death of Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Cancer Research* 76: 3553–3561.
- Kuwana T., Newmeyer D. D. (2003): Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 691–699.
- Lee C., Hong B., Choi J. M., Kim Y., Watanabe S., Ishimi Y., Enomoto T., Tada S., Kim Y., Cho Y. (2004): Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature* 430: 913–917.
- Liang J., Zhang Z., Zhao H., Wan S., Zhai X., Zhou J., Liang R., Deng Q., Wu Y., Lin G. (2018): Simple and rapid monitoring of doxorubicin using streptavidin-modified microparticle-based time-resolved fluorescence immunoassay. *RSC Advances* 8: 15621–15631.
- Lichtman J. W., Conchello JA. (2005): Fluorescence microscopy. *Nature Methods* 2: 910–919.

Liu R., Kain M., Wang L. (2012): Inactivation of X-linked tumor suppressor genes in human cancer. *Future Oncology* 8: 463–481.

Liu YY., Gupta V., Patwardhan G. A., Bhinge K., Zhao Y., Bao J., Mehendale H., Cabot M. C., Li YT., Jazwinski S. M. (2010): Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and beta-catenin signaling. *Molecular Cancer* 9: 1–15.

Longley D. B., Latif T., Boyer J., Allen W. L., Maxwell P. J., Johnston P. G. (2003): The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells. *Seminars in Oncology* 30: 3–9.

Mantovani F., Collavin L., Del Sal G. (2018): Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death and Differentiation* 26: 199–212.

Maréchal A., Zou L. (2013): DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: 1–17.

Maring J. G., Groen H. J. M., Wachters F. M., Uges D. R. A., de Vries E. G. E. (2005): Genetic factors influencing pyrimidine-antagonist chemotherapy. *The Pharmacogenomics Journal* 5: 226–243.

Martinou J. C., Youle R. J. (2011): Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell* 21: 92–101.

Matsushime H., Roussel M. F., Ashmun R. A., Sherr C. J. (1991): Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65: 701–713.

McKinnon K. M. (2018): Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* 120: 1–16.

Meintières S., Biola A., Pallardy M., Marzin D. (2001): Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis* 16: 243–250.

Mitchison T.J., Pineda J., Shi J., Florian S. (2017): Is inflammatory micronucleation the key to a successful anti-mitotic cancer drug? *Open Biology* 7: 1–9.

Mohammadgholi A., Rabbani-Chadegani A., Fallah S. (2013): Mechanism of the Interaction of Plant Alkaloid Vincristine with DNA and Chromatin: Spectroscopic Study. *DNA Cell Biology* 32: 228–235.

Montano R., Khan N., Hou H., Seigne J., Ernstoff M. S., Lewis L. D., Eastman A. (2017): Cell cycle perturbation induced by gemcitabine in human tumor cells in cell culture, xenografts and bladder cancer patients: implications for clinical trial designs combining gemcitabine with a Chk1 inhibitor. *Oncotarget* 8: 67754–67768.

Mueller P. R., Coleman T. R., Kumagai A., Dunphy W. G. (1995): Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270: 86–90.

- Müller H. J., Boos J. (1998): Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 28: 97–113.
- Nishitani H., Lygerou Z., Nishimoto T. (2004): Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 30807–30816.
- Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K. (2000a): Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. typická MDR. *Klinická Onkologie* 13: 4–9.
- Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K. (2000b): Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi II. Atypická MDR. *Klinická Onkologie* 13: 10–17
- Nunez R. (2001): DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current Issues in Molecular Biology* 3: 67–70.
- Nussbaumer S., Bonnabry P., Veuthey JL., Fleury-Souverain S. (2011): Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta* 85: 2265–2289.
- Ohtsubo M., Theodoras A. M., Schumacher J., Roberts J. M., Pagano M. (1995): Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and Cellular Biology* 15: 2612–2624.
- Oki T., Nishimura K., Kitaura J., Togami K., Maehara A., Izawa K., Sakaue-Sawano A., Niida A., Miyano S., Aburatani H., Kiyonari H., Miyawaki A., Kitamura T. (2014): A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition. *Scientific Reports* 4: 1–10.
- Ozaki T., Nakagawara A. (2011): p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 1–13.
- Pal D., Song I., Wrcak S. D., Song K., Yeom G. S., Saha S., Shinde P. B., Nimse S. B. (2022): Indazole-based microtubule-targeting agents as potential candidates for anticancer drugs discovery. *Bioorganic Chemistry* 122: 1–13.
- Pardee A. B. (1974): A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 1286–1290.
- Paulvich A.G., Toczyski D.P., Hartwell L.H. (1997): When checkpoints fail. *Cell* 88: 315–321.
- Pellegata N. S., Antoniono R. J., Redpath J. L., Stanbridge E. J. (1996): DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 15209–15214.
- Pettitt A. R. (2003): Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 121: 692–702.

- Prota A. E., Bargsten K., Zurwerra D., Field J. J., Díaz J. F., Altmann KH., Steinmetz M. O. (2013): Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* 339: 587–590.
- Qu L., Pan C., He S. M., Lang B., Gao G. D., Wang X. L., Wang Y. (2019): The Ras Superfamily of Small GTPases in Non-neoplastic Cerebral Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12: 1–121.
- Quinlan M. P., Settleman J. (2009): Isoform-specific ras functions in development and cancer. *Future Oncology* 5: 105–116.
- Rahner N., Steinke V. (2008): Hereditary cancer syndromes. *Deutsches Ärzteblatt International* 105: 706–714.
- Riordan J. R., Deuchars K., Kartner N., Alon N., Trent J., Ling V. (1985): Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316: 817–819.
- Roussel M. F. (1999): The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18: 5311–5317.
- Sakaue-Sawano A., Kurokawa H., Morimura T., Hanyu A., Hama H., Osawa H., Kashiwagi S., Fukami K., Miyata T., Miyoshi H., Imamura T., Ogawa M., Masai H., Miyawaki A. (2008): Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132: 487–498.
- Sherr C. J. (1994): G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 551–555.
- Shewach D. S., Kuchta R. D. (2009): Introduction to Cancer Chemotherapeutics. *Chemical Reviews* 109: 2859–2861.
- Shortt J., Johnstone R. W. (2012): Oncogenes in Cell Survival and Cell Death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: 1–9.
- Schafer K. A. (1998): The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology* 35: 461–478.
- Schmit T., Klomp M., Khan M. N. (2021): An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. *Methods in Molecular Biology* 2223: 169–182.
- Schweizer T., Kubach H., Koch T. (2021): Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems. *Automotive and Engine Technology* 6: 275–287.
- Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. (2016): Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66: 7–30.
- Smith J., Tho L. M., Xu N., Gillespie D. A. (2010): The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in Cancer Research* 108: 73–112.
- Sudhakar A. (2009): History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science and Therapy* 1: 1–4.

- Sun W., Yang J. (2010): Functional Mechanisms for Human Tumor Suppressors. *Journal of Cancer 1*: 136–140.
- Sun Y., Liu Y., Ma X., Hu H. (2021): The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences 22*: 1–25.
- Sur S., Agrawal D. K. (2016): Phosphatases and Kinases Regulating CDC25 Activity in the Cell Cycle: Clinical Implications of CDC25 Overexpression and Potential Treatment Strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry 416*: 33–46.
- Szymańska K., Hainaut P. (2003): TP53 and mutations in human cancer. *Acta biochimica Polonica 50*: 231–238.
- Tian J., Liu S., Liu Z., Yang J., Zhu J., Qiao M., Hu X. (2013): Fluorescence quenching and spectrophotometric methods for the determination of daunorubicin with meso-tera (4-sulphophenyl) porphyrin as probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 120*: 7–13.
- Trotter E.W., Hagan I.M. (2020): Release from cell cycle arrest with Cdk4/6 inhibitors generates highly synchronized cell cycle progression in human cell culture. *Open Biology 10*: 1–18.
- Turnbull C., Hodgson S. (2005): Genetic predisposition to cancer. *Clinical medicine (London, England) 5*: 491–498.
- Ullah Z., Lee C. Y., DePamphilis M. L. (2009): Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell Division 4*: 1–15.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. (2003): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation 36*: 131–149.
- Vingon C., Debeissat C., Georget MT., Bouscary D., Gyan E., Rosset P., Herault O. (2013): Flow Cytometric Quantification of All Phases of the Cell Cycle and Apoptosis in a Two-Color Fluorescence Plot. *PLoS One 8*: 1–8.
- Visentin M., Zhao R., Goldman I. D. (2012): The antifolates. *Hematology/Oncology Clinics of North America 26*: 629–648.
- Wang X., Pan L., Mao N., Sun L., Qin X., Yin J. (2013): Cell-cycle synchronization reverses Taxol resistance of human ovarian cancer cell lines. *Cancer Cell International 13*: 1–18.
- Wasylishen A. R., Lozano G. (2016): Attenuating the p53 Pathway in Human Cancers: Many Means to the Same End. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6*: 1–20.
- Wei H. (1992): Activation of oncogenes and/or inactivation of anti-oncogenes by reactive oxygen species. *Medical Hypotheses 39*: 267–270.
- Wei. W., Ayad N. G., Wan Y., Zhang GJ., Kirschner M. W., Kaelin W. G. Jr. (2004): Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature 428*: 194–198.

Yano S., Tazawa H., Hashimoto Y., Shirakawa Y., Kuroda S., Nishizaki M., Kishimoto H., Uno F., Nagasaka T., Urata Y., Kagawa S., Hoffman R. M., Fujiwara T. (2013): A genetically engineered oncolytic adenovirus decoys and lethally traps quiescent cancer stem-like cells in S/G2/M phases. *Clinical Cancer Research* 19: 6495–6505.

Yano S., Tazawa H., Kagawa S., Fujiwara T., Hoffman R. M. (2020): FUCCI Real-Time Cell-Cycle Imaging as a Guide for Designing Improved Cancer Therapy: A Review of Innovative Strategies to Target Quiescent Chemo-Resistant Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 12: 1–17.

Zeegers M. P. A., Jellema A., Ostrer H. (2003): Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer* 97: 1894–1903.

Zhadin N. N., Alfano R. R. (1998): Correction of the internal absorption effect in fluorescence emission and excitation spectra from absorbing and highly scattering media: theory and experiment. *Journal of Biomedical Optics* 3: 171–186.

Zhang X., Sjöblom T. (2021): Targeting Loss of Heterozygosity: A Novel Paradigm for Cancer Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)* 14: 1–17.

Zhu Y., Zhou Y., Shi J. (2014): Post-slippage multinucleation renders cytotoxic variation in anti-mitotic drugs that target the microtubules or mitotic spindle. *Cell Cycle* 13: 1756–1764.

Knihy:

Hayes K. (2021): *Cancer Sourcebook*, 9th Ed. Omnigraphics, Detroit.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts. K., Walters P. (2014): *Molecular biology of the cell*. 6th Ed. Garland Science, New York.

Mierke C.T. (2020): *Cellular Mechanics and Biophysics: Structure and Function of Basic Cellular Components Regulating Cell Mechanics*. Springer Nature Switzerland, Cham.

Katzung B.G. (2015): *Basic & Clinical Pharmacology*, 13th Ed. McGraw-Hill Education, New York.

9 PŘÍLOHY

9.1 Seznam příloh

Příloha 1: Schéma zásobní destičky s roztoky testovaných cytostatik

Příloha 2: Schéma zásobní destičky s použitými kontrolami

Příloha 3: Schéma 384-jamkové pracovní destičky pro MTS test s vyznačenými pozicemi jednotlivých cytostatik

Příloha 4: Schéma 384-jamkové pracovní destičky pro MTS test s výslednými koncentracemi roztoků testovaných cytostatik (koncentrace uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Příloha 5: Schéma 384-jamkové Cell Carrier pracovní destičky pro obrazovou analýzu s vyznačenými pozicemi jednotlivých cytostatik

Příloha 6: Schéma 384-jamkové Cell Carrier pracovní destičky pro obrazovou analýzu s výslednými koncentracemi roztoků testovaných cytostatik (koncentrace uvedeny $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Příloha 1: Schéma zásobní destičky s roztoky testovaných cytostatik.

	1	2	3
A - Irinotekan	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
B - Gemcitabin	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
C - Etoposid	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
D - Oxaliplatina	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
E - Methotrexát	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
F - Dexomethason	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
G - Mitoxantron	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
H - Bleomycin	70 μmol·l ⁻¹	7 μmol·l ⁻¹	0,7 μmol·l ⁻¹
I - Daunorubicin	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
J - 5-Fluoruracil	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
K - Doxorubicin	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
L - Taxol	1 μmol·l ⁻¹	0,1 μmol·l ⁻¹	0,01 μmol·l ⁻¹
M - Vinkristin	0,1 μmol·l ⁻¹	0,01 μmol·l ⁻¹	0,001 μmol·l ⁻¹
N - Mitomycin C	10 μmol·l ⁻¹	1 μmol·l ⁻¹	0,1 μmol·l ⁻¹
O - Hydroxyurea	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹
P - Teniposid	10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	0,1 mmol·l ⁻¹

Příloha 2: Schéma zásobní destičky s použitými kontrolami.

	1	2
A	DMSO	Mitomycin C (30 mmol·l⁻¹)
B	Actinomycin D (0,8 mmol·l⁻¹)	-

Příloha 3: Schéma 384-jamkové pracovní destičky pro MTS test s vyznačenými pozicemi jednotlivých cytostatik.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A		-	M	I	T.	C				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
B		D	1	1	1	1	1	1	1	8	8	8	8	8	8	8	15	15	15	15	15	15	15	15	
C		M	1	1	1	1	1	1	1	8	8	8	8	8	8	8	15	15	15	15	15	15	15	15	
D		S	2	2	2	2	2	2	2	9	9	9	9	9	9	9	16	16	16	16	16	16	16	16	
E		O	2	2	2	2	2	2	2	9	9	9	9	9	9	9	16	16	16	16	16	16	16	16	
F	B		3	3	3	3	3	3	3	10	10	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	B
G	L		3	3	3	3	3	3	3	10	10	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	L
H	A		4	4	4	4	4	4	4	11	11	11	11	11	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	A
I	N	A	4	4	4	4	4	4	4	11	11	11	11	11	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	N
J	K	C	5	5	5	5	5	5	5	12	12	12	12	12	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	K
K		T.	5	5	5	5	5	5	5	12	12	12	12	12	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	
L		D	6	6	6	6	6	6	6	13	13	13	13	13	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	
M			6	6	6	6	6	6	6	13	13	13	13	13	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	
N			7	7	7	7	7	7	7	14	14	14	14	14	14	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
O			7	7	7	7	7	7	7	14	14	14	14	14	14	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
P		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda: 1 - Irinotekan, 2 - Gemcitabin, 3 - Etoposid, 4 - Oxaliplatina, 5 - Methotrexát, 6 - Dexomethason, 7 - Mitoxantron, 8 - Bleomycin, 9 - Daunorubicin, 10 - 5-Fluoruracil, 11 - Doxorubicin, 12 - Mitomycin C, 13 - Teniposid, 14 - Hydroxyurea, 15 - Taxol, 16 - Vinkristin, DMSO - dimethylsulfoxid, MIT.C - mitomycin C, ACT.D - aktinomycin D.

Příloha 5: Schéma 384-jamkové Cell Carrier pracovní destičky pro obrazovou analýzu s vyznačenými pozicemi jednotlivých cytostatik.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	16	16	-	-
B	2	2	2	2	2	2	2	2	17	17	17	17
C	3	3	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-
D	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-
G	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-	-	-
H	7	7	7	7	7	7	7	7	-	-	-	-
I	8	8	8	8	8	8	8	8	-	-	-	-
J	9	9	9	9	9	9	9	9	-	-	-	-
K	10 + 11	10 + 11	10 + 11	10 + 11	10 + 11	10 + 11	10 + 11	10 + 11	-	-	-	-
L	12	12	12	12	12	12	12	12	-	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	13	13	13	13	13	13	13	13	-	-	-	-
O	14	14	14	14	14	14	14	14	-	-	-	-
P	15	15	15	15	15	15	15	15	-	-	-	-

Legenda: 1 - Irinotekan, 2 - Gemcitabin, 3 - Etoposid, 4 - Oxaliplatina, 5 - Dexamethason, 6 - Mitoxantron, 7 - Bleomycin, 8 - Daunorubicin, 9 - 5-Fluoruracil, 10 + 11 - Doxorubicin + Vinkristin, 12 - Taxol, 13 - Mitomycin C, 14 - Hydroxyurea, 15 - Teniposid, 16 - Palbociclib, 17 – Bortezomib

Příloha 6: Schéma 384-jamkové Cell Carrier pracovní destičky pro obrazovou analýzu s výslednými koncentracemi roztoků testovaných cytostatik (koncentrace uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, vinkristin a taxol v $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	13,98	13,98	28,92	28,92	114,67	114,67	272,37	272,37	2,00	2,00	-	-
B	0,10	0,10	0,30	0,30	1,10	1,10	2,69	2,69	49,75	49,75	24,94	24,94
C	3,00	3,00	6,00	6,00	23,94	23,94	58,65	58,65	-	-	-	-
D	23,94	23,94	47,77	47,77	188,38	188,38	272,37	272,37	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	24,94	24,94	49,75	49,75	196,08	198,08	272,37	272,37	-	-	-	-
G	0,10	0,10	0,20	0,20	0,60	0,60	1,60	1,60	-	-	-	-
H	0,03	0,03	0,06	0,06	0,24	0,24	0,60	0,60	-	-	-	-
I	0,10	0,10	0,20	0,20	0,70	0,70	1,80	1,80	-	-	-	-
J	5,00	5,00	10,00	10,00	39,84	39,84	99,01	99,01	-	-	-	-
K	0,40 + 0,10	0,40 + 0,10	0,80 + 0,10	0,80 + 0,10	3,00 + 0,40	3,00 + 0,40	7,50 + 0,99	7,50 + 0,99	-	-	-	-
L	10,00	10,00	30,00	30,00	110,00	110,00	280,00	280,00	-	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	1,00	1,00	2,00	2,00	8,99	8,99	22,95	22,95	-	-	-	-
O	30,90	30,90	61,62	61,62	243,90	243,90	272,37	272,37	-	-	-	-
P	24,94	24,94	49,75	49,75	196,08	196,08	272,37	272,37	-	-	-	-

