

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biologie**

**Vliv Juvenilu na expresi buněčných markerů u  
vybraných buněčných linií**

**Diplomová práce**

Autor: Bc. Marek Šourek  
Studijní program: Biologie a ekologie (N0588A030001)  
Studijní obor: Biologie a ekologie – spec. experimentální biologie  
Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.  
Odborný konzultant: Ing. Jana Čížková, Ph.D.

Hradec Králové

květen 2022

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne 01. 06. 2022

Bc. Marek Šourek

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové PhD., za vedení a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Děkuji také Ing. Janě Čížkové, Ph.D. za její trpělivost, vstřícnost, ochotu při zpracování celé diplomové práce a za odborné vedení experimentální části práce. Dále bych rád poděkoval prof. RNDr. Aleši Macelovi, DrSc., za jeho odborné rady a konzultace nejen k problematice ale i k celému vypracování diplomové práce. Děkuji také RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D., za pomoc při statistickém vyhodnocení dat a prof. RNDr. Zuzaně Kročové, Ph.D., za nastavení experimentu a možnost vypracovat mou práci na Katedře molekulární patologie a biologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Poděkování patří také Lence Lukšíkové za její pomoc a ochotu při práci v laboratoři.

Velké díky patří i mé rodině za podporu během psaní i celého studia, a v neposlední řadě děkuji kolegyni a partnerce Mgr. Tereze Hurdálkové za pomoc a podporu při psaní celé práce.

## **Anotace**

Diplomová práce je zaměřena na zhodnocení vlivu 3 různých koncentrací Juvenilu na 3 lidské buněčné linie (T lymfocyty, B lymfocyty, makrofágy). V rámci dané problematiky jde konkrétně o analýzu změn exprese specifických buněčných aktivačních znaků na povrchu buněk po přidání přípravku Juvenilu do kultivačního média a dále zhodnocení následného vlivu ionizujícího záření na buněčné kultury. Pro vlastní analýzy bude využit průtokový cytometr a bude vyhodnocována změna intenzity fluorescence jednotlivých aktivačních znaků, které jsou v rámci práce sledovány.

Klíčová slova: Juvenil, aktivační znaky, RAMOS, JURKAT, U937,

## **Annotation**

The diploma thesis is focused on the evaluation of the effect of 3 different concentrations of Juvenil on 3 human cell lines (T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages). We analyzed the changes in expression of specific cell activating markers on the cell surface after the addition of Juvenil to the culture medium and the evaluation of the subsequent effect of ionizing radiation on the cell culture are concerned. A flow cytometer will be used for analysis and the change in the fluorescence intensity of individual activation markers, which are monitored in the work, will be evaluated.

Key words: Juvenil, activating markers, RAMOS, JURKAT, U937

## Seznam použitých zkratk

2n	diploidní
ABCB1	gen 1 podrodiny B, která váže ATP (ATP Binding Cassette Subfamily B member 1)
ABCG2 = BCRP	protein odolný proti rakovině prsu (Breast Cancer Resistant Protein)
ANOVA	analýza rozptylu (Analysis of Variance)
Apaf-1	apoptická protéza aktivující faktor 1 (Apoptotic protease activating factor-1)
APC	buňky prezentující antigen (Antigen-Presenting Cell) – v teoretické části práci
APC	allofykocyanin (Allophycocyanin) – v metodice
APC/C	anafázi podporující komplex nebo cyklozom (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome)
Ape1	apurinický/apyrimidinický endonukleázový/redoxní efektorový faktor 1 (Apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox effector factor 1)
ATP	adenosintrifosfát (Adenosine Triphosphate)
Bax	X protein asociující syntézu Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein)
BBB	hematoencefalické bariéry (Blood-Brain-Barrier)
Bcl-2	B-buněčný lymfom-2 (B-cell lymphoma 2)
BCR	Breakpoint Cluster Region protein
CAD	DNáza aktivovaná kaspázou (Caspase-Activated DNase)
CD	shlukové diferenciacní znaky (Cluster of Differentiation)
CD-K	cyklin-dependetní kináza (Cyclin-Dependent Kinase)
CNS	centrální nervová soustava
CT	počítačová tomografie (Computed Tomography)

DISC	signální komplex indukující buněčnou smrt (=Death - Inducing Signaling Complex)
DMSO	dimethylsulfoxid (dimethyl sulphoxide)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
DSB	dvouvláknové zlomy (Double-Strand Breaks)
EE	enteroendokrinní
ER	endoplazmatické retikulum
Erk	extracelulárně regulovaná kináza (Extracellular regulated kinase)
ETC	elektronový transportní řetězec (Electron Transport Chain)
FACS	fluorescencí aktivované třídění buněk (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FADD	protein domény buněčné smrti asociovaný na FAS (FAS-Associated Death Domain protein)
FBS	fetální bovinní sérum (Fetal Bovine Serum)
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát (fluorescein-5-isothiocyanate)
FHP	firma Forever Healthy Products
FRP	firma Forever Rich Philippines
FSC	přední rozptyl (Forward Scatter)
GPxs	glutathionperoxidázy (Glutathione Peroxidases)
H1299	lidská plicní karcinogenní buněčná linie (human non-small cell lung carcinoma cell line)
HE	hovězí extrakt
HE0,15	vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml
HE1,5	vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml
HE15	vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml

HMG2	vysoce mobilní skupina proteinů B2 (High-Mobility Group protein B2)
HPA	osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis)
HR	homologní rekombinace (Homologous Recombination)
IC50	50% inhibiční koncentrace buněčného růstu (half maximal Inhibitory Concentration)
IF	imunofluorescence
IFN- $\alpha$	interferon $\alpha$
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
IL	interleukin
IL2R $\alpha$	interleukin 2 (IL2) receptor alpha
IL2R $\beta$	interleukin 2 (IL2) receptor beta
IL2R $\gamma$	interleukin 2 (IL2) receptor gamma
INPP5D	inositolpolyfosfát-5-fosfatáza D (Inositol Polyphosphate-5-phosphatase D)
IZ	ionizující záření
LPS	lipopolysacharid
Ltd.	zahraniční společnost s ručením omezeným (Limited, event. Limited by Shares)
MFI	medián intenzity imunofluorescence
MPT	přechodový pór mitochondriální permeability (Mitochondrial Permeability Transition pore)
mRNA	mediátorová RNA
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NHEJ	dvojím nehomologním spojováním konců (Non-Homologous End Joining)
NHLF	normální lidské plicní fibroblasty (Normal Human Lung Fibroblasts)



NK	buňka „přirozený zabiják“ (Natural Killer cell) – teoretická část práce
NK	negativní kontrola – metodika
OZ	ozáření/é
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate-Buffered Saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PE	fykoerythrin (phycoerythrin)
PHA	phytohaemagglutinin
PI	propidium jodid (Propidium Iodide)
PI3K	fosfatidylinositol 3 kináza (Phosphatidylinositol 3 Kinase)
PMA	forbol 12-myristát 13-acetát (phorbol 12-myristate 13-acetate)
PP	Peyerovy pláty (Peyer's Patch)
Prx	peroxiredoxiny (Peroxiredoxins)
PTEN	homologní gen pro fosfatázu a tenzin (Phosphatase and Tensin homolog)
RNA	ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
RNS	reaktivní formy dusíku (Reactive Nitrogen Species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
RP105	Radioprotektivní protein o velikosti 105 kDa (Radioprotective 105kDa Protein)
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RPMI	institut Roswell Park Memorial (Roswell Park Memorial Institute)
rRNA	ribosomální RNA
RTG	rentgenové záření (Radioisotope Thermal Generators)
RTN112	Lyastin
RTN121	Silexil

RTN33	Retisin
SAC	spindle assembly checkpoint
siRNA	malá interferující ribonukleová kyselina (small interfering RNA)
SOD	superoxiddismutáza (Superoxide Dismutase)
SPOFA	Spojené farmaceutické závody
SSB	jednovláknové zlomy (Single-Strand Breaks)
SSC	boční rozptyl (Side Scatter)
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	nádor nekrotizující faktor $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor alpha)
TNFR1	receptor nádorového nekrotického faktoru 1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1)
TPA	12- <i>O</i> -tetradekanoylforbol-13-acetát (12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetate)
TRAIL	ligand indukující apoptózu související s faktorem nádorové nekrózy $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ -related Apoptosis-Inducing Ligand)
tRNA	transferová RNA
UV	ultrafialové záření (Ultraviolet)
VS	viditelné světlo
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
$W_r$	radiační váhový faktor (radiation Weighting factor)

# Obsah

Úvod .....	13
1 Literární rešerše.....	15
1.1 Základní informace o buňce.....	15
1.2 Vliv ionizujícího záření (IZ) na buňky .....	16
1.2.1 Chemické a biologické důsledky expozice IZ .....	18
1.2.2 Obrana buňky před ROS .....	21
1.3 Buněčný cyklus.....	22
1.3.1 Regulace buněčného cyklu.....	25
1.3.2 Buněčný cyklus a tvorba tumoru .....	27
1.4 Apoptóza.....	28
1.5 Průtoková cytometrie.....	31
1.6 Juvenil .....	35
1.6.1 Historie .....	38
1.6.2 Ovlivnění buněčného metabolismu .....	39
1.7 Buněčné linie.....	44
1.7.1 RAMOS.....	44
1.7.2 JURKAT.....	44
1.7.3 U937 .....	46
2 Cíle práce .....	48
3 Metodika.....	49
3.1 Použitý materiál.....	49
3.2 Buněčné linie.....	50
3.2.1 Buněčná linie Ramos .....	50
3.2.2 Buněčná linie Jurkat .....	50
3.2.3 Buněčná linie U937 .....	50
3.3 Kultivace buněk .....	50
3.4 Rozmražení buněk.....	51

3.5	Pasáž buněk.....	51
3.6	Nasazení buněk do pokusu.....	53
3.7	Barvení buněk.....	54
3.8	Průtoková cytometrie.....	55
3.9	Statistické vyhodnocení.....	56
4	Výsledky.....	57
4.1	Buněčná linie Jurkat.....	57
4.2	Buněčná linie U937.....	61
5	Diskuze.....	68
	Závěr.....	71
	Seznam použité literatury.....	72

# Úvod

V dnešní době plné spěchu, stresu a rychlého občerstvení se snadno rozšiřují choroby související s nezdravým životním stylem. Proto je kladen velký důraz nejen na léčbu, ale také na prevenci. Mnoho lidí ale nechce svůj styl života radikálně měnit, a proto se čím dál více lidí začíná spoléhat na volně prodejné doplňky stravy. Obor, který se zabývá zaváděním volně prodejných doplňků stravy ovlivňujících imunitní systém do klinické praxe, se nazývá imunomodulace. Imunomodulace zahrnuje dva základní postupy: antigen nespecifické postupy a antigen specifické postupy. Doplňky stravy jsou nejčastěji užívány pro podporu imunity, tzv. imunostimulaci, která patří do antigen nespecifických postupů a je velmi zkoumána v souvislosti s opakovanými infekcemi dýchacích cest, alergickými a onkologickými nemocemi. Existuje několik volně prodejných imunomodulátorů: bakteriální imunomodulátory (př.: GS Imunostim), beta-glukany (př.: Imunoglukan, Imunaktiv, Imunit), *Echinacea* sp. (př.: GS *Echinacea* aktiv, Walmark *Echinacea*), atd., které sami o sobě reagují se složkami nespecifické imunity, takže jejich užívání simuluje napadení organismu infekcí. Dále existují látky, které jsou založeny na bázi cizorodých organismů a vstupují tak do vzájemných vztahů se střevním imunitním systémem. Jsou to například probiotika (př.: Probian, Salutil, Synbio), nukleotidy (př.: Preventan, Juwík, Juwitamin), aminokyseliny (př.: Cubitan, Cubison) a Omega-3/omega-6 nenasycené mastné kyseliny (př.: Hema-rybí tuk, Marin-Q) (Végh a Végh 2008).

Mnoho doplňků stravy je extrahováno z rostlin nebo z živočichů. V mé diplomové práci jsem se zaměřil na alkohol-éterový extrakt z hovězí tkáně, která je používána v takových doplňcích stravy jako je Retisin, Juvenil/Imuregen, Actovegin a Solcoseryl. Tento extrakt, poprvé připravený ve 20. století v Československu, nemá prokázané žádné vedlejší škodlivé účinky na organismus (Kubelkova et al. 2021). Alkohol-éterový extrakt je základem pro dva základní analogické produkty: Juvenil a Imuregen, které si liší jen v drobnostech. Jedná se o unikátní doplněk stravy, který má pozitivní účinek na buněčnou imunitu a energii, regeneraci tkání, hojení ran, opravu endokrinních žláz, střevní integritu, posílení paměti a má protinádorové účinky (Kubelkova a Macela 2019).

Široce testován byl tento extrakt především ve spojitosti s tvorbou nádorů, jelikož se jedná o civilizační chorobu a lidé stále hledají nové přístupy léčby a prevence. V současné době existují dva přístupy protinádorové léčby: lokální (chirurgie, radioterapie) a systémová (chemoterapie, imunoterapie, hormonální léčba a biologická terapie). Imunoterapie využívá pro léčbu cytokiny (např.: IFN- $\alpha$  a IL-2), které jsou produkovány imunitními

buňkami v případě stimulace stresovým faktorem (např.: infekce). Není jisté, jaký byl mechanismus účinku tohoto extraktu, nicméně je zajímavé, že byl podáván injekčně bez indukce zánětlivé odpovědi. Známe je, že samotné složky Juvenilu mohou být farmakologicky a fyziologicky aktivní. Působí na životaschopnost nádorové buněčné linie, má cytostatický/cytotoxický účinek na buňky, ovlivňuje viabilitu ozářených nádorových buněk a nemá vliv na nenádorové buněčné linie (Duskova et al. 2019).

# 1 Literární rešerše

## 1.1 Základní informace o buňce

Buňka je nejmenší morfologickou a funkční jednotkou organismu, která je schopná vykonávat všechny základní životní funkce. Dle buněčné teorie, všechny životní děje probíhají v buňce nebo jsou uskutečňovány vzájemnými vztahy mezi buňkami. Jeden z definujících znaků eukaryotické buňky je přítomnost jádra. Funkcí jádra je mimo uchování a ochrany genetické informace také replikace DNA, regulace buněčného metabolismu syntézou různých enzymů a syntéza RNA a ribozomů (Allarakha 2021). Uvnitř jádra se nachází jadérko, jehož funkcí je syntéza ribozomální RNA, která se podílí na vzniku ribozomů v cytoplasmě (Hacock a Boulikas 1982). Od mechanismů buněčné syntézy proteinů, která se nachází v cytoplasmě, je DNA oddělena jadernou membránou. Jaderná membrána chrání genetickou informaci a všechny molekuly, které se podílejí na zpracování a ochraně těchto informací, před patogeny, enzymy a potenciálně škodlivými produkty metabolismu tuků a bílkovin. Tato membrána se skládá ze dvou fosfolipidových dvojvrstev (O'Connor a Adams 2010).

V buňce můžeme najít ještě další organely, které jsou ohraničené membránou. Membrána organelám slouží především k příjmu surovin a vylučování metabolitů a vedlejších produktů. Mezi takové organely můžeme zařadit endoplazmatické retikulum (ER). ER plynule přechází z jaderné membrány. Rozlišujeme drsné ER a hladké ER podle přítomnosti drobných organel zvaných ribozomy sloužících k syntéze proteinů. Funkcí hladkého endoplazmatického retikula je odstraňování toxických látek a uvolňování vápenatých iontů. Drsné endoplazmatické retikulum má na svém povrchu přisedlé ribozomy a specializuje se na syntézu bílkovin a většiny složek buněčné membrány i látek určených pro export z buňky. Tyto látky přijímá organela zvaná Golgiho aparát, který na ER navazuje (NHGRI 2022a).

Golgiho aparát je membránou vázaná organela, která je tvořena řadou naskládaných váčků. Je zodpovědný za transport, modifikaci a balení proteinů a lipidů do vezikul vázaných na membránu, které se pak translokují do buněčné membrány. Na membráně se obsah vezikuly stane součástí buněčné membrány, nebo se uvolní ven (Rogers 2021).

Vnitrobuněčné trávení buňky probíhá v lyzozomech, což jsou malé nepravidelné organely. Po trávení uvolňují lyzozomy živiny a odbourávají nežádoucí molekuly pro recyklaci nebo vyloučení (NHGRI 2022b). Dalšími organelami jsou peroxizomy. Peroxizomy jsou malé

váčky, které jsou ohraničené membránou a jsou důležité pro odbourávání nebezpečného peroxidu vodíku (Cooper 2000).

Dalšími velmi důležitými organelami v buňce jsou mitochondrie. Mitochondrie jsou dle teorie endosymbiózy drobné semiautonomní organismy v buňce, které jsou oddělené od cytoplazmy dvěma membránami. Obsahují vlastní genetický materiál a další složky, které jsou nezbytné pro fungování a replikaci mitochondrií jako nezávislých organel. Mitochondrie tedy obsahují svojí unikátní DNA, rRNA, tRNA a mRNA, ribozomy, RNA a DNA polymerázy a další složky zajišťující proteosyntézu (Rabinowitz a Swift 1970). Mitochondrie fungují jako generátory chemické energie pro buňku. energii získávají z oxidace přijatých živin a on samy produkují energii adenosintrifosfátu (ATP), což je základní palivo pro většinu buněčných aktivit. Celý tento proces se nazývá buněčné dýchání a je podobný dýchání lidskému, protože i při buněčném dýchání je spotřebováván kyslík a uvolňován oxid uhličitý. Různé buňky mají různý počet mitochondrií. Například svalové, jaterní nebo mozkové buňky obsahují vyšší počet mitochondrií, protože potřebují více energie (O'Connor a Adams 2010).

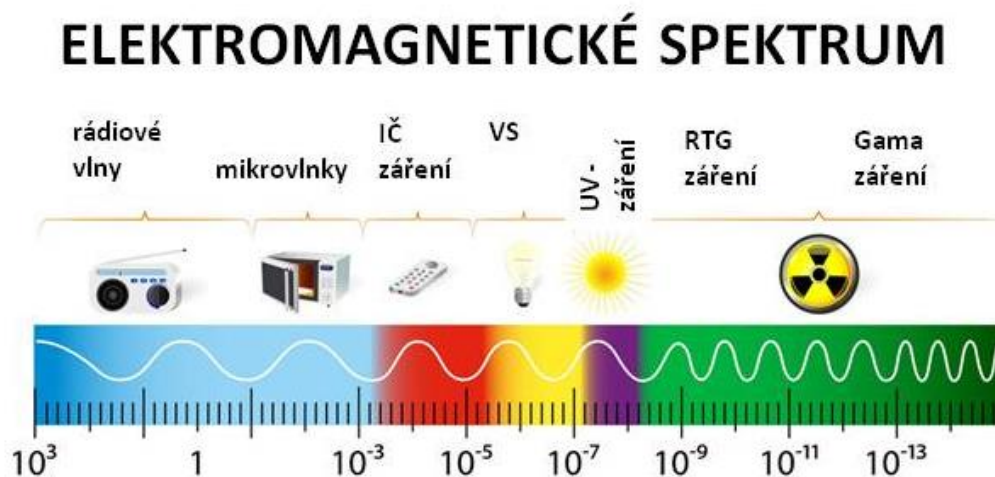
Veškeré organely jsou v buňce uloženy v cytoplazmě, která vyplňuje celý prostor buňky. Skládá se z vody, solí a různých organických molekul. Část cytoplazmy, která není obsažena v organelách, se nazývá cytosol. Cytoplazma je vysoce organizovaná díky proteinovým skeletům nazývaným cytoskelet, který poskytuje cytoplazmě a buňce její strukturu (Britannica 2019).

## **1.2 Vliv ionizujícího záření (IZ) na buňky**

Záření se dělí na ionizující a neionizující. Většina záření v přírodě je neionizujícího typu (např.: UV záření ze Slunce nebo infračervené záření) (viz obrázek 1). Ionizující záření je však mnohem agresivnější a škodlivější díky schopnosti indukovat atomovou ionizaci a narušit chemické vazby molekul, což vede k biologickým změnám. IZ se vyskytuje v několika variantách. Nejprve to je rentgenové a gama záření, které ovlivňují organismus nepřímo, což znamená, že přímo nenarušují atomovou strukturu, ale když dojde k jejich absorpci, odevzdají svou energii a ta naruší vazby mezi látkami. Mezi těmito druhy záření není velký rozdíl. Jediný rozdíl je ve zdroji. Rentgenové záření je vyráběno elektrickým zařízením, kdežto gama záření je vyzařováno nestabilními nebo radioaktivními izotopy. Druhou variantou IZ jsou rychle se pohybující vysokoenergetické částice hmoty s nábojem nebo bez něj, které jsou schopny vytlačit atomové elektrony a usnadnit řetězovou reakci vyvržení elektronů. Existuje několik typů ionizujícího záření (částice alfa, beta, rentgenové a gama záření) (Hall a Kereiakos 2001). Částice alfa nebo beta mohou být zastaveny



fyzickými bariérami, jako je list papíru, respektive hliníková deska. Proto nejsou pro životní prostředí takovou hrozbou, jako je rentgenové a gama záření. Všechny čtyři typy IZ jsou hojně využívány v terapeutické praxi (Reisz et al. 2014).



Obrázek 1: Schéma elektromagnetického spektra. Zkratky: IČ = infračervené; VS = viditelné světlo; UV = ultrafialové; RTG = rentgenové (VectorStock 2022 - upraveno).

Mezinárodní měrnou jednotkou pro absorbované záření je Gray (Gy) a je definovaná jako J/kg exponovaného jedince. Měří se jako množství energie absorbované ve tkáních. Negativní důsledky expozice člověka IZ se posuzují podle zdroje záření, dávky záření, délky expozice a genetické a epigenetické struktury záření. Genetika a epigenetika mohou určit pravděpodobnost, že se u jedince vyvine tumor, nebo jak bude jedinec reagovat na následnou léčbu (Reisz et al. 2014). Jelikož stejná dávka IZ může vyvolat různé účinky, používá se ještě alternativní jednotka a to sievert (Sv). Jedná se o ekvivalentní jednotku a vypočítá se jako absorbovaná dávka v Gy vynásobená radiačním váhovým faktorem ( $W_T$ ). U této veličiny záleží na zdroji záření. Obecně platí, že pro rentgenové a gama záření jsou Gy a Sv zaměnitelné a 1 Gy rentgenového záření odpovídá 1 Sv. Průměrně jsou lidé vystaveni záření v průměru 3 mGv/rok z přírodních zdrojů (Khong et al. 2013). Vystavení dávce 4-5 Gy je pro 50 % populace smrtelné (Hall a Kereiakes 2001).

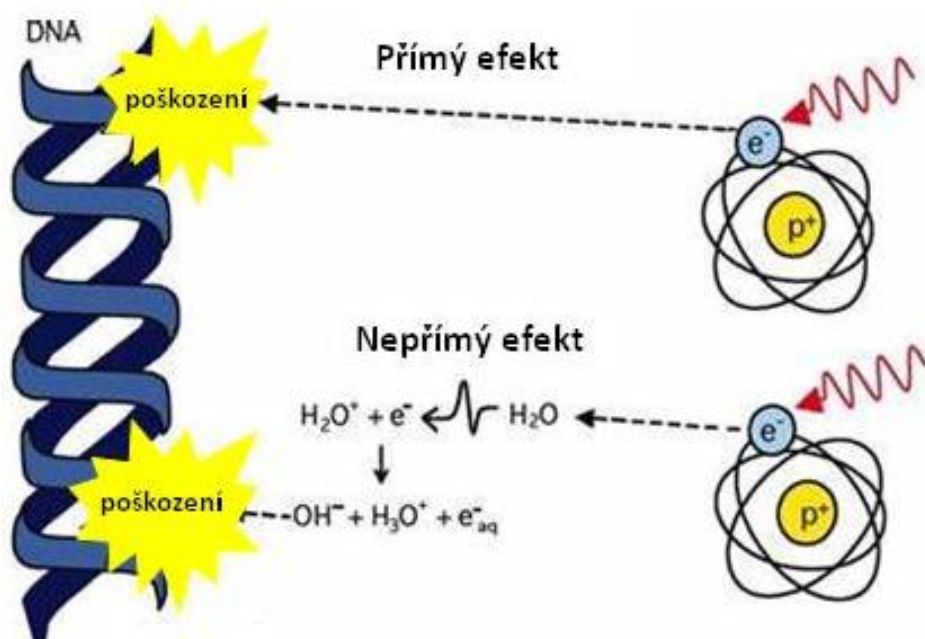
Nízké dávky ionizujícího záření je člověk vystaven například při vyšetření rentgenovými paprsky, včetně CT, což je typ záření podobný gama záření, ale s nižší energií. Naopak vysokým dávkám je člověk vystaven například při radioterapii nebo při jaderné katastrofě. Gama záření používané ve výzkumu a v terapiích je především z umělých zdrojů jako je  $^{60}\text{Co}$  a  $^{137}\text{Cs}$  (Reisz et al. 2014). CT vyšetření poskytuje lepší podrobnosti o lidském těle než rentgen, ale pacient je vystaven vyšší dávce záření (cca 15–30 mGy oproti 0,01–0,15 mGy) (Breimer 1988). Časté vystavení paprskům z CT vyšetření je spojeno s poškozením DNA,

tkání a někdy i karcinogenezí (Ma et al. 2013). Velké riziko karcinogeneze je především u dětí, u kterých by se expozice měla omezovat (Reading 2012).

Nutno říct, že vystavení nízké dávce IZ může zvýšit imunitu a adaptivní odpověď, která zlepšuje ochrannou reakci na následnou vysokou dávku IZ, což je hlavní otázka pro výzkum prevence a léčby rakoviny (Pauwels a Bourguignon 2011). Nízké dávky IR změnilo odezvu DNA reparačního fosforylovaného histonu H2AX a zvýšilo sekreci cytokinů v porovnání s buňkami neovlivněnými IZ (Reisz et al. 2014).

### 1.2.1 Chemické a biologické důsledky expozice IZ

K nejběžnějšímu biologickému důsledku expozice IZ se řadí poškození na úrovni DNA. Buněčné makromolekuly mohou být ovlivněny přímou ionizací, nebo nepřímo – reaktivitou vysokoenergetických látek vznikajících z radiolýzy vody (viz obrázek 2) (Wardman a von Sonntag 1995).



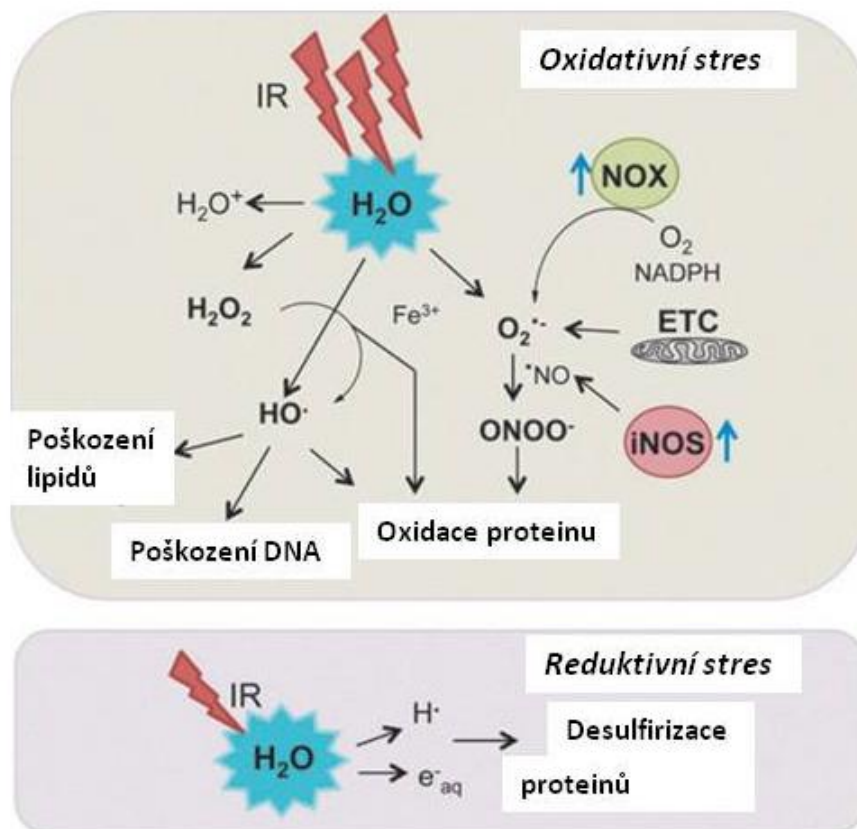
Obrázek 2: Poškození DNA z důvodu expozice IZ se děje buď přímo nebo nepřímo prostřednictvím radiolýzy vody (Morgan a Sowa 2005 - upraveno).

Při přímé interakci je foton z IZ absorbován médiem, což vybudí elektrony, které tím získají energii a začnou se pohybovat rychleji. Tyto rychlé elektrony poté přímo rozbíjejí vlákno DNA (Hall a Kereiakes 2001). Při nepřímé interakci IZ rychlé elektrony naráží na molekuly vody v buňce za vzniku hydroxylového radikálu (OH·), který způsobí přerušení vláknů DNA. V buňce dojde také k prolomení vazeb S-H, O-H, N-H a C-H a k dvěma typům

stresu. Prvním typem je oxidativní stres, při kterém vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), hydroxylový radikál ( $\text{OH}^\cdot$ ) a ionizovaná voda ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ). Následně dojde k vytvoření sekundárních ROS jako je superperoxid ( $\text{O}_2^\cdot$ ) a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Druhým typem je reduktivní stres, kdy po prolomení vazeb dochází k vytvoření vodíkového radikálu ( $\text{H}^\cdot$ ) a hydratovaných elektronů, což vede ke ztrátě síry v proteinových methionových a cysteinových zbytcích (Singh a Singh 1982). Chemické kaskády, které následují, vytvářejí další molekuly, které poškozují buňku. Například dochází ke spojení  $\text{O}_2^\cdot$  s endogenním oxidem dusnatým (NO) a vzniká peroxydusitanový aniont ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) (Darley-usmar et al. 1992). Peroxydusitanová kyselina ( $\text{ONOOH}$ ), která z tohoto aniontu může vzniknout, spadá pod škodlivé reaktivní formy dusíku (RNS), které společně s ROS jsou pro buňku zvláště škodlivé, jelikož mění buněčnou signalizaci a řadu metabolických drah (Reisz et al. 2014) (viz obrázek 3).

Po indukci ROS v reakci na IZ dojde k endogenní propagaci v intracelulárních systémech produkujících ROS, například nikotinamidadeninukleotid fosfát (NADPH) a mitochondriální elektronový transportní řetězec (ETC) (Azzam et al. 2012). Du et al. (2009) zjistili, že expozice IZ v nádorových buňkách zvyšuje syntézu ROS a RNS závislých na mitochondriích. Tyto mitochondriálně-závislé reaktivní formy zvýšili radiosenzitivitu a přežití celých buněk při nízké dávce IZ. Kergonou et al. (1981) ve svých pokusech zjistili, že při celotělovém ozáření u potkanů docházelo k zvýšené aktivitě cytochrom c oxidázy a NADPH – cytochrom c reduktázy, ke snížené antioxidační aktivitě a zvýšené peroxidaci lipidů. Obdobně Yamamori et al. (2012) při ozáření buněk A549 zjistili, že produkce mitochondriálních ROS vedla u těchto buněk ke zvýšení membránového potenciálu, podpoře dýchání a syntézy ATP. NADPH oxidáza se může aktivovat ceramid signalizací při expozici IZ a k této aktivaci stačí 2,5 Gy IZ. Při této dávce IZ dochází k produkci mitochondriálních ROS, které mohou blokovat inhibitory mitochondriálního dýchání (Choi et al. 2007).

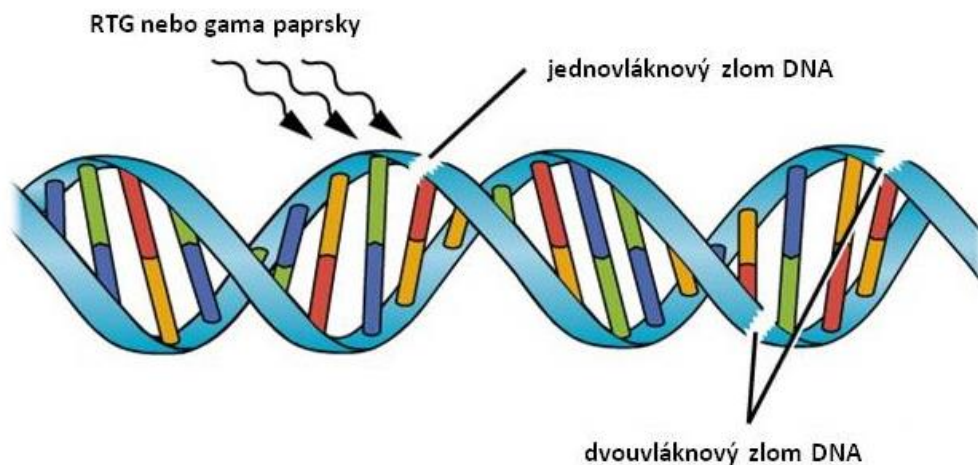
Dočasné šíření důsledků expozice IZ je zprostředkováno nitrosativním stresem. Tento pojem označuje řadu chemických reakcí, ve kterých je zapojen dusík. Například při expozici IZ dochází k expresi syntázy oxidu dusnatého iNOS, což vede ke zvýšení hladiny NO (významný prekurzor  $\text{ONOO}^\cdot$  a dalších RNS) *in vitro* a nitrovaných tyrosinových zbytků *in vivo* (Gorbunov et al. 2000).



Obrázek 3: Komplexní chemická kaskáda ROS/RNS vzniklá přímo z IZ a z odvozených systémů (Reisz et al. 2014 - upraveno).

Při poškození buňky IZ přestane buňka proliferovat, syntetizovat DNA, zpomaluje se mitóza (případně do ní vůbec nevstupuje), poškozují se její proteinové signální sítě, praská její membrána, buňka stárne a umírá. Výjimku tvoří velmi vzácné mutace v proteinkináze, které jsou extrémně citlivé na toto záření (Hunt et al. 2011).

Poškození DNA je nejčastěji ve formě zlomů (viz obrázek 4). V případě, že zlom bude pouze na jednom vlákně, buňka zahájí reparační mechanismy a vlákno opraví podle komplementárního druhého vlákna ve šroubovici. Problém nastává, pokud se objeví zlomy na obou vláknech DNA = DSB (double-strand breaks). V tom případě se kus chromatinu rozdělí na dva. Opětovné spojení dvou DSB je pro buňku fatální především ve chvíli, kdy se spojí tak, že vzniknou dicentrické a acentrické fragmenty. Pokud po spojení vznikne jeden chromozom skládající se ze dvou chromatid bez centromery, dojde k jeho ztrátě během buněčného dělení, ale pokud vznikne aberantní chromozom se dvěma centromerami, dojde k přerušení mitózy. Tyto aberace představují hlavní mechanismus smrti buňky vlivem IZ. Karcinogeneze vyvolaná IZ je způsobována translokací onkogenu v klidovém místě do aktivního chromozomálního místa (Hall a Kereiakes 2001).



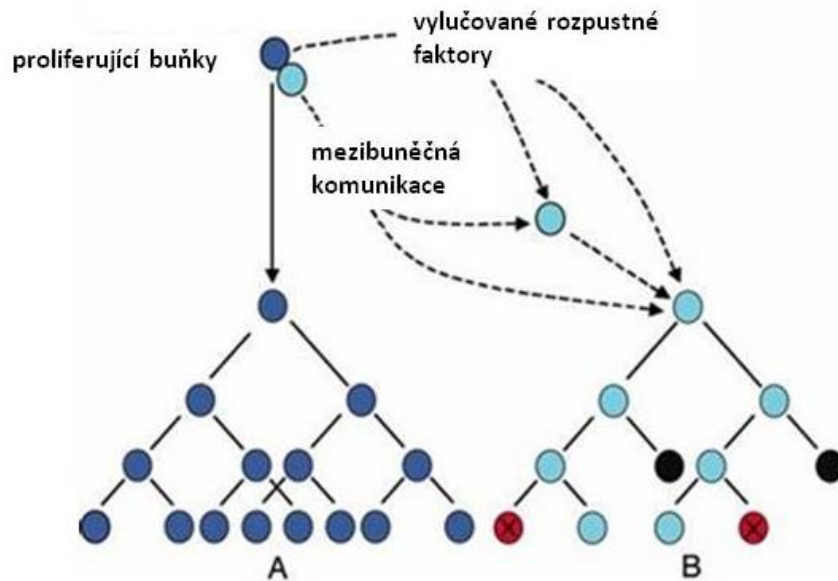
Obrázek 4: Typy zlomů na DNA po expozici rentgenovému nebo gama záření (Lumen 2022-upraveno).

V případě, že byla buňka vystavena IZ, dojde k poklesu antioxidantů s nízkou molekulovou hmotností. V reakci na tento pokles dojde k aktivaci buněčných transkripčních faktorů a to vede ke zvýšené expresi detoxikačních mechanismů ROS (McDonald et al. 2010).

Expozice IZ má vliv především na nukleové kyseliny, lipidy a proteiny. Mezi negativní důsledky expozice IZ na DNA patří škodlivé změny bází a cukrů, tvorba křížových vazeb, jedno – nebo dvouvláknové zlomy (SSB/DSB) a shlukování DNA (Thompson 2012). Pro nukleové kyseliny je nejškodlivější  $\text{OH}\cdot$  z radiolýzy vody. U purinových nukleobází se  $\text{OH}\cdot$  aduje na C4, C8 a vytváří aduktové radikály (nejčastěji 8-hydroxypuriny). Pyrimidinové báze  $\text{OH}\cdot$  také aduje na C5 a C6 za přítomnosti kyslíku za vzniku pyrimidinových glykolů (Reisz et al. 2014). Z lipidů ovlivňuje expozice IZ nejvíce membránové lipidy. Více než přímé záření poškozují buňky produkty radiolýzy vody (Benderitter et al. 2003). Záření způsobuje peroxidaci lipidů (především polynenasycených mastných kyselin), což zvyšuje permeabilitu membrán a narušení iontových gradientů (Reisz et al. 2014).

### 1.2.2 Obrana buňky před ROS

V případě přímého poškození IZ dojde okamžitě k aktivaci procesů opravy DNA. Tyto procesy zahrnují odstranění lézí na DNA, nebo genovou mutaci či chromozomální přestavbu. Genová mutace nebo chromozomální přestavba je ale nežádoucí, jelikož zátěž z ozáření nezmizí, ale zůstane v buňkách a může se dál šířit skrz potomstvo. Bylo zjištěno, že účinky IZ se mohou objevit dokonce i v buňkách, které nebyly přímo ozářeny IZ, ale byly v určité vzdálenosti od zasažených buněk (viz obrázek 5) (Morgan a Sowa 2005).



Obrázek 5: Ozářená buňka (tmavě modrá barva) přenáší mutace na potomstvo, což může iniciovat karcinogenní proces u potomstva (schéma A), ale také komunikuje se soudními neozářenými buňkami (bledě modrá barva) prostřednictvím mezibuněčné komunikace (gap junction) a/nebo vylučováním rozpustných faktorů vyvolávající necílenou apoptózu (černá barva) nebo mikronukleace (červená barva) v buňkách, které nebyly nikdy exponovány IZ (schéma B) (Morgan a Sowa 2005 - upraveno).

Obrana buňky je založená na detoxikačních enzymech a schopnosti určitých molekul metabolizovat ROS. Superoxid ( $O_2^-$ ) je dismutován na  $H_2O_2$  a  $O_2$  pomocí superoxidodismutáz (SOD).  $H_2O_2$  je detoxikován prostřednictvím peroxiredoxinů (Prx) a glutathionperoxidáz (GPxs). Udržet hladinu ROS na přijatelné hladině pomáhají také endogenní antioxidanty s nízkou molekulovou hmotností (např.: glutathion, askorbát, melatonin, kyselina lipoová, ubi chinon a vitamín E). Všechny tyto látky cílí na produkty radiolýzy vody (Reisz et al. 2014).

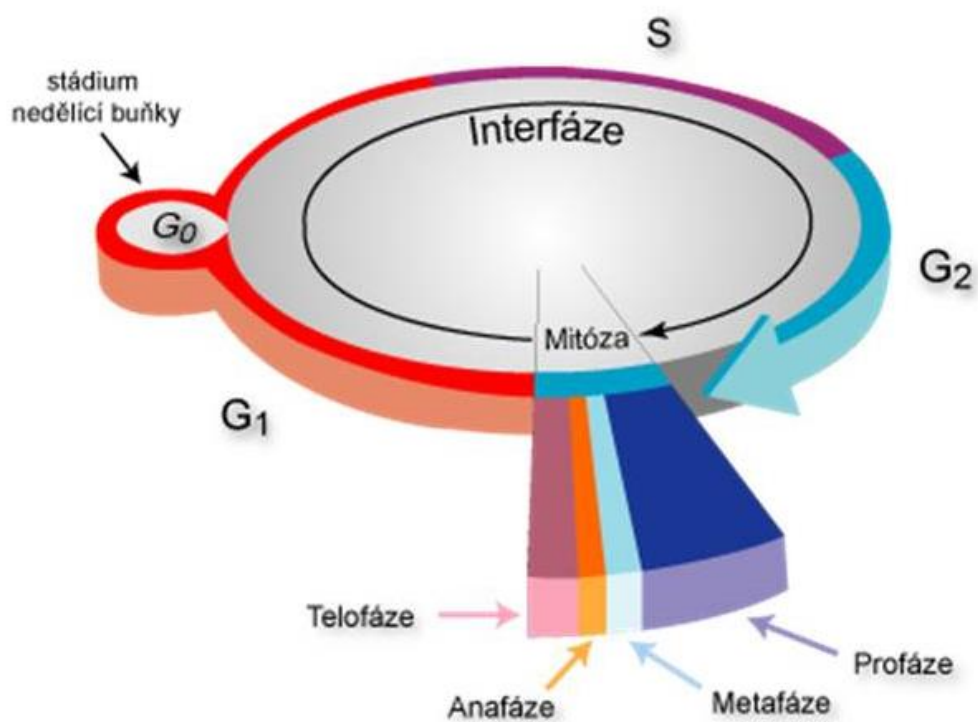
### 1.3 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je přirozený proces replikace DNA a dělení buňky. Jeho součástí je série koordinovaných událostí, které tvoří opakovaný cyklus (Collins et al. 1997). Principy dělení buňky a kontroly buněčného dělení byly poprvé popsány v roce 1988 (Dunphy et al. 1988).

Buněčný cyklus se skládá ze čtyř po sobě jdoucích fází (viz obrázek 6). Začátek buněčného cyklu je v  $G_1$  fázi (z anglického slova growth = růst), kdy buňka intenzivně roste, dotvořuje orgány, tvoří RNA a proteiny, připravuje se zásoba nukleotidů a enzymů pro replikaci DNA (Puck a Steffen 1963). Z této fáze může buňka vstoupit do  $G_0$  fáze (klidové fáze), která není ale povinná, a tudíž se nepočítá do buněčného cyklu, ale stojí na jeho okraji. Druhou fází je S-fáze (z anglického slova sythesis = syntéza), kdy buňka replikuje svou DNA a na



konci této fáze je každý chromozom duplicitní a buňka je tedy tetraploidní. Třetí fází je  $G_2$  fáze, při které dochází ke zdvojování organel a centrozomů, buňka se připravuje na mitózu a roste. Vytváří se struktury potřebné pro mitotické dělení (mitotická vřeténka). Při  $G_1$  i  $G_2$  fázi je buňka citlivá na podněty z růstových signalizačních sítí. Všechny tři zmíněné fáze se souborně nazývají interfáze. Poslední fází buněčného cyklu je M fáze (z anglického slova mitosis = mitóza), při kterém dojde k rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřinné (viz obrázek 7). Nejprve dojde k rozdělení jádra (karyokinezi) a poté k rozdělení celé buňky (cytokinezi) (Murray a Hunt 1993).



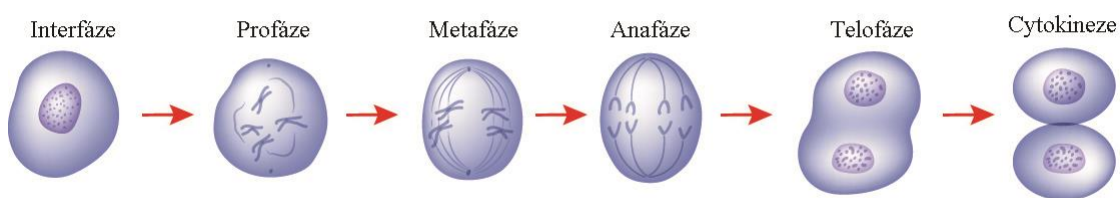
Obrázek 6: Fáze buněčného cyklu (Urban 2014).

Prvním stádiem mitotického dělení je profáze, kdy dochází k rozpadu jaderné membrány, mizí jadérko a chromatin se kondenzuje a díky tomu je možné chromozomy sledovat pod světelným mikroskopem. V této fázi z centrozomů vyrůstá dělicí vřeténko, které se napojuje na centromeru chromozomů pomocí kinetochoru (Bmedic ONLINE 2022).

Následujícím stádiem je metafáze. Chromozomy se při ní řadí do ekvatoriální (středové) roviny buňky, dělicí vřeténka centrozomů jsou již napojena na centromery chromozomů a centromery se nacházejí na opačných pólech buňky (Musilová 2009).

Třetí fází mitózy je anafáze. Při anafázi dochází ke zkracování dělicího vřeténka a rozdělení chromozomů na dvě sesterské chromatidy. Jak se mikrotubuly dělicího vřeténka zkracují, dochází k tažení chromatid k opačným pólům buňky. Sesterské chromatidy mají shodnou genetickou informaci, takže i dceřiné buňky budou geneticky shodné (Bmedic ONLINE 2022).

Poslední částí mitózy je telofáze. Při ní dochází k opětovnému vzniku jaderné membrány (tentokrát dvou membrán okolo oddělených chromatid na opačných pólech buňky), chromozomy se despiralizují, vzniká jadérko a zaniká dělicí vřeténko. Po konci telofáze dochází k rozdělení buňky (cytokinezi) (Li 2016).



Obrázek 7: Přehled jednotlivých stádií M fáze včetně dějů probíhajících v buňce (Bmedic ONLINE 2022).

Výsledkem cytokineze jsou dvě buňky, které obsahují jádro se stejnou genetickou informací, nacházejí se v  $G_1$  fázi a jsou diploidní ( $2n$ ). Tento děj je ale rozdílný u živočišných a rostlinných buněk. Živočišná buňka se dělí pomocí kontraktálního prstence, který vzniká na okraji buňky a šíří se směrem ke středu buňky. Základem kontraktálního prstence jsou mikrofilamenta (Lajtha et al. 1954). Rostlinná buňka se dělí pomocí fragmoplastu, který vzniká uprostřed a šíří se směrem k okrajům. Základem fragmoplastu jsou mikrotubuly (Howard a Pelc 1986).

Pro vstup do jednotlivých fází buněčného cyklu je zapotřebí spouštěčů a pro vstup do fáze replikace DNA i do fáze mitózy to jsou podobné molekuly cyklin-dependetní kinázy (viz Regulace buněčného cyklu) (Hunt et al. 2011).

Mnoho buněk v našem těle je po dlouhou dobu v klidovém stádiu mimo cyklus a teprve v přítomnosti růstových faktorů z něj vystupují a vstupují do buněčného cyklu (O'Farrell 2011). Vstup do klidového stádia stejně jako vystoupení z něj záleží na okolních faktorech. Pokud má buňky vhodné podmínky pro život, vystoupí z klidového stádia a pokračuje v růstu a dělení. Pokud ale nastanou „horší“ časy, přestane buňka s růstem a dělením a vstoupí do  $G_0$  fáze. Pro tento přechod jsou zapotřebí stovky různých genů v mnoha



vzdálených drahách (Yanagida et al. 2011). Vstup do  $G_0$  fáze může být i důsledkem mitogenní deprivace nebo velké hustoty buněk (Zetterberg a Larsson 1985).

Buňky mohou také nenávratně vystoupit z buněčného cyklu. To se děje v případě, že buňky „dostanou“ nějakou specifickou funkci. Tyto buňky pak vstupují do terminálně diferencovaných (např.: neurony, myocyty nebo epiteliální buňky kůže a sliznice) nebo senescentních stavů, případně mohou reverzibilně vstoupit do klidového stavu ( $G_0$ -fáze) (např.: gliové buňky, folikulární buňky štítné žlázy nebo hepatocyty) (Williams a Stoeber 2007).

Menší počet buněk v lidském těle proliferuje a nachází se tak v buněčném cyklu. Jsou to především kmenové tranzitní buňky samoobnovujících se tkání (př. epitel, kostní dřev) (Williams a Stoeber 2012).

### **1.3.1 Regulace buněčného cyklu**

Důležitá je u buněk existence „hlavního regulátoru“, který se aktivuje při velmi konkrétní kombinaci nutričních nebo vývojových signálů a řídí regulaci buněčného cyklu (van Werven a Amon 2011). Buněčný cyklus je řízen dvěma základními typy mechanismů. Za prvé to je kaskáda proteinových fosforylací, které zprostředkovávají přenos buňky z jedné fáze do druhé. A za druhé to je soubor kontrolních bodů, které monitorují kritické události buněčného cyklu, udržují správné pořadí událostí buněčného cyklu, a které mohou v případě potřeby buněčný cyklus zpomalit (Collins et al. 1997).

Vysoce regulovaná rodina kináz slouží jako první typ kontroly. Kinázy jsou aktivovány při navázání na druhou podjednotku, která se exprimuje ve vhodném období buněčného cyklu a nazývá se cyklin. Dojde tak k vytvoření aktivního komplexu periodické podjednotky cyklin s partnerskou cyklin-dependetní kinázou (CDK) a společně s procesy fosforylace a defosforylace zajišťují přechody mezi fázemi buněčného cyklu (Collins et al. 1997). Cyklin D-CK4, D-CK6 a E-CK2 řídí progresi  $G_1$  fáze přes restriční bod, což je nenávratný bod, kdy buňka musí dokončit svůj buněčný cyklus (Williams a Stoeber 2012). Další důležitou cyklin-dependetní kinázou je A-CK2, která iniciuje S fázi a cyklin B-CK1, který reguluje progresi v  $G_2$  fázi a vstup do mitózy (Nigg 2001).

Zajímavé je, že pro vstup do fáze replikace DNA i mitózy se jedná o podobné CDK, které jsou specifické pro S a M-fázi. Aby buňka v přítomnosti první CDK správně věděla, že má zahájit replikaci DNA a ne mitózu, je zapotřebí určitá aktivita CDK a substrátová specifita. Pro zahájení S-fáze je zapotřebí pouze malá aktivita CDK, kdežto pro zahájení M-fáze je potřeba aktivita větší. Ještě důležitějším faktorem je substrátová specifita, na

kteře kinázy pracují. Pro spuštění S-fáze je zapotřebí prereplikační komplexy, které buňka získá až na konci G<sub>1</sub> fáze. Pro spuštění M-fáze je zase zapotřebí pár sesterských chromatid, což jsou struktury, které buňka získá až na konci G<sub>2</sub> fáze (Uhlmann et al. 2011).

Pro regulaci buněčného cyklu je kromě kinázové aktivity důležitá také fosfatázová aktivita a vzájemný poměr mezi nimi, který je důležitý pro přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu (Domingo-Sananes et al. 2011).

Důležitým sensorickým mechanismem v buněčném cyklu jsou kontrolní body, které fungují jako pomyslné závory, které blokují přechod do další fáze buněčného cyklu, dokud nebude dokončena fáze předchozí (Hunt et al. 2011). Kontrolní body buněčného cyklu snímají chyby v kritických událostech, jako je replikace DNA a segregace chromozomů. V případě, že kontrolní bod zachytí nedostatečně replikovanou nebo poškozenou DNA, aktivuje se a pošle signál do efektorů, které mohou progresi buněčného cyklu po přijetí signálu zpomalit nebo úplně zastavit, dokud není nebezpečí mutace odvráceno a poškození není opraveno (Bartek et al. 2004). Po přejití kontrolního bodu už není pro buňku možný návrat. Efektory jsou proteiny, které inhibují aktivitu CDK a mají schopnost reverzibilně zastavit progresi buněčného cyklu (Williams a Stoeber 2012).

V buněčných cyklech existuje mezera mezi koncem mitózy a začátkem replikace DNA. V této mezeře (konkrétně na přechodu mezi G<sub>1</sub> fází a S fází) se nachází důležitý kontrolní bod, z něhož není návratu v buněčném cyklu (Hunt et al. 2011). Při porovnávání regulátorů v této fázi mezi kvasinkami, rostlinami a živočichy zjistili Cross et al. (2011), že jednotlivé regulátory buď museli projít obrovskou sekvenční divergencí od posledního společného předka, nebo se vyvinuli z jiného původu. Přesto si jsou tyto regulátory svou topologií a dynamikou podobné.

Součástí kontrolního bodu S-fáze jsou dobře známé, avšak vzájemná kooperace těchto součástí není stále stoprocentně pochopena. Pokud k poškození DNA během G<sub>1</sub> fáze, nastoupí na řadu opravné mechanismy DNA. Poškození DNA může být buď v rámci dvouvláknových zlomů, které se opravují dvojím nehomologním spojováním konců (=NHEJ), nebo v rámci ztráty sekvence DNA, které se opravuje homologní rekombinací ze sesterské chromatidy (=HR). Oba způsoby opravy vyžadují produkci dojde dlouhých úseků jednovláknové DNA (Langerak a Russell 2011).

Kontrolní bod mezi M-fází a G<sub>1</sub>-fází, tedy mezi koncem a začátkem dělení, je velmi komplikovaný a nazývá se SAC (spindle assembly checkpoint). Strukturně to je samotný kinetochor napojený na vřetenové mikrotubuly. Tento kontrolní bod má, na rozdíl od

ostatních, malou nebo žádnou opravnou roli při zaznamenání poškození. Jeho účelem je pouze regulace progresu buněčného cyklu. SAC obsahuje alespoň tři nebo čtyři proteinkinázy a fosfatázy a také regulační proteiny (např.: Mad2) (Hunt et al. 2011). SAC dále reguluje (inhibuje) komplex APC/C (anglicky anaphase-promoting complex/cyclosome), který má proteolytickou funkci a mnoho podjednotek (Barford 2011). Pines a Hagan (2011) tvrdí, že centrozom v živočišných buňkách hraje ústřední roli při kontrole mitotického vstupu.

V buněčném cyklu často dochází ke zpoždění G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> fáze po ozáření IZ. Případně může dojít k úplnému zastavení buněčného cyklu. Zpoždění v G<sub>1</sub> fázi je regulováno produktem tumor supresorového genu p53. Ozáření způsobuje zvýšenou expresi tohoto genu a to indikuje protein WAF 1/Cip 1, který inhibuje CDK. V S fázi je zpoždění pozorováno po relativně vysokých dávkách záření. Důsledek je jak radiosenzitivní, kdy dochází k inhibici iniciace replikonu DNA, tak radiorezistentní, při kterém zase dochází k prodlužování řetězce DNA. Zpoždění v G<sub>2</sub> fázi pravděpodobně zahrnuje modulaci aktivity cyklinu B1/p34, což jsou proteiny, které zprostředkovávají průchod G<sub>2</sub> fází a mitózou. V případě expozice IZ dojde ke snížení exprese cyklinu B1 v závislosti na dávce IZ a tím ke zpoždění G<sub>2</sub> fáze (Bernhard et al. 1995).

### **1.3.2 Buněčný cyklus a tvorba tumoru**

Buněčný cyklus řídí buněčnou proliferaci, pokud je buněčná proliferace neřízená, tak dochází k tvorbě nádoru. Zároveň je i snižena citlivost na signály buněčného cyklu, které buňku na tuto skutečnost upozorňují. Základem pro aberantní buněčnou proliferaci je deregulace buněčného cyklu, která charakterizuje buněčný fenotyp. Dalším faktorem, který přispívá k tvorbě nádoru, je ztráta kontroly kontrolního bodu buněčného cyklu, což podporuje genetickou nestabilitu. Na genetické úrovni se ukázalo, že k rozvoji nádoru přispívají hyperaktivační mutace v růstových signalizačních sítích se ziskem funkce jiné buňky (Williams a Stoeber 2012). Tyto mutace zapříčiňují tvorbu onkogenů mutací z normálních protoonkogenů. Produkty normálních protoonkogenů podporují buněčnou proliferaci (Collins et al. 1997). Dalšími možnými genetickými činiteli, kteří mohou přispívat k rozvoji nádorů, jsou mutace se ztrátou funkce v karcinogenezi. Jedná se o mutace v tumor supresorových genech (Williams a Stoeber 2012). Tyto mutace mohou hrát hlavní roli v dědičné náchylnosti k rozvoji nádoru. Aby totiž ztratili funkci, je nutná inaktivace obou kopií tumor supresorového genu. Heterozygotní jedinci tak mohou být fenotypově zdraví a z toho vyplývá, že tyto mutace mohou být neseny v genofondu řady generací bez přímých škodlivých následků. Heterozygotní jedinci jsou však náchylnější k

nádorovému bujení, jelikož k zabránění syntézy jakéhokoliv funkčního genového produktu stačí pouze jedna mutace (Collins et al. 1997).

Důležité je určit, lokalizovat a zjistit funkci genů, které hrají roli v nádorovém bujení a s těmi dále pracovat. Například ztráta funkce produktu pRb nádorového supresorového genu by vedla k uvolnění transkripčních aktivátorů E2F bez nutnosti fosforylace a tím by se obešla negativní regulace kontrolující vstup do cyklu. Podobný následek by měla i ztráta funkce produktu p16, při které by došlo k uvolnění E2F a zvýšení fosforylace pRb. Zároveň inaktivace pRb během embryogeneze podporuje nepřiměřenou aktivitu buněčného cyklu (Harbour a Dean 2000). Produkt nádorového supresorového genu p53 zase může zastavit progresi buněčného cyklu v několika bodech, pokud dojde k jeho aktivaci kontrolními body, a to má důsledky na rozvoj nádoru. Gen p53 slouží jako transkripční aktivátor a jeho zbytky, které jsou často mutovány v nádorových buňkách, jsou důležité pro vazbu p53-DNA. (Collins et al. 1997).

Pro tvorbu nádorů v organismu je typické nevyvážení buněčné proliferace a buněčné smrti (viz kapitola Apoptóza).

## 1.4 Apoptóza

Buněčná smrt neboli apoptóza je důležitý přirozený proces, který pomáhá regulovat počet buněk. Ke smrti buňky dochází, pokud jsou buňky poškozené, staré nebo infikované a může tak dojít k poškození celého organismu (Lee a Overholtzer 2019). Jedná se o přirozenou programovatelnou buněčnou smrt, která společně s proliferací vede k normálnímu, zdravému vývoji buněk (Danial a Korsmeyer 2004). Rovnováha mezi buněčnou proliferací a apoptózou je důležitý faktor zdravé buňky. Odhaduje se, že pro udržení homeostáze v lidském těle se musí každý den vytvořit 10 miliard buněk, aby se čísla vyrovnala (Renehan et al. 2001). Při nemoci nebo stárnutí je nutné toto číslo zvýšit vzhledem k většímu počtu umírajících buněk. Narušením této rovnováhy dojde nejen k neoplastickému vývoji (Tretiakova et al. 2008), ale také se může zvýšit rezistence vůči tradičnímu a běžnému způsobu léčby jako je ozařování a podávání cytotoxických antineoplastických léků (Green a Reed 1998). Alternativou by mohla být změna exprese členů B-buněčného lymfomu-2 (Bcl-2). Tato skupina 25 proteinů se skládá z proapoptických proteinů (př.: Noxa, Puma, Bim, Bid, Bad, Bak), které udržují poměr mezi umírajícími a nově se tvořícími buňky. V případě, že dojde k nadměrné expresi protiapoptických proteinů, dojde i k potlačení apoptózy a tím k rozvoji nádorových buněk (Minn et al. 1995). K aktivaci proapoptických genů dochází například navázáním nádorového supresorového proteinu p53 na vazebná místa pro tento protein.

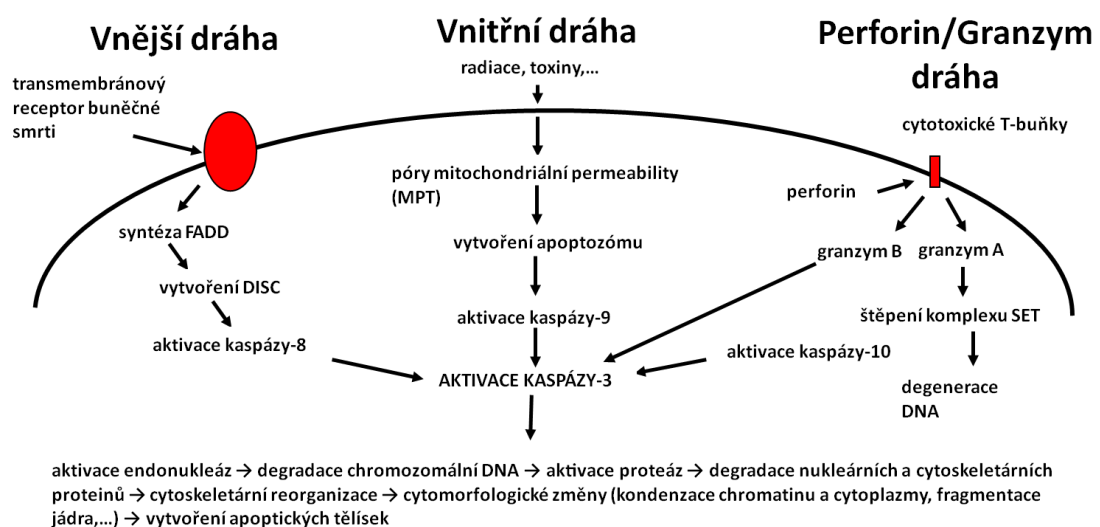
Velkou roli v apoptóze hrají kaspázy. Kaspázy mají proteolytickou aktivitu a jsou schopny štěpit proteiny. Kaspázy se dělí na iniciátory (kaspáza-2, -8, -9, -10), efekторы (kaspáza-3, -6, -7) a zánětlivé kaspázy (kaspáza-1, -4, -5) (Rai et al. 2005).

Apoptóza probíhá na dvou hlavních kaspázových drahách (viz obrázek 8). Hlavní rozdíl mezi nimi je zapojení/nezapojení mitochondrií, nicméně výzkumy naznačují, že dráhy jsou propojené a že molekuly v jedné dráze mohou ovlivňovat dráhu druhou (Igney a Krammer 2002). Vnější receptorová kaspázová dráha se spouští po přijetí signálu povrchovým transmembránovým receptorem buněčné smrti (př.: Fas, TNFR1, TRAIL) (Wajant 2002). Ten syntetizuje protein FADD (FAS-associated death domain protein) a ten se spojuje s efektorovou prokaspázou-8. Tím dojde k vytvoření signálního komplexu indukujícího buněčnou smrt (=DISC), jehož výsledkem je autokatalytická aktivace prokaspázy-8 (Kischkel et al. 1995) Prokaspáza-8 aktivuje efektorovou kaspázu-3, což vede k buněčné smrti a tím k eliminaci jednotlivých buněk. Vnitřní mitochondriální kaspázová apoptotická dráha je charakteristická tím, že jsou do ní zapojeny mitochondrie a to tak, že při působení negativních stimulů (záření, cytotoxické léky, buněčný stres, nebo inhibice růstového faktoru) dojde k otevření přechodového póru mitochondriální permeability (MPT) a tím ke ztrátě mitochondriálního transmembránového potenciálu. Proteiny z rodiny Bcl-2 nařídí uvolnění proteinů a cytochromu c z mezimembránového prostoru do cytosolu. Cytochrom c se naváže na molekulu Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) a neaktivní iniciátorovou kaspázu prokaspázu-9 a vytvoří multiproteinový komplex zvaný apoptozom (Acehan et al. 2002). Apoptozóm aktivuje efektorovou kaspázu-9, která pak aktivuje kaskádu kaspáz (kaspáza-3, kaspáza-6, kaspáza-7), což vede k buněčné smrti a eliminaci buněk (Kang a Reynolds 2009).

Existuje ještě jedna apoptotická cesta a to Perforin/Granzym dráha, která je zprostředkovávaná cytotoxickými T-buňkami. Tato dráha začíná u transmembránové molekuly perforinu, která je vyloučena ven z buňky a po navázání cytotoxických T lymfocytů uvolňuje cytoplazmatické granule do cílové buňky (Trapani a Smyth 2002). Nejdůležitějšími složkami těchto granul jsou serinové proteázy granzym A a granzym B. Jakmile je granzym A v buňce, dojde k seříznutí DNA pomocí DNáz z genu NM23-H1 (produkt tumor supresorového genu) (Fan et al. 2003). Tento gen je blokován komplexem SET, který je tvořen proteiny SET, Ape1, pp32 a HMG2. Granzym A tento komplex štěpí, čímž se ruší inhibice NM23-H1 a dochází tak k apoptické degradaci DNA. Cesta přes granzym B obnáší cestu přes aktivaci kaspázové dráhy. Granzym B buď může aktivovat prokaspázu-10, která dále aktivuje kaspázu-3, nebo může aktivovat kaspázu-3 přímo (Elmore 2007).

Všechny tři cesty se sbíhají v aktivaci kaspázy-3, po které dojde k buněčné smrti a tím k eliminaci buněk. V této fázi se buňky smršťují, kondenzuje jejich cytoplazma, organely se navzájem přibližují. Dochází k aktivaci cytoplazmatických endonukleáz (př.: endonukleáza CAD), které štěpí jaderný materiál a k aktivaci proteáz, které degradují jaderné a cytoskeletální proteiny a způsobují pyknózu (=typický apoptický jev, při kterém dochází k zahuštění chromatinu). Tím dojde k vytvoření apoptotických tělísek, které mohou a nemusí mít jádro (záleží, jestli proběhla karyolýza nebo ne). Následně dojde k expresi ligandů (markerů) buněčného povrchu pro receptory fagocytárních buněk (Elmore 2007). Fagocytární buňky rozpoznají apoptotické buňky díky fosfatidylserinu, který se externalizuje ven z buňky z plazmatické membrány a funguje tak jako rozpoznávací ligand pro fagocyty (Bratton et al. 1997).

Apoptická tělíška jsou následně fagocytována makrofágy a degradována ve fagocytozolech. Jelikož mohou mít infikovaný vnitřní obsah (škodlivé cytokiny), je nezbytné, aby ho neuvolňovali do prostředí. To je zajištěné pomocí tzv. tichého imunologického způsobu, který zabraňuje škodlivým imunitním reakcím a který je součástí normální buněčné fyziologie (Ravichandran 2003).



Obrázek 8: Schématické znázornění tří apoptických drah (Elmore 2007 - upraveno).

V opačném případě nastává nekróza, při které dojde k protržení plazmatické membrány a prozánětlivý obsah je uvolněn do prostředí (Lee a Overholtzer 2019). Další rozdíl je v tom, že apoptóza je řízená a energeticky závislá, kdežto nekróza je nekontrolovaná a pasivní (Elmore 2007). O tom, jestli proběhne apoptóza nebo nekróza rozhoduje povaha signálu buněčné smrti, typ tkáně, vývojová fáze tkáně a fyziologické prostředí (Zeiss 2003). Zbytky

apoptických tělísek, které zůstanou v organismu po apoptóze mají specifické posmrtné funkce (např.: redistribuce živin mezi buňkami) (Lee a Overholtzer 2019).

Ukázalo se, že všechny procesy buněčné smrti jsou reverzibilní. Dokonce i z fáze degradace DNA a/nebo fagocytózy je buňka schopná se zpětně zotavit pomocí procesu zvaného anastáza (Tang a Tang 2018). Konečným stádiem buněčné smrti se tak zdá být lyzozomální degradace pohlcených buněk (Lee a Overholtzer 2019). U buněk jako jsou korneocyty (buňky kůže, vlasů a nehtů), které nejsou v konečné fázi pohlceny, ale jsou zrohovatěny, se zdá být konečným nenávratným stádiem odstranění všech organel (včetně mitochondrií) před odloučením z těla (Jones et al. 2018).

Existují i buňky, které jsou schopné poměrně dlouhou dobu přežít i po odstranění buněčných organel. To jsou například buňky oční čočky (Hughes et al. 2015).

## 1.5 Průtoková cytometrie

Jedná se o výkonnou kvantitativní i kvalitativní metodu, která pomáhá měřit fyzikální parametry (velikost, granularita) a vnitřní komplexitu (cytoplazmatická komplexnost, obsah RNA/DNA, genová exprese) buněk. Pro měření využívá shlukových diferenciačních (CD) znaků buňky, které lze sledovat při použití fluorescenčních barviv, které mohou tvořit vazbu se specifickými proteiny na buněčné membráně, nebo uvnitř buňky (Brown a Wittwer 2000). Využívá se jí především při studiích nejrůznějších onemocnění. Jedinou podmínkou je dostatečné množství životaschopných buněk ve vzorku. Přístrojem používaným pro tuto laboratorní metodu je průtokový cytometr, který sestává ze 4 částí: fluidiky, optiky, elektroniky a počítačového rozhraní (viz obrázek 9) (Betters, 2015).

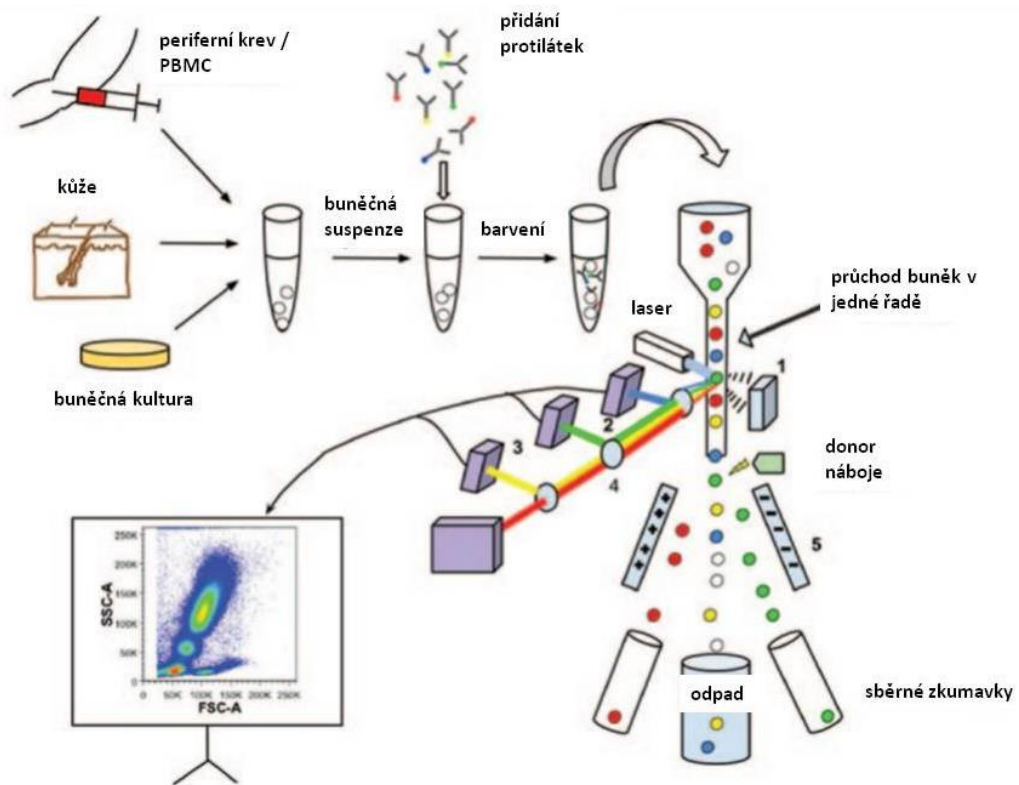
Zdroj buněčného materiálu může pocházet z nejrůznějších biologických vzorků, jako je krev, kostní dřev, mozkomíšní mok, moč, tkáň (i pevná) nebo nádor. Zajímavostí je, že je možné analyzovat jak živočišné, tak rostlinné buňky. Jakmile je buněčný materiál odebraný a připravený k měření, je nutné ho označit pomocí monoklonálních glykoproteinových protilátek, které díky své schopnosti navázat se na specifické antigenní struktury na buněčném povrchu identifikují požadované znaky. Kromě toho mají tyto protilátky na sobě navázané fluorochromy, které při excitaci laserovým paprskem emitují světlo (Picot et al. 2012). Při použití více fluorochromů s podobnou vlnovou délkou excitace ale rozdílnými vlnovými délkami emise, můžeme měřit několik vlastností buňky současně. Jako nejběžněji používaná barviva patří propidiumjodid, fykoerytrin a fluorescein (Brown a Wittwer 2000).

V první části průtokového cytometru, fluidice, procházejí buňky díky laminárnímu proudění vytvořenému izotonickým obalem v kapalně suspenzi (izotonickém pufru) jednotlivě oblastí snímání laserového paprsku, kde na ně dopadá laserový paprsek (zdroj monochromatického světla), který je nositelem excitované světelné energie (=fluorescence) (Macey 2007).

Druhou část průtokového cytometru tvoří optika. Lasery vyzařují světlo o různých vlnových délkách a způsobují tak excitaci fluorochromů navázaných na protilátky. Po projití buňky laserem dojde ke dvěma základním detekcím: FSC = forward scatter (česky přední rozptyl) a SSC = side scatter (česky boční rozptyl). FSC je světlo, které jde ve směru laseru a ukazuje buněčnou morfologii nebo velikost buňky. SSC je světlo, které jde kolmo proti laseru a udává strukturu buňky, nebo její hustotu (Jaroszeski a Radcliff 1999). Optika směřuje světlo do řady filtrů a dichronických zrcadel, která izolují jednotlivá pásma vlnových délek (Brown a Wittwer 2000).

Třetí částí je elektronika. Ta slouží k interpretaci dat. Dochází zde totiž k přenosu fotonů na elektronická data pomocí fotonásobičů, které indukují elektrický proud, pokud detekují světlo (Picot et al. 2012). Jelikož se emisní spektra fluorochromů překrývají, a to by mohlo zkreslovat výsledek, je nutné tento překryv odstranit pomocí matematického algoritmu kompenzace (Jahan-Tigh et al. 2012).

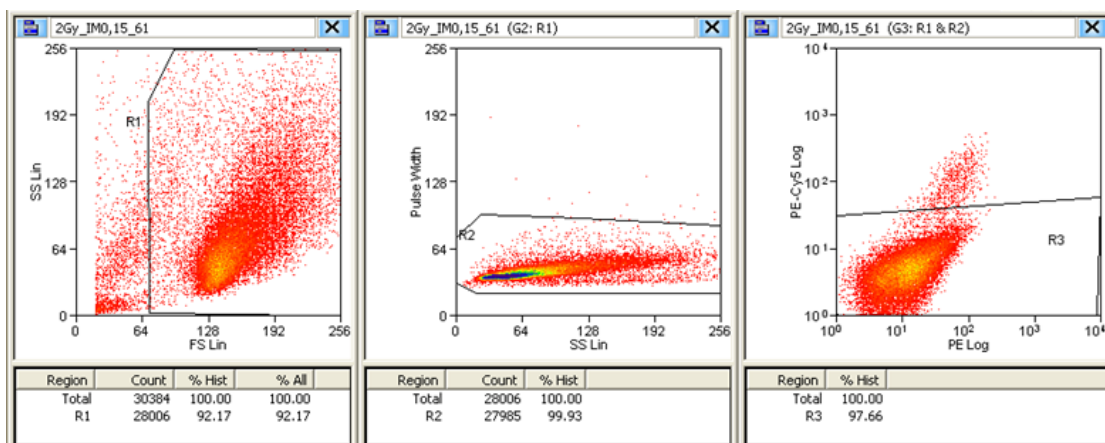




Obrázek 9: Schématické znázornění průtokového cytometru. (1) Forward-scatter detektor (2) Side-scatter detektor, (3) fluorescenční detektor, (4) filtry a zrcadla a (5) nabitě vychylovací desky Jahan-Tigh et al. 2012 - upraveno).

Poslední část tvoří počítačové rozhraní. V softwaru, vytvořeném speciálně pro analýzu dat průtokové cytometrie, se každý detekovaný signál zobrazí jako událost (anglicky event). Události jsou zachycovány a ukládány do počítače, kde se provádí grafická analýza v jedno-, dvou-, nebo třírozměrných modelech. Počítač plní také regulační funkci (Macey 2007).

Grafické výsledky pak mohou být znázorněny pomocí histogramů, kterých se využívá při sledování jednoho měřícího zájmu, nebo pomocí bodových grafů, kde je možné sledovat dva parametry zájmu (viz obrázek 10) (Jaroszeski a Radcliff 1999).



Obrázek 10: Grafický výstup z programu GraphPad Prism 9 Software ve formě bodových grafů.

Průtokové cytometry dokáží také třídit buňky. Například pokud chceme oddělit lymfocyty, nebo chromozomy ze značně heterogenní směsi, tak je možné k tomu použít průtokovou cytometrii, při které se tyto buněčné části shromáždí jako vysoce purifikovaná směs. Tato schopnost je v klinické praxi velmi cenná. Umožňuje selektovat buňky, dle určitých parametrů a diagnostikovat a léčit nejrůznější onemocnění, nejčastěji benigní i maligní hematologické procesy v onkologii (Macey 2007). Příklady využití průtokové cytometrie v klinické praxi je velké množství. Za zmínku stojí například studium imunodeficience v imunologii, měření proliferačních markerů v onkologii, nebo fenotypizace leukémie a lymfomu v hematologii (Brown a Wittwer 2000). Výzkumy v oblasti specifčnosti fluorochromů jdou rychlými kroky dopředu, a tak je v rámci polychromatické průtokové cytometrie možné analyzovat až 20 parametrů buněčného fenotypu, a to v rámci jedné buňky. To je výhoda oproti imunoblotovacím technikám (př.: Western – blot, a PCR), které neposkytují informace o jednotlivých buňkách (Jahan-Tigh et al. 2012).

## 1.6 Juvenil

Juvenil je český doplněk stravy vyextrahovaný z hovězí tkáně předními českými imunology, kteří chtěli vytvořit zcela přírodní nechemický produkt. Tento doplněk stravy podporuje imunitní systém a pomáhá při buněčné regeneraci a při nedostatku energie. Dále podporuje regeneraci, střevní integritu, paměť a má protinádorové účinky. Chrání také před virovými a bakteriálními infekcemi. Zároveň nebyly prokázány vedlejší a toxické účinky na organismus (Kubelkova a Macela 2019).



Obrázek 11: Komerčně prodáváný doplněk stravy Imuregen, který je analogickým produktem k Juvenilu, se prodává v nejrůznějších variantách (Forever Healthy Products 2022).

Podstatou Juvenilu je alkohol-éterový extrakt z hovězí krve. Tato dlouhodobá nedestruktivní extrakce se provádí použitím moderního biotechnologického procesu, který je založen na autoenzymatické dezintegraci proteinů. Poté následuje separace účinných nízkomolekulárních látek s katalytickým účinkem, včetně produktů vnitřních sekrečních žláz, které příznivě ovlivňují vnitřní metabolismus buňky a nacházejí se v krvi (Testimonials review 2019a).

Tabulka 1: Obsah jednotlivých složek v komplexní směsi Juvenil (Testimonials review 2019a-  
upraveno).

SLOŽKY JUVENILU			MNOŽSTVÍ (mg)
Minerály			40
Bílkoviny			35
Sodík			13
Volné aminokyseliny	Esenciální	Leucine	13
		Valine	
		Histidin	
		Lysin	
		Fenylalanin	
		Threonin	
		Methionin	
		Isoleucin	
	Neesenciální	Arginin	
		Alanin	
		Serine	
		Glycin	
		Prolin	
		Thyrosin	
		Kyselina glutamová	
Kyselina aparagová			
Tuky		5	
Nukleotidy		4,3	
Sacharidy (glukóza)		0,4	
Cholesterol		0,34	
Železo		0,05	

Tento extrakt obsahuje především široké spektrum volných esenciálních aminokyselin, peptidů a oligopeptidů, nukleotidů, vitamínů, minerálů a malé množství fosfolipidů (viz tabulka 1) (Kubelkova et al. 2021).

Velmi významnou složkou Juvenil jsou aminokyseliny. Esenciální aminokyseliny jsou významné pro regulaci imunitní aktivity v těle a zlepšení buněčné imunity. Neesenciální aminokyseliny pozitivně ovlivňují metabolické a neurogenní funkce a tím zvyšují energetické hladiny organismu (Testimonials review 2019a). Kubelkova et al. (2021) zjistila, že Juvenil obsahuje kromě aminokyselin uváděných na obalu i taurin (2-minoethansulfonová kyselina). Tato kyselina je derivátem cysteinu, a proto někdy bývá řazena mezi aminokyseliny, ačkoliv postrádá karboxylovou skupinu. Jestliže předpokládáme fungování podle modulace mikrobiota – střevo – mozek, mohl by být taurin pojítkem k pozitivnímu ovlivňování těla Juvenilem. Dle tohoto modelu by mohly být

výtažky ovlivňující neurochemické procesy v mozku označovány za psychobiotika (Sarkar et al. 2016).

Zároveň se v hovězím extraktu nachází i L-aminokyseliny alanin, serin nebo kyselina asparagová. Přítomnost těchto aminokyselin by mohla vést k pozitivnímu ovlivnění mozku a tím ovlivnit i celé tělo. Tyto aminokyseliny se totiž pomocí procesu vnitřní racemizace mění na D-formy, které se podílejí na neurotransmisi, neuroendokrinní regulaci a signalizaci (Bastings et al. 2019).

Z nukleotidů, které jsou stavebními kameny nukleových kyselin a metabolických enzymů, byly v extraktu objeveny monofosfáty i difosfáty. Nebyly zde však nalezeny thymidinové nukleotidy, pravděpodobně proto, že v Juvenilu obsažené nukleotidy nepocházejí z jaderné DNA, ale z volných nukleotidů či nukleových kyselin v plasmě (Kubelkova et al. 2021). V extraktu se nacházejí extracelulární nukleotidy a nukleosidy, které jsou významné pro mezibuněčnou signalizaci (Giuliani et al. 2019). Dalším důkazem fungování modulu mikrobiota – střevo – mozek je přítomnost aromatických aminokyselin (tryptofan, fenylalanin a tyrosin) v extraktu, které slouží jako substráty pro syntézu metabolitů střevní symbiotickou bakterií. Tyto metabolity zase ovlivňují propustnost střev a systémovou imunitu (Dodd et al. 2017). Navíc tryptofan může být převeden střevní mikroflórou na indol nebo deriváty indolu, který je potřebný pro buněčné funkce (Wang et al. 2019). V extraktu se nachází také stavební aminokyseliny pro polypeptidy a bílkoviny, z nichž mnoho je esenciálních (Kubelkova et al. 2021).

Minoritní složkou Juvenilu jsou fosfolipidy, které jsou součástí většiny eukaryotních buněčných membrán. Výrobou Juvenilu však dochází k eliminaci fosfolipidů a v extraktu zůstanou pouze nízkomolekulární fosfolipidy nebo fragmenty fosfolipidů s vyšší molekulovou hmotností (Kubelkova et al. 2021). V buněčných membránách můžeme nalézt také sfingolipidy, které byly objeveny i v Juvenilu a které hrají důležitou signální roli u eukaryotních buněk (Hannun a Obeid 2018).

V Juvenilu najdeme dále proteiny, které společně s vitamíny pomáhají při opravě slabých nebo poškozených buněk (Testimonials review 2019a). V hovězím extraktu se nacházejí proteiny a peptidy s molekulovou hmotností maximálně 10 kDa. Z toho vyplývá, že všechny bílkoviny nad tuto velikost musely být rozštěpeny na peptidové fragmenty. Celé bílkoviny, které se v extraktu nacházejí mají hmotnost pouze do 10 kDa. Konkrétně se jedná o apolipoprotein C-III a skupina 4 defenzinů (Kubelkova et al. 2021).

Kubelkova et al. (2021) objevila v extraktu také hemocidiny, které společně s defenziny mají baktericidní účinky.

### 1.6.1 Historie

Historie vývoje Juvenilu se začala psát v roce 1932, kdy byl založen experimentální tým Retisin továrnou EKO v Praze v čele s doktorem Rakušanem. Cílem bylo připravovat rostlinné a živočišné tkáňové extrakty mířené proti nádorům, které by měly zároveň i pozitivní vliv na imunitní systém (Testimonials review 2019b).

Některé extrakty byly pojmenovány a patentovány, například RETISIN (RTN33), LYASTIN (RTN112) nebo SILEXIL (RTN121). Všechny tyto extrakty byly po svém vývoji testovány na zvířecích modelech i v laboratoři. Výsledky experimentů byly slibné především u Retisinu, který vykazoval protizánětlivý účinek a byl účinný proti rakovinným buňkám. V roce 1948 došlo ke znárodnění EKO továrny komunistickým režimem a převedení pod podnik Biogena a do národní farmaceutické společnosti SPOFA, která nestačila konkurovat rostoucím farmaceutickým firmám. V roce 1958 byly některé přípravky (mezi nimi i Retisin) uvedeny do výroby formou injekcí. Touto formou byly vyráběny až do konce 70. let minulého století. Výbuch jaderné elektrárny v Černobylu roku 1986 způsobil, že Sovětský svaz hledal způsoby a prostředky, jak ochránit obyvatelstvo Ukrajiny před následky ozáření a jedním z nápadů bylo testování a vyrábění původního Retisinu (po této obnovené výrobě se Retisin přejmenoval na Juvenil). Proto byla jeho výroba obnovena až po roce 1989, kdy se začalo se znovuvvedením produktu na evropský a světový trh. Testování probíhalo i v Československu. Konkrétně ve výzkumné laboratoři v Těchoníně. Podle testování *in vitro* na buňkách myší sleziny neměl Juvenil žádnou mitogenní aktivitu. Testování Juvenilu *in vivo* zase odhalilo zvýšení odolnosti na oslabené patogenní bakterie (Kubelkova a Macela 2019).

Díky zvýšenému zájmu o alternativní léčbu, přírodní produkty a doplňky stravy v 90. letech 20. století došlo v podstatě ke znovuzrození tradiční výroby. Po smrti doktora Rakušana pokračoval v jeho práci Bedřich Doležel a ten za pomoci VŠCHT Praha a Unity Hronov zahájil vysoce specializovanou proceduru za účelem extrahování nukleotidů a proteinů z hovězí tkáně. Příprava extraktu trvala 90 dní a výsledný produkt byl určen k harmonizaci lidského imunitního systému a k maximalizaci obranyschopnosti organismu. V roce 1998 byla založena malá rodinná náhodská firma Uniregen, Ltd., která spadala pod firmu Uniregen z roku 1995, jejíž záměrem byl maloobchod a výroba potravinářských výrobků, krmiv a destilačních produktů. Uniregen Ltd. dokázala připravit živočišné extrakty podle původního vzorce a přejmenovala je na Imuregen (tento název byl

patentován už v roce 1983). Následně byly pozvány expertní skupiny, aby přehodnotili biologické účinky Imuregenu (Testimonials review 2019b).

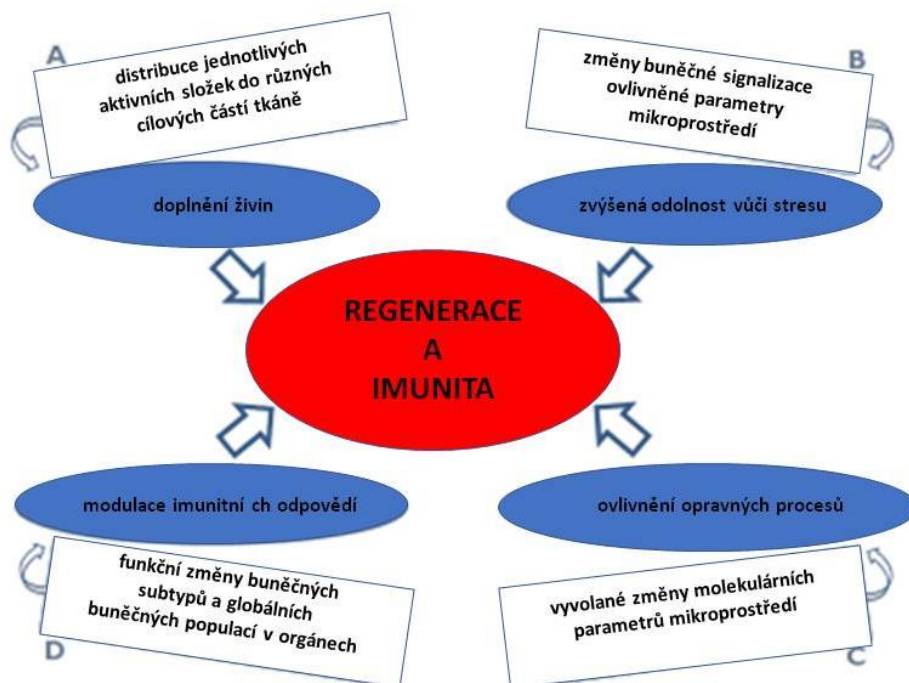
Tyto skupiny pak došly k významným výsledkům. Zjistilo se například, že myším, kterým se po dobu 30 dní aplikoval Imuregen pitným režimem, se zvýšila hladina regulačních cytokinů, které jsou důležité pro rozvoj protinádorové imunity, a navíc bez vedlejších toxických účinků. Také bylo dokázáno, že Imuregen má stimulační účinky na diferenciaci a aktivitu cytotoxických T lymfocytů a NK buněk (Kubelkova a Macela 2019).

V roce 2003 expandoval Imuregen na filipínský trh a v roce 2014 se dohodlo s firmou Forever Healthy Products (FHP), že bude Imuregen distribuovat na Filipínách, kde firma sídlí. FHP spadá pod firmu Forever Rich Philippines (FRP), což je hlavní distributor potravinových doplňků Laminine na Filipínách. Následně v roce 2014 začal být Imuregen distribuován pomocí firmy Althea Group, která v roce 2016 prodávala Imuregen online (prodej Imuregenu přes internet), v září roku 2018 však přestala s prodejem Imuregenu úplně. FHP představil Imuregen v roce 2019 v USA a Malajsii, kde se začalo okamžitě s jeho prodejem (Testimonials review 2019b).

V současné době se na základě hovězího extraktu vyrábějí dvě řady výrobků, a to výrobky Juvenil a Imuregen.

### **1.6.2 Ovlivnění buněčného metabolismu**

Juvenil je komplex biologicky aktivních nízkomolekulárních látek a má mnohostranné použití v biologických reakcích těla. Nejnovější informace ukazují na přímou interakci aktivních složek Juvenilu s buňkami různých tkáňových oddílů těla. Přímá reakce je způsobena molekulovou hmotností, nábojem a primární sekvencí aminokyselin/nukletidů. Primární sekvence může být důležitá pro navázání agonistů na povrch buněk a vyvolání změn v aktivaci buněčných signálních drah. Paralelně tak může dojít i k ovlivnění mezibuněčné signalizace především díky extracelulárním nukleotidům (Giuliani et al. 2019; Kubelkova a Macela 2019).



Obrázek 12: Schéma ovlivnění organismu Juvenilem včetně reakce organismu na toto ovlivnění (Kubelkova a Macela 2019 - upraveno).

Specifické ovlivnění buněk Juvenilem by se dalo využít při léčbě nádorů. Již dnes se pro jejich léčbu využívají rostlinné nebo živočišné extrakty jako doplňky stravy (výtažky, čaje, vitamíny,...). Například Richter et al. (2004) zjistil, že produkce cytokinů má vliv na indukci a regulaci protinádorové imunity.

Při testování cytostatické/cytotoxické aktivity Juvenilu na nádorové (H1299) a nenádorové plicní fibroblasty (NHLF) bylo zjištěno, že pokud nedojde k umělému ozáření kobaltem, tak se jedná o významně cytostatickou/cytotoxickou látku pro nenádorové plicní fibroblasty při použití vysokých dávek Juvenilu. Tyto vysoké dávky však po určité době omezují životaschopnost nenádorových plicních buněk (Duskova et al. 2019).

Ozáření kobaltem má větší vliv na nádorové lidské buňky než na buňky nenádorové. Při testování životaschopnosti bylo zjištěno, že hovězí extrakt má jen malý účinek na ozářené nádorové buňky, zatímco na neozářené nádorové plicní fibroblasty byl účinek významný. Z toho vyplývá, že pokud se prokáže tento účinek i v podmínkách *in vivo*, mohlo by dojít k nahrazení radioterapie Juvenilem a tím k vymizení všech škodlivých vedlejších účinků této terapie (Duskova et al. 2019).

Testování na předškolních a školních dětech a seniorech prokázalo významné snížení nemocnosti, snížení morbidit a snížení dnů nemoci (Richter et al. 2004).



Juvenil také ovlivňuje složení střevní mikrobioty, která je významná pro vývoj a metabolismus jedince a pro zrání imunitního systému savců a ovlivňuje především trávení a absorpci makromolekul. Mikrobiota, tedy střevní mikroby, ovlivňují organismus hostitele svou přítomností, vlastními produkty metabolismu a vzájemnou interakcí s hostitelem. Také produkují biologicky aktivní molekuly (např.: neurotransmitery). Právě složení mikrobioty hraje významnou roli ve zdraví hostitele a jakékoliv narušení může vést ke zdravotním problémům. Mikrobiota totiž poskytuje ochranu před patogeny a to tak, že brání vazbě patogenů na vazebná místa sliznice a přítomnost případně nepřítomnost různých druhů střevních bakterií může rozhodovat o efektivitě této ochrany (Kubelkova et al. 2020).

Vliv na mikrobiom střev má nejvíce strava. Lidé si neuvědomují, že kromě přibývání na váze a zhoršené fyzické kondici, dochází dlouhodobým špatným stravováním k poruchám skladby střevní mikroflóry a to člověka značně ovlivňuje. Není to ale jen stravovacími návyky. Technologie zpracování potravin se značně změnila. Například přidávání umělých sladidel (např.: sacharin nebo aspartám) mění složení střevní mikrobioty tak, že dochází k metabolickým abnormalitám nebo ke glukózové intoleranci (Suez et al. 2014). Emulgátory tak vyvolávají změnu ve složení mikrobioty a zvyšuje prozánětlivý potenciál, což u myši vedlo ke kolitidě (Chassaing et al. 2015). V neposlední řadě složení střevního mikrobiomu ovlivňuje nadměrná konzumace antibiotik a to narušováním vyvážené koncentrace různých druhů bakterií (Rashid et al. 2015).

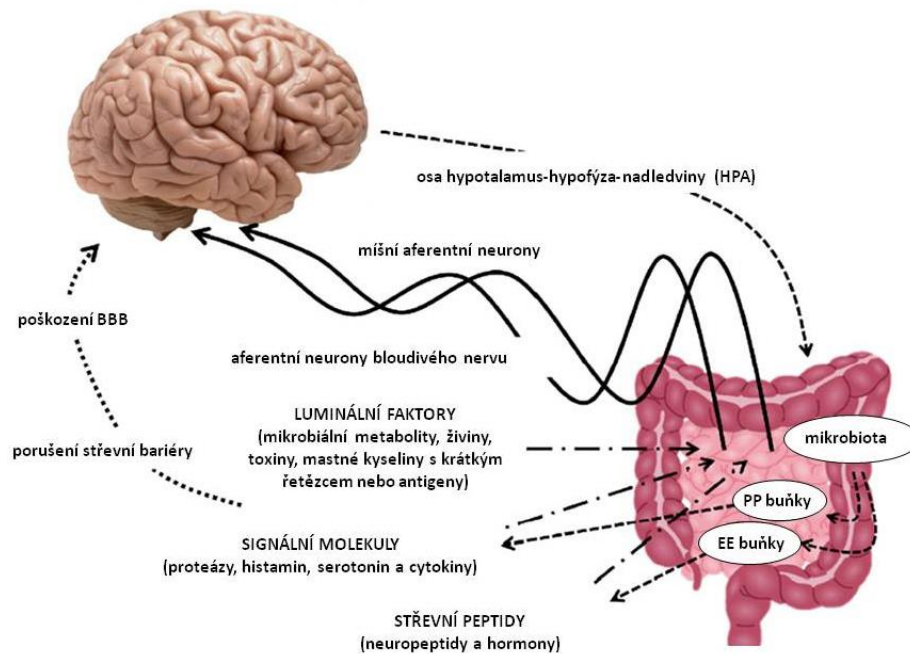
Obecně bylo zjištěno, že ve střevech dochází vlivem nejrůznějších činitelů ke změně poměru koncentrace bakteriálních rodů. Konkrétně se jedná o rody *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Většina negativních faktorů narušuje tuto rovnováhu ve prospěch rodu *Firmicutes*. Tento posun popsali například Ley et al. (2006) u obézních pacientů a u pacientů s přítomností zánětlivých onemocnění střev. Dále tento rod dominoval u pacientů s kolorektálním karcinomem (Bamola et al. 2017), u autistických dětí (Li et al. 2017) a u chronicky stesovaných pacientů (Karl et al. 2018).

Kubelkova et al. (2020) ale zjistila, že při orální aplikaci Juvenilu, došlo ke změně poměru koncentrace těchto dvou bakteriálních rodů ve střevech, a to ve prospěch rodu *Bacteroidetes*. Dále také prokázala, že Juvenil nezpůsobuje žádné patologické změny ve střevech.

U Juvenilu nebyly prokázány žádné negativní, škodlivé vedlejší účinky. Kubelkova a Macela (2019) testoval Juvenil na krysách a nepopsal žádné změny chování, přírůstků hmotnosti, nebo větší úmrtnosti v porovnání se skupinou, které Juvenil aplikován nebyl.

Z toho vyplývá, že Juvenil má bezpečné a nezávadné použití. Navíc při kombinaci s beta glukánem dochází k pozitivní regulaci sekreční imunity a vnímání stresu u dětí (Richter et al. 2017). Dokonce Juvenil zlepšil imunitní stav a fyzické podmínky u dětí pocházejících z české oblasti s vysokou úrovní znečištění ovzduší (Svozil et al. 2020).

Juvenil má tedy nejrůznější účinky na lidský metabolismus. Tato různorodost účinků může být způsobena mechanismem působení jednotlivých složek Juvenilu, při kterém dochází k přímé ligaci receptorů na odpovídající receptory. Po absorpci dochází k distribuci po celém těle díky tělním tekutinám a po ligaci na specifickém místě dochází k projevu geneticky předprogramované funkce (Kubelkova et al. 2021). Druhým možným vysvětlením působení Juvenilu na lidský organismus může být osa – střevo – mozek (viz obrázek 12), kde by docházelo k ovlivňování koncentrací a přítomností/nepřítomností různých střevních bakterií a tím i pozměňování chování mozku. Mikrobiom střev může mozkovou aktivitu ovlivnit dvěma cestami. První cesta je skrz epiteliální bariéry a druhá vede skrz neurální spojení mozku a střev. Pro překonání epiteliální bariéry jsou nutné biologicky aktivní signální molekuly ze střevní membrány (např.: peptidoglykany, lipopolysacharidy). Ty v reakci na určité stresové podmínky mají schopnost bariéry překonat a následně se translokovat do mozku, kde aktivují specifické vzorce rozpoznávání receptorů vrozeného imunitního systému a tím ovlivní chování mozku, nebo spouští produkci zpětného signálu pomocí osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny, která má regulační funkci. Druhá cesta je skrz bloudivý nerv nebo nervy páteře, které způsobují spojení mezi mozkem a střevem (Kubelkova a Macela 2020).



Obrázek 13: Schématické znázornění osy mikrobiota – střevo – mozek. Stresové faktory způsobují porušení střevních bariér a ve spojení s případným poškozením hematoencefalické bariéry (BBB) dojde k přímému ovlivnění mozkových buněk. Podobné účinky mají i luminální faktory, které jsou detekovány aferentními neurony míchy a bloudivého nervu, které tvoří hlavní spojení mezi střevem a mozkem. Mozek reguluje funkce střevních buněk pomocí signálů přenášených osou hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA). Zkratky: EE buňky = enteroendokrinní buňky, PP buňky = Peyerovy pláty (buňky), BBB = hematoencefalická bariéra (Kubelkova a Macela 2020).

## 1.7 Buněčné linie

### 1.7.1 RAMOS

Jedná se o lidskou B buněčnou linii, která má významnou úlohu při časně fázi imunitní odpovědi. B buňky totiž vytvářejí specifické protilátky při adaptivní imunitní odpovědi. Navíc při infekci intercelulárními bakteriemi mají různé imunoregulační funkce. Imunitní odpověď je touto linií způsobována především produkcí cytokinů, která ale musí být regulována (Matyášová 2011). Produkce cytokinů je závislá na signálních drahách buď přes BCR nebo CD40. Pokud dojde ke stimulaci obou receptorů, dojde k produkci TNF- $\alpha$ , lymfotoxinu a IL-6, což má za následek zesílení imunitní odpovědi. Pokud však dojde ke stimulaci pouze přes CD40, dojde ke zvýšené produkci cytokinů IL-10, což vede k potlačení imunitní odpovědi (Duddy et al. 2004). Významným cytokinem je IFN- $\gamma$ . Ten funguje jako kontrola při napadení virovou nebo bakteriální infekcí, nebo při nádorovém bujení. Tento cytokin je produkován při primární odpovědi po napadení infekcí (Matyášová 2011).

Ramos B-buněčná linie byla stejně jako T-buněčná line Jurkat popsána fenotypizací průtokovou cytometrií (Betters, 2015). Tato laboratorní metoda je velmi důležitá k pochopení původu B-buněčné leukémie a tím i k cílenější a efektivnější léčbě této nemoci. Varma a Naseem (2011) díky této metodě podrobně popsali fenotyp každé podskupiny B-buněčné leukémie a zjistili, že nezralá B-buňka exprimuje CD19 a CD10, zatímco zralá exprimuje pouze CD19.

Jako stimulant se pro tuto linii využívá lipolysacharid (LPS), pro který B buňky exprimují dva receptory TLR4 (ten se vyskytuje na různých buňkách imunitního systému) a RP105 (ten se vyskytuje přednostně na B buňkách a dendrických buňkách). Pokud dojde k aktivaci těchto dvou receptorů, spustí se dvě nezávislé signální dráhy (Matyášová 2011).

Intercelulární bakterie (např.: *Listeria monocytogenes*,) vyvolávají apoptózu B (Menon et al. 2003). Apoptózou skončila i interakce B buněk s *Francisellou tularensis* (Krocova et al. 2008).

### 1.7.2 JURKAT

Jedná se o lidskou buněčnou linii odvozenou od leukemických T-buněk, které způsobují u člověka (především u dětí mužského pohlaví) akutní lymfoblastickou leukémií, která se vyskytuje u prekurzorů T-buněk. U pacientů s diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií se projevuje infiltrací kostní dřeně lymfoblastickými T-buňkami, leukocytózou, zvětšením mezihrudí a poškozením centrální nervové soustavy (CNS) (Anbarlou et al.

2015). Poprvé byla izolována z krve 14-letého chlapce v roce 1977 (Schneider et al. 1977). Více než polovina z nakažených dětí touto nemocí vykazovala ve svých genomech chromozomální translokaci, což z tohoto typu leukémie dělá vysoce nebezpečnou (Jemal et al. 2009). Je totiž velmi náročné nalézt pro ně účinná chemoterapeutika proti kterým by nebyli rezistentní a zároveň má tato choroba vysoké procento recidivy.

Důvodem vzniku rezistence na léčbu, zejména na léčbu ionizujícím zářením a chemoterapii, může být existence nádorových kmenových buněk (Wu a Wu 2009). Tato rezistence je způsobena biochemickými (zvýšená regulace genu ABCB1 a ABCG2) a/ nebo fyziologickými mechanismy (slabá distribuce, hypoxie, nebo kyselé prostředí nádoru) (Mahoney et al. 2003). V úvahu tak připadají alternativní léčebné strategie (Nath et al. 2010). Objasnění mechanismů rezistence na chemoterapeutika by mohla pomoci identifikace nádorových kmenových buněk. Ty mají schopnost proliferovat, samoobnovovat se a diferencovat se na jiné typy nádorových buněk (Wicha et al. 2006). Reya et al. (2001) zjistili, že v nádoru se nacházejí vzácné tumoriniciující buňky, které jsou zodpovědné za původ nádoru a jsou nejdůležitějším faktorem recidivy nádorů. Tyto iniciující buňky se poté diferencují na netumorogenní a mají omezenou proliferaci (Magee et al. 2012). V dnešní době je nádorová terapie zaměřená na eliminaci pouze diferencovaných nádorových buněk, nikoliv těch nediferencovaných a tudíž terapie nemá žádný vliv na nádorové kmenové buňky (Klonisch et al. 2008). Aby byla terapie zaměřená na nediferencované buňky, musí dojít k přesné identifikaci. Pro identifikaci se používají speciální markery buněčného povrchu (Magee et al. 2012). Nejčastěji používaným je marker CD133 (Neuzil et al. 2007). Marker CD133 je dále nutné rozdělit na CD133+ a CD133-. Jurkat buňky s markerem CD133+ vykazovaly vyšší hodnoty proliferace, invaze a rezistence vůči chemoterapeutikům než Jurkat buňky s markerem CD133- (Anbarlou et al. 2015). S linií Jurkat se poměrně často setkáváme v biologických laboratořích, kde slouží pro stanovení mechanismu citlivosti na léky proti rakovině a záření. Jurkat buněčná linie je široce využívána jako modelový systém pro studium T-buněk, nicméně byly zaznamenány problémy na úrovni genové exprese. Jedním z nich například signalizace PI3K z důvodu absence dvou centrálních regulátorů (PTEN a INPP5D) (Abraham a Weiss 2004). Pomocí celogenomového sekvenování byly objeveny mutace v genomu buněčné linie Jurkat, které jsou spojeny s nádory a vytvářejí tak jedinečné vlastnosti této buněčné linie (Gioia et al. 2018).

Cytotoxicita (IC<sub>50</sub> = 50% inhibiční koncentrace buněčného růstu) této buněčné linie je 25,77 μM (Watanabe et al. 2012).

Watanabe et al. (2012)\_zjistil, že flavonoid acacetin inhibuje proliferaci lidských leukemických buněčných linií indukci apoptózy a to pomocí aktivity kaspázy. Kaspáza se zpětně blokuje jejím inhibitorem. Dále zjistil, že apoptózu Jurkat buněčné linie vyvolá inkubace této linie s 40  $\mu\text{M}$  acacetinu po dobu delší než 4 hodiny. Jedním z možných mechanismů je nerovnováha v expresi mezi proapoptickými (např.: protein Bax) a protiapoptickými proteiny (např.: protein Bcl-2) nebo uvolňování cytochromu-c z mitochondrií a následná aktivace ATP-závislého proteinu Apaf-1, který reguluje buněčnou smrt tím, že aktivuje kaspázu.

T-buněčná linie Jurkat se aktivuje různými způsoby. Například se předpokládá, že tyrosinkináza (Nck) hraje významnou roli v aktivaci T-buněk (v lidské tkáni se vyskytují dva typy Nck: Nck1/Ncka a Nck2/Nckb) a tvorbě imunitní synapse mezi T-buňkami a APC buňkami (=antigen-prezentujícími buňkami). Snížená exprese proteinu Nck1 pomocí působení specifické siRNA nezpůsobila žádné změny v apoptóze a proliferaci T-buněk. Pokud se ale T-buňky stimulovali pomocí CD3 $\epsilon$ /CD28, pak došlo po snížení Nck1 ke snížené expresi CD69 a sekreci IL-2 (interleukinu-2) oproti stimulaci PHA (=phytohaemagglutininu) nebo PMA (=phorbol-12-myristát-13-acetát). Také došlo ke snížené fosforylaci proteinů Erk1 a Erk2 (=extracelulárně regulované kinázy 1 a 2) (Yiemwattana et al. 2011).

CD-69 funguje jako aktivační marker pro T-buňky. Působí jako silný receptor, přenášející signál na lymfocyty, podílí se na regulaci cytokinových genů a migraci buněk po aktivaci lymfocytů (Shiow et al. 2006).

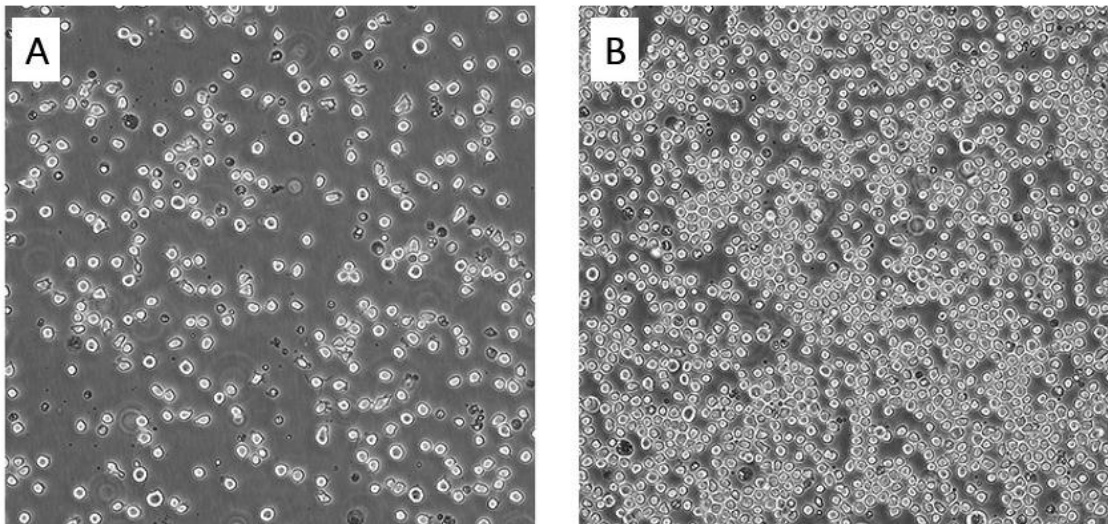
### **1.7.3 U937**

U937 je promonocytární buněčná linie, která způsobuje leukemický monocytární lymfom. Její morfologie je identická s morfologií nádorových buněk. Tato linie vznikla z lidského difúzního histiocytárního lymfomu a byla izolována v roce 1976 z lymfomu 37letého muže (Sundström a Nilsson 1976). Charakteristický je pro tyto buňky kulatý tvar, krátké mikroklky a velké paprskovité jádro (Tenuzzo et al. 2008). Slouží jako model pro in vitro diferenciaci monocytů a makrofágů. Hlavní výhodou je možnost připravit prakticky neomezené množství homogenních buněk v laboratoři a žádné tendence přichytávání (adheze). Z těchto monocytů se mohou diferencovat buď makrofágy, nebo dendrické buňky. O tom, jaká diferenciací proběhne, rozhodují podmínky mikroprostředí, jako je například přítomnost různých látek (DMSO, TPA, kyselina retinová, Zn<sup>2+</sup>, glutamin) (Mendoza-Coronel a Castañón-Arreola 2016). Například, pokud je přítomen PMA (=phorbol-12-myristát-13-acetát), dojde k diferenciaci na „makrofágům podobným“

buňkám, které mají plochý nepravidelný tvar, vytvářejí pseudopodia a rádi adherují, (Christine Hsiao et al. 2011). Makrofágy mají schopnost nescifické imunitní odpovědi a to díky vytváření reaktivních forem kyslíku během fagocytózy cizích částic (Prasad et al. 2020).

U937 ovlivňuje acacetin a to stejným způsobem jako buněčnou linii Jurkat (Watanabe et al. 2012). Sundström a Nilsson (1976) zjistili, že buňky U-937 se liší od neoplastických lymfoidních a myeloidních buněk expresí povrchových markerů, kdy linie U-937 vykazuje na svém povrchu četné receptory C3, kdežto buňky lymfocytární a myeloidní leukémie mají na povrchu pouze malé množství případně vůbec žádné receptory C3.

Cytotoxicita (IC<sub>50</sub>) této buněčné linie je 45,71 μM (Watanabe et al. 2012).



Obrázek 14: Rozdílná hustota buněčné linie U937 A) nízká hustota B) vysoká hustota (ATCC 2022).

## 2 Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit změny v expresi jednotlivých aktivačních znaků po přidání různých koncentrací alkohol-éterového hovězího extraktu (dále jen HE) do kultivačního média před ozáření buněk po 24, 48 a 72 hodinách kultivace u tří buněčných linií (Ramos, Jurkat, U937) po přidání tří různých koncentrací hovězího extraktu (15 mg/ml; 1,5 mg / ml a 0,15 mg / ml) a vzhledem ke kontrolnímu vzorku zjistit, jak se tato suplementace projeví na posunu v mediánu intenzity imunofluorescence (MFI). Dalším cílem bylo porovnat tento posun s buňkami ozářenými gama zářením.



## 3 Metodika

V mé diplomové práci byl testován alkohol-éterový extrakt hovězí tkáně, proto bude v praktické části mé práce používán pod názvem hovězí extrakt (HE), který je základem pro komerčně prodávaný přípravek Juvenil.

### 3.1 Použitý materiál

#### Seznam používaných chemikálií

- růstové médium RPMI 1640
- 10% FBS (Fetal Bovine Serum)
- hovězí extrakt o třech koncentracích (15 mg/ml; 1,5 mg/ml; 0,15 mg/ml)
- LPS (lipolysacharid)
- PMA (phorbol-12-myristát-13-acetát)
- PHA (phytohaemaglutinin)
- Cell Wash (phosphate buffered saline, 0,2% želatina, 0,1% azid sodný)
- aktivační znaky (CD69; CD25; CD206; CD86; CD11b)
- PI (propidium jodid)

#### Seznam používaných laboratorních pomůcek

- kónická zkumavka (15 ml)
- kryozkumavka
- pipety o různých objemech
- kultivační lahve (25cm<sup>3</sup>; 75 cm<sup>3</sup>; 125 cm<sup>3</sup>)
- obyčejné zkumavky o různých objemech
- špičky na pipety o různých objemech
- Bürkerova komůrka
- kalkulačka
- 24jamková destička
- FACSové zkumavky (1ml; 4ml)
- kádinky o různých objemech

#### Seznam používaných přístrojů

- centrifuga (Schoeller, Česká republika)
- termostat (Binder, Německo)

- zářič gama záření kobalt 60 (Chisotron, Chirana, Česká republika)
- automatická pipeta
- vortex (Bio-tech, Česká republika)
- laminární box (ThermoFisher Scientific, USA)
- průtokový cytometr CyAn (Beckman Coulter, USA)

### **Seznam používaných softwarů**

- program Summit V4.3 Build 2445 (RIC Facility, USA)
- program Microsoft Excel verze 2204 (Microsoft, USA)
- GraphPad Prism 9 Software (LLC, USA)

## **3.2 Buněčné linie**

### **3.2.1 Buněčná linie Ramos**

K buněčné linii Ramos byly přidávány protilátky proti aktivačním znakům CD19 a CD25, kde CD19 byla konjugována s FITC (=fluorescein-5-isothiokyanát) a CD25 s APC (=allofykocyanin). Provedeny byly tři nezávislé experimenty (viz tabulka 4).

### **3.2.2 Buněčná linie Jurkat**

K buněčné linii Jurkat byly přidávány protilátky proti aktivačním znakům CD69 a CD25, kde CD69 byla konjugována s FITC (=fluorescein-5-isothiokyanát) a CD25 s APC (=allofykocyanin). Provedeny byly tři nezávislé experimenty (viz tabulka 4).

### **3.2.3 Buněčná linie U937**

V buněčné linii U937 byly přidávány protilátky proti aktivačním znakům CD206, CD86 a CD11b, kde protilátka proti CD206 byla konjugována s APC (=allofykocyanin), CD86 s FITC (=fluorescein-5-isothiokyanát) a CD11b s PE (=fykoerythrin). Provedeny byly tři nezávislé experimenty (viz tabulka 4).

## **3.3 Kultivace buněk**

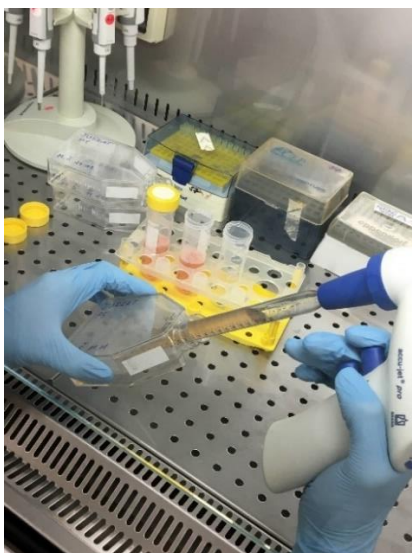
Používány byly buněčné linie zamražené v alikvotech ( $1 \cdot 10^6$  buněk,  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Ve všech případech se jednalo o neadherentní linie, které se kultivovali v růstovém médiu RPMI 1640 s 10% sérem FBS (Fetal Bovine Serum).

### **3.4 Rozmražení buněk**

Do kónické zkumavky o objemu 15 ml bylo připraveno 5 ml kultivačního média s 20% FBS. Kryozkumavka s alikvotem vybrané linie se nechala mírně povolit, aby se uvolnil obsah, který byl poté co nejrychleji převeden do kónické zkumavky s kultivačním médiem, ve kterém se nechal rozpustit. Následně bylo médium s buňkami centrifugováno (5 min, 24 °C, 1200 rpm). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, k peletě bylo přidáno 10 ml média (20% FBS), provedla se resuspendace, objem byl převeden do kultivační lahve o objemu 25 cm<sup>3</sup> a objem se dal inkubovat při 37°C s 5% CO<sub>2</sub> po dobu 48 hodin v termostatu.

### **3.5 Pasáž buněk**

Po 48 hodinách od nasazení buněk byla provedena první pasáž. Z kultivačních nádob byly buňky převedeny do zkumavek pomocí automatické pipety, poté byly nádoby opláchnuty pomocí PBS a převedeny do stejných zkumavek (viz obrázek 15). Tyto zkumavky byly centrifugovány (5 min, 24 °C, 1200 rpm). Následně byl odstraněn pipetou supernatant a k usazeným buňkám bylo přidáno 5 ml nového, ohřátého média a provedla se resuspendace pelety špičkou pipety. Poté byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky (viz obrázek 16 a 17) a byla určena jejich životnost. Podle počtu buněk byla zvolena velikostně odpovídající kultivační lahev (viz tabulka 2) s novým kultivačním médiem a opět se buňky nechali inkubovat při 37 °C s 5% CO<sub>2</sub> po dobu 48 hodin v termostatu. Před nasazením buněk do pokusu byla provedena pasáž min. 4x a max. 20x. Pokud byla životnost buněk před nasazením do experimentu pod 90 %, tak se provedla další pasáž.



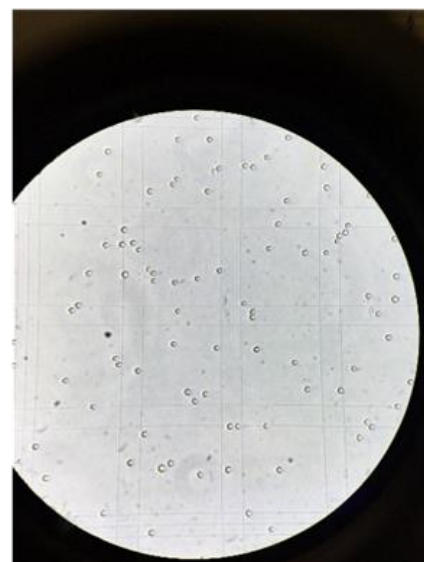
Obrázek 15: Pasážování buněk v laminárním boxu.

Tabulka 2: Druhy kultivačních lahví dle objemu a příslušných množství média a buněk.

Kultivační lahev	ml média	Počet nasazovaných buněk
25 cm <sup>3</sup>	10 ml	1.10 <sup>6</sup> buněk
75 cm <sup>3</sup>	20 ml	2.10 <sup>6</sup> buněk
125 cm <sup>3</sup>	50 ml	5.10 <sup>6</sup> buněk



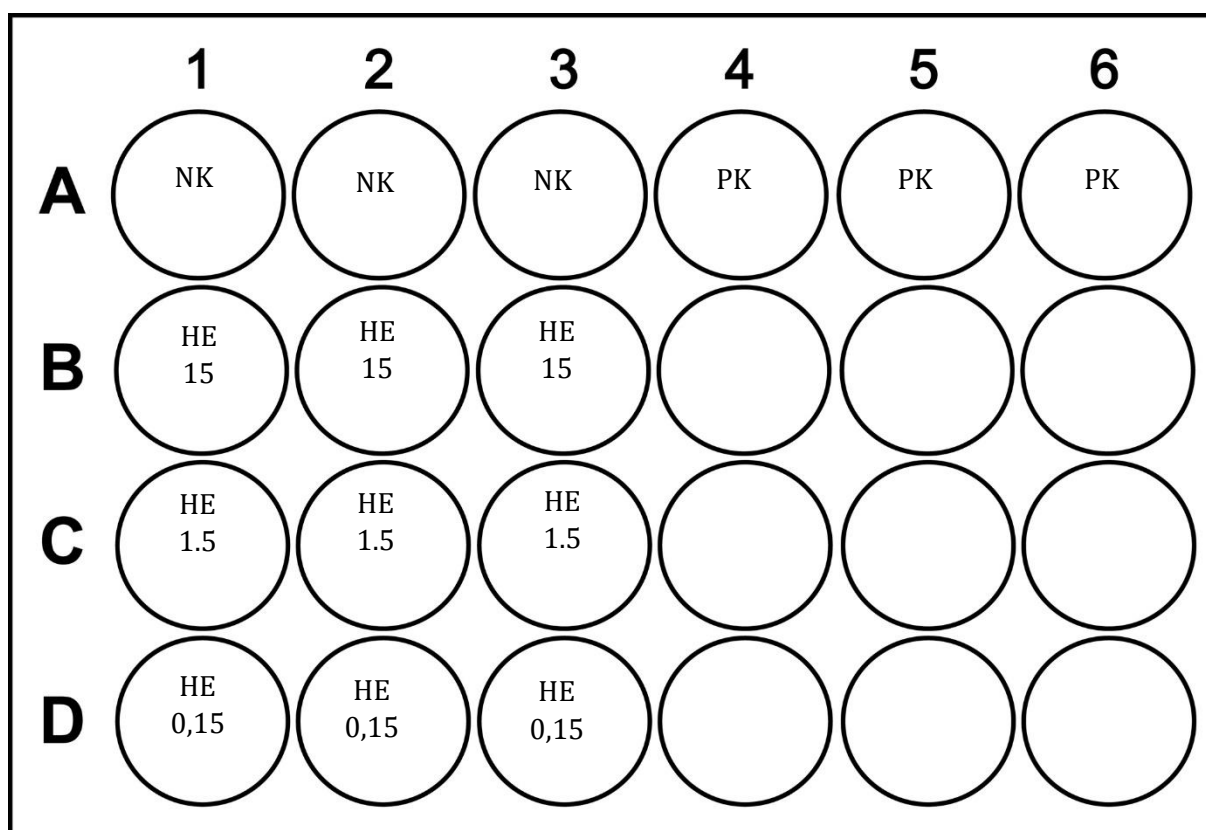
Obrázek 17: Bürkerova komůrka s buňkami pod mikroskopem.



Obrázek 16: Pohled na mikroskop, kde probíhalo počítání buněk.

### 3.6 Nasazení buněk do pokusu

Dle schématu byl do 24jamkové destičky napipetován 1 ml buněk o koncentraci  $5 \cdot 10^5$  buněk/ml v kultivačním médiu. Nasazeno bylo 6 destiček pro následné kultivace 24, 48 a 72 hodin (3 pro ozáření a 3 pro kontrolu). Negativní kontrolu (NK) tvořily buňky bez ovlivnění, pozitivní kontrolou byly stimulované buňky dle tabulky (LPS, PHA, PMA). HE byl použit ve třech koncentracích: 15 mg/ml, 1,5 mg/ml a 0,15 mg/ml (viz obrázek 18). Destičky určené pro ozáření byly následně ozářeny gama zářením 2 Gy. K ozáření buněk byl použit jako zdroj gama záření kobalt 60 (Chisotron, Chirana, Česká republika). Dávkový příkon byl v rozmezí 0,867637-0,830043 Gy/min a buňky byly pod zářič umístěny ve vzdálenosti 100 cm. Následně se nechaly destičky inkubovat 24, 48 a 72 hodin. Pokus byl prováděn v triplikátu.



Obrázek 18: Schématické znázornění 24jamkového panelu. Zkratky: NK = negativní kontrola, PK = pozitivní kontrola, HE15 = hovězí extrakt o koncentraci 15 mg/ml, HE1,5 = hovězí extrakt o koncentraci 1,5 mg/ml, HE0,15 = hovězí extrakt o koncentraci 0,15 mg/ml.

### 3.7 Barvení buněk

V každém časovém intervalu byla buněčná suspenze převedena do 15 ml zkumavek a centrifugována (7 min, 4 °C, 1200 rpm). Vzniklý supernatant byl odebrán a ke zbytku bylo přidáno 4 ml Cell Wash (PBS/želatina/azid sodný), suspenze se protřepala na vortexu a znovu centrifugovala za stejných podmínek. Po odebrání supernatantu bylo do všech zkumavek přidáno 0,3 ml Cell Wash, suspenze se promíchala a z každé zkumavky bylo napipetováno 200 µl do 1ml FACSových zkumavek a měřilo se na průtokovém cytometru cca 30 000 událostí jako negativní kontrola. Dále bylo z každé 15ml zkumavky napipetováno 100 µl buněk do 4ml FACSových zkumavek, které byly dále použity na barvení CD znaků. Dle schématu bylo do každé zkumavky přidáno po 1 µl naředěných protilátek (viz tabulka 3), proběhlo promíchání na vortexu a inkubovalo se 15 min v pokojové teplotě ve tmě. Po inkubaci bylo do zkumavek napipetováno 3 ml Cell Wash, suspenze se centrifugovala (7 min, 4 °C, 1200 rpm), odpipetoval se supernatant, došlo k resuspendaci v 250 µl Cell Wash a celý objem byl převeden do 1ml FACSových zkumavek.

Tabulka 3: Zkoumané buněčné linie včetně jejich aktivačních znaků a stimulačních látek. Zkratky: PHA = phytohaemagglutinin, LPS = lipopolysacharid, PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate, FBS = Fetal Bovine Serum.

Linie	Typ buněk	Aktivační znaky	Stimulace	Médium	Zdroje
JURKAT	T-buňky	CD69	PHA (4 µg/ml)	RPMI 1640, FBS	(Fernández-Riejos et al. 2008)
		CD25	(phytohaemagglutinin)		
RAMOS	B-buňky	CD19	LPS (1µg/ml)	RPMI 1640, FBS	(Leroux-Roels et al. 2016)
		CD25	PMA (100 ng/ml) (phorbol 12-myristate 13-acetate)		(Rex et al. 2015)
U937	makrofágy	CD11b	LPS (1µg/ml)	RPMI 1640, FBS	(Puerta-Guardo et al. 2013)
		CD86	PMA (100 ng/ml)		
		CD206	(phorbol 12-myristate 13-acetate)		

Tabulka 4: Použité aktivační znaky včetně fluorochromů na nich navázaných. Zkratky: FITC = fluorescein-5-isothiokyanát, APC = allofukocyanin, PE = fykoerythrin.

Název aktivačního znaku	Fluorochrom	Klon	Výrobce	Katalogové číslo
anti-human CD69	FITC	FN50	BioLegend	310903
anti-human CD25	APC	BC96	BioLegend	302609
anti-human CD19	FITC	HIB19	BioLegend	302205
anti-human CD11b	PE	ICRF44	BioLegend	301305
anti-human CD86	FITC	BU63	BioLegend	374203
anti-human CD206	APC	15.II	BioLegend	321109

### 3.8 Průtoková cytometrie

Na průtokovém cytometru (viz obrázek 19) bylo změřeno cca 30 000 událostí. Do označených zkumavek byl před měřením přidán PI. Po proběhnutí 30 000 událostí byla na počítači v programu Summit (verze V4.3 Build 2445; RIC Facility, USA) provedena kompenzace a výběr populací pro vlastní analýzu (viz obrázek 20). Poté byla všechna naměřená data exportována z programu Summit do programu Excel (verze 2204, Microsoft, USA), kde se s nimi dále pracovalo. Hlavním údajem byl medián intenzity fluorescence = MFI.



Obrázek 19: Průtokový cytometr Cyan.



Obrázek 20: Analýza vzorků z průtokové cytometrie v programu Summit.

### **3.9 Statistické vyhodnocení**

Všechna data byla vyhodnocena jednorozměrnou analýzou rozptylu ANOVA na hladině významnosti  $p < 0,05$  (GraphPad Prism 9 Software, LLC, USA). Jelikož nebyly zjištěny významné rozdíly mezi skupinami, tak nebyl použit žádný z posthoc testů.



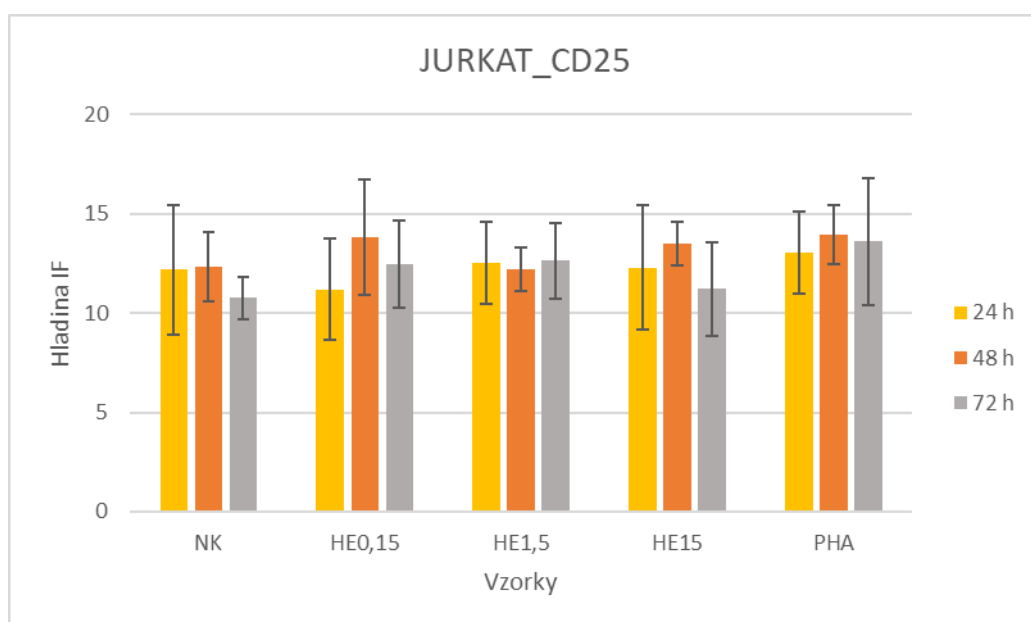
## 4 Výsledky

### 4.1 Buněčná linie Jurkat

#### Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD25 v buněčné linii Jurkat

Receptor CD25 (IL2R $\alpha$ ) je alfa řetězec receptoru interleukinu 2 (IL2). Řetězce IL2R $\alpha$  a IL2R $\beta$  tvoří, společně s gama řetězcem IL2R  $\gamma$ , vysokoafinitní IL2 receptor. Homodimerní IL2R $\alpha$  vede k receptoru s nízkou afinitou (BioLegend 2021).

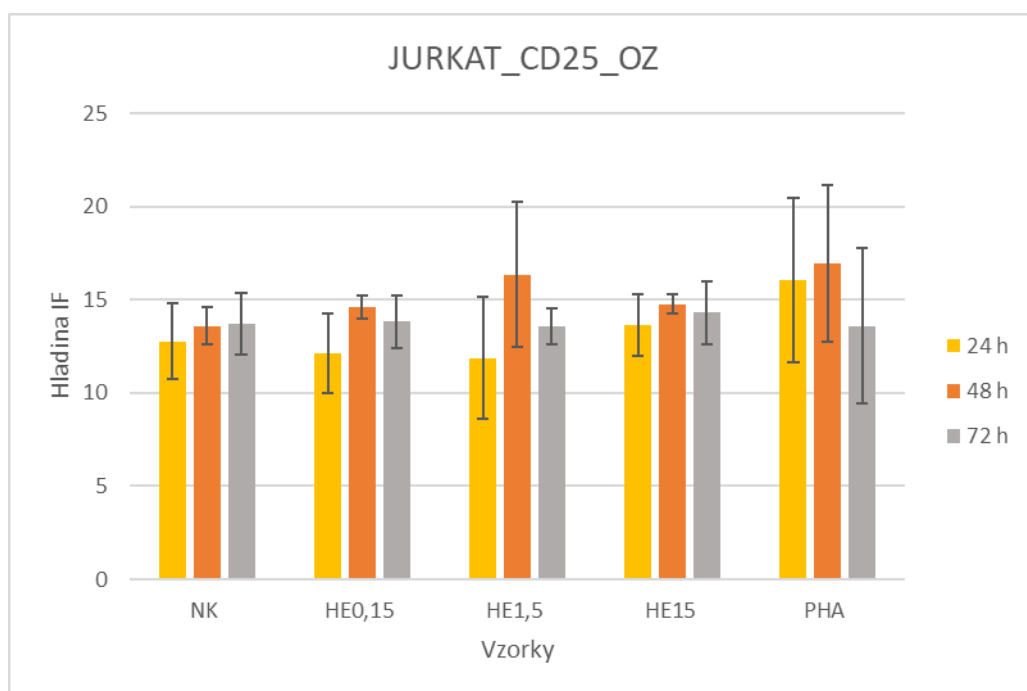
Nejvyšší hodnoty MFI byly naměřeny po přidání phytohaemaglutininu (PHA) jako pozitivní kontroly. Z naměřených hodnot vyplývá, že po kultivaci 48 hodin byla hladina MFI u všech vzorků nejvyšší. Výjimku tvoří vzorek s koncentrací hovězího extraktu 1,5 mg/ml, u kterého byla při 48hodinách kultivace naměřena nejnižší hodnota ze všech tří kultivací. U vzorků doplněných o hovězí extrakt se nedá mluvit o nějakém trendu v posunu MFI. Pouze u intervalu 72 hodin je vidět nižší hodnota u negativní kontroly, pak vyšší konstantní hodnota u všech tří koncentrací hovězího extraktu, a nakonec nejvyšší hodnota u pozitivní kontroly. Došlo zde tedy k zvýšení MFI proti negativní kontrole.



*Graf 1: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie Jurkat při použití markeru CD25. Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence.*

## Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD25 v buněčné linii Jurkat po ozáření 2 Gy

U tohoto měření byly nejvyšší hodnoty MFI zaznamenány u vzorku s PHA. Vidět je i vliv doby kultivace, kde nejvyšších hodnot dosahovaly vzorky kultivované 48 hodin u každého ze stimulovaných vzorků. Neplatí to u vzorku, který nebyl ničím ovlivněn. Zde byly naměřeny nejvyšší hodnoty u kultivace 72 hodin. Nejnižších hodnot dosahoval u všech vzorků interval kultivace 24 hodin. Výjimku tvoří pozitivní kontrola, kde nejnižších hodnot dosahoval interval kultivace 72 hodin. U vzorků, kultivovaných 24 hodin a ovlivněným hovězím extraktem, se nedá popsat jednoznačný trend v posunu imunofluorescence. Koncentrace 0,15 a 1,5 mg /ml měla snižující tendenci, ale vzorek suplementovaný HE o koncentraci 15 mg/ml vykazoval vyšší hodnoty, než měla negativní kontrola. Kultivace 48 hodin jednoznačně ukázala na zvýšení MFI u vzorků ovlivněných hovězím extraktem proti negativní kontrole. Nejdelší doba kultivace neměla na vzorky velký vliv. Všechny vzorky měly při této kultivace podobnou imunofluorescenci.



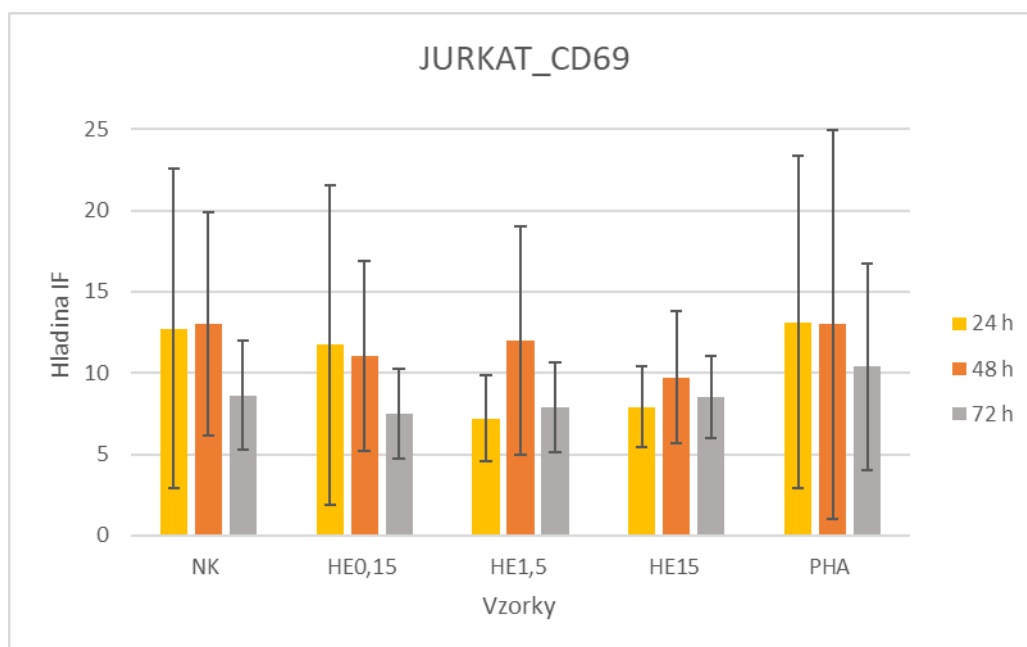
Graf 2: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie Jurkat při použití markeru CD25 a ozáření gama zářením 2 Gy. Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence, OZ = ozářené vzorky.

Obecně vykazovaly vzorky ozářené 2 Gy vyšší hodnoty než vzorky neozářené. Tyto rozdíly se s dobou kultivace zvětšovaly.

## Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD69 v buněčné linii Jurkat

Receptor CD69 je membránově vázaný C-lektinový receptor typu II, který je považován za marker tkáňové rezistence a typický marker pro lymfocyty (Cibrián a Sánchez-Madrid 2017).

Při tomto pokusu byly nejvyšší hodnoty MFI u jednotlivých vzorků naměřeny po 48hodinové kultivaci, výjimku tvoří pozitivní kontrola a vzorek s nejnižší koncentrací HE, u kterých byly nejvyšší hodnoty naměřeny po kultivaci 24 hodin. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u vzorku s pozitivní kontrolou, tedy s PHA. Následoval vzorek, který nebyl ničím suplementován. Vzorky, které byly ovlivňované HE vykazovaly nižší hodnoty imunofluorescence než negativní a pozitivní kontrola při všech dobách kultivace. Došlo u nich tedy k snížení MFI.

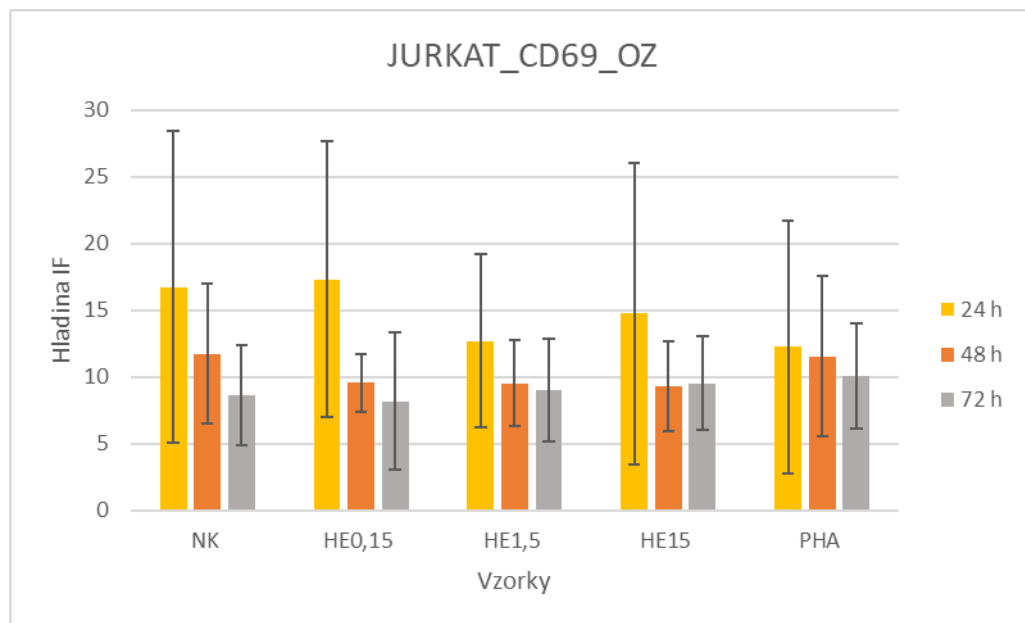


Graf 3: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie Jurkat při použití markeru CD69. Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence.

## Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD69 v buněčné linii Jurkat po ozáření 2 Gy

S dobou kultivace klesaly hodnoty u všech vzorků kromě vzorku HE15, kde byla hodnota u 72hodinové kultivace vyšší než u 48hodinové kultivace. Při porovnávání doby kultivace je jednoznačně vidět, že nejvyšších hodnot dosahovaly vzorky kultivované 24 hodin. Zároveň u nich ale byla naměřena nejvyšší směrodatná odchylka, a tudíž se jejich trend

těžko popisuje. Při kultivaci 48 hodin mají všechny tři koncentrace HE podobné hodnoty. Tyto hodnoty jsou však nižší než hodnoty u pozitivní a negativní kontroly. Zde je tak vidět jednoznačný posun imunofluorescence do nižších hodnot proti negativní kontrole, ve které je konstantní. Při kultivaci 72 hodin se hodnoty MFI se stoupající koncentrací HE zlehka zvyšovaly směrem k hodnotám pozitivní kontroly. U této doby kultivace dosahuje negativní kontrola vyšší hodnoty než vzorek ovlivněný HE pouze u vzorku s nejnižší koncentrací HE. Zde tedy pozorujeme zvýšení hodnoty imunofluorescence se stoupající koncentrací HE, až na vzorek HE0,15.



Graf 4: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie Jurkat při použití markeru CD69 a ozáření gama zářením 2 Gy. Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence, OZ = ozářené vzorky.

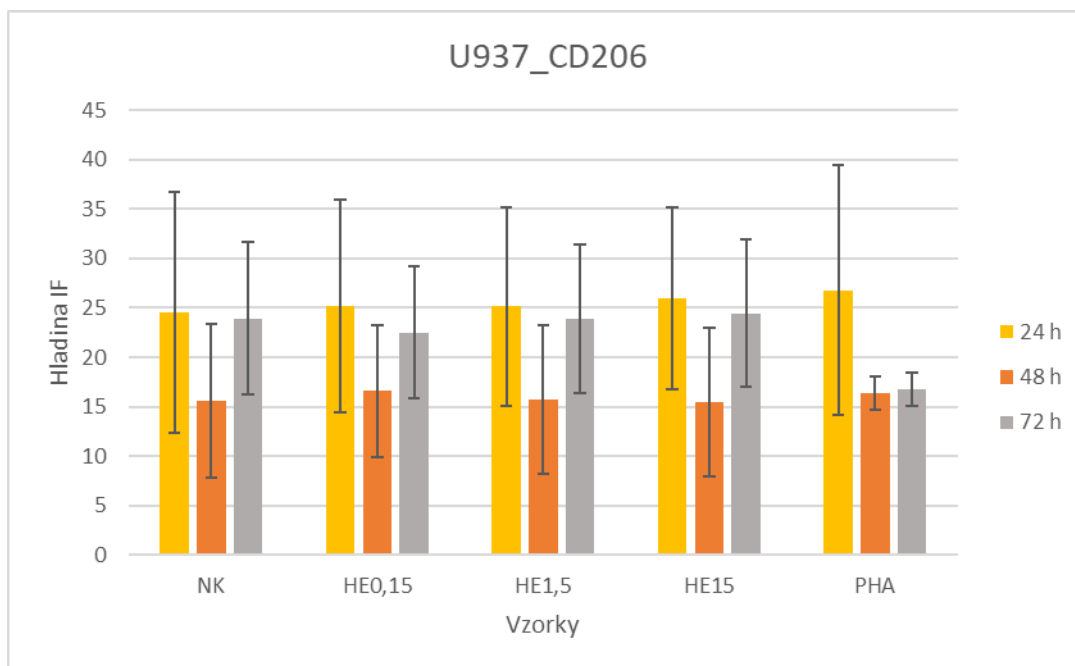
Při porovnání ozářených a neozářených buněk u tohoto znaku bylo pozorováno, že při 24hodinovém a 72hodinovém intervalu dochází k zvýšení MFI u ozářených buněk proti těm neozářeným. Opačný trend lze pozorovat u kultivace 48 hodin, kde ozářené buňky dosahovaly nižších hodnot MFI než buňky neozářené.

## 4.2 Buněčná linie U937

### Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD206 v buněčné linii U937

Marker CD206 je membránově vázaný protein, který je primárně exprimovaný makrofágy a dendritickými buňkami. CD206 rozpoznává a váže širokou škálu ligandů a je to účinný endocytární receptor (Nielsen et al. 2020).

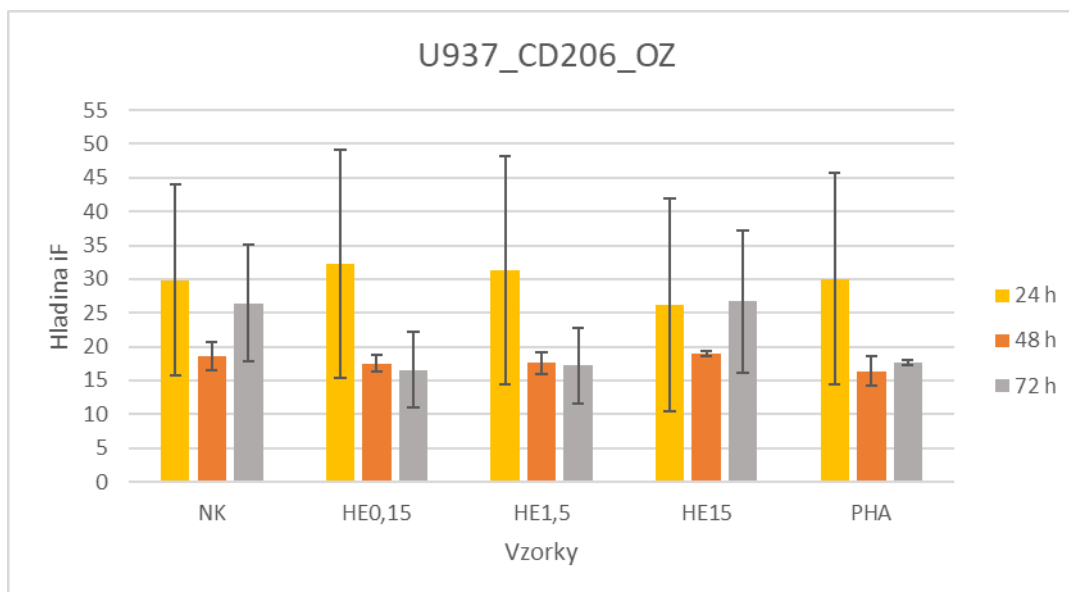
Trend vlivu doby kultivace na výslednou hodnotu MFI u každého měření je poměrně jasný. Nejvyšších hodnot dosahovaly vzorky kultivované 24 hodin. Jen o něco nižších hodnot dosahovala kultivace 72 hodin. Naopak značně nižších hodnot proti předchozím dvěma kultivacím dosahovala kultivace 48 hodin. Jedinou výjimku tvoří pozitivní kontrola, u které rozdíl mezi 48hodinovou kultivací a 72hodinovou kultivací nebyl tak výrazný. U kultivace 24 hodin byla ale naměřena velmi vysoká směrodatná odchylka. Posun v hodnotách imunofluorescence nebyl obecně mezi skupinami nijak výrazný. U kultivace 24 hodin sice bylo vidět lehké zvýšení MFI u vzorků s HE proti negativní kontrole, ale při kultivaci 48 hodin se tento trend nepotvrdil. Při této kultivaci došlo k zvýšení MFI u vzorku s nejnižší koncentrací HE. Tento posun se ale se zvyšující se koncentrací HE nezvyšoval, naopak klesal směrem k hodnotám negativní kontroly a při koncentraci 15 mg/ml už byl dokonce nižší než u hodnoty negativní kontroly. U kultivace 72 hodin byly hodnoty MFI obecně nižší, avšak zvyšující se koncentrace HE vedla i ke zvýšení hodnot MFI. Zajímavé je, že pozitivní kontrola má v tomto případě nižší hodnotu než ostatní vzorky.



*Graf 5: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie U937 při použití markeru CD206. Údaje představují průměrnou hodnotu ± směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence.*

### **Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD206 v buněčné linii U937 po ozáření 2 Gy**

Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u vzorků kultivovaných 24 hodin. U negativní kontroly je trend stejný jako u neozářených buněk. Tedy nejvyšších hodnot bylo dosaženo po kultivaci 24 hodin, následovaly hodnoty naměřené po kultivaci 72 hodin a nejnižších hodnot bylo naměřeno po kultivaci 48 hodin. U vzorků ovlivněných HE je však patrné, že po kultivaci 48 a 72 hodin jsou výsledky téměř totožné. Výjimku zde tvoří vzorek HE15, u kterého byla naměřená hodnota po kultivaci 72 hodin vyšší než po kultivaci 48 hodin. Výsledky pozitivní kontroly vykazovaly, co se doby kultivace týká, stejný trend jako vzorky ovlivněné nižší koncentrací hovězího extraktu (0,15 a 1,5 mg/ml). Ani zde nedosahovala pozitivní kontrola nejvyšších hodnot. Při 24hodinovém intervalu kultivace došlo k malému zvýšení MFI u vzorků ovlivněných HE. Tento posun se ale s přibývajícím koncentrací HE zmenšoval, až se dostal pod hodnotu negativní kontroly (u vzorku HE15). Hodnoty vzorků po kultivaci 48 hodin jsou téměř totožné, zatímco u kultivace 72 hodin je pozorováno snížení MFI proti porovnání s negativní kontrolou. Při tomto intervalu kultivace došlo ke snížení MFI u vzorků ovlivněných HE. Tento posun se ale s přibývajícím koncentrací HE zvětšoval, až se dostal nad hodnotu negativní kontroly (u vzorku HE15). Jedná se tedy o zcela opačný trend oproti 24hodinovému intervalu kultivace.



Graf 6: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie U937 při použití markeru CD206 a ozáření gama zářením 2 Gy. Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence, OZ = ozářené vzorky.

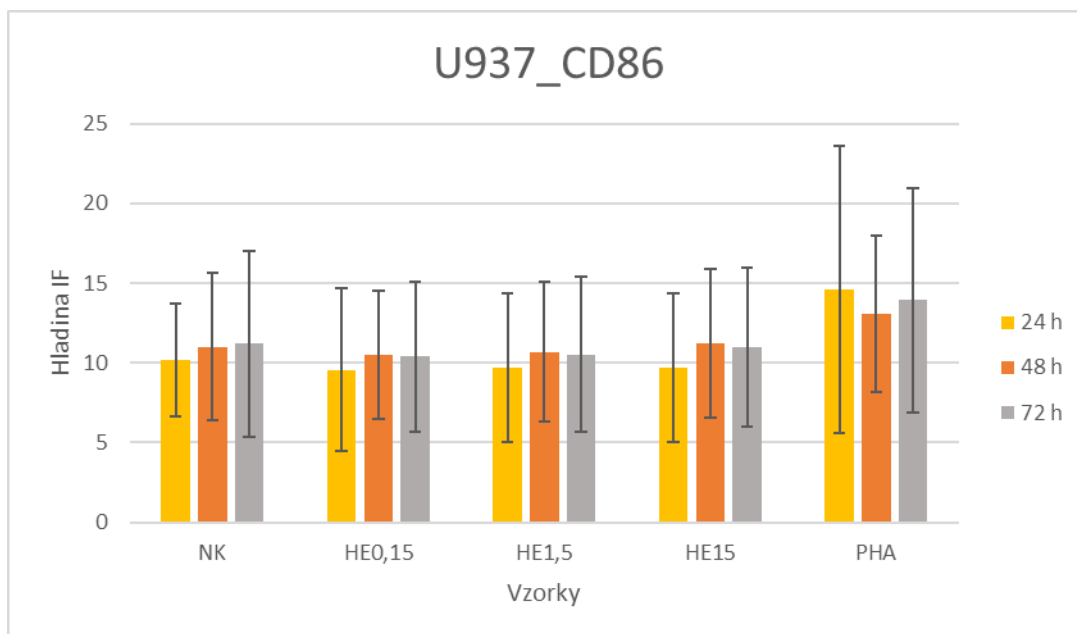
Při porovnání ozářených a neozářených buněk je patrné, že rozdíly mezi jednotlivými časovými úseky kultivace jsou podobné. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u 24hodinového intervalu, pak u 72hodinového intervalu a nejnižší u 48hodinového intervalu. Tento trend ale neplatí u ozářených vzorků HE0,15 a HE1,5, kde hodnoty po 72hodinách kultivace jsou téměř stejné jako hodnoty po kultivaci 48 hodin. Naměřené hodnoty MFI u ozářených buněk byly vždy vyšší než u buněk neozářených. Jedinou výjimku tvoří opět vzorky HE0,15 a HE1,5.

### Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD86 v buněčné linii U937

Marker CD86 je glykoprotein patřící mezi imunoglobuliny. CD86 je velmi podobný s CD80 a stejně jako CD80 zvyšuje produkci IL-2 (Axelsson et al. 2020).

Z naměřených hodnot je patrné, že 24hodinový interval kultivace u všech vzorků dosahoval nejnižších hodnot. Výjimkou je vzorek s přidaným PHA, kde tato hodnota byla nejvyšší. U všech vzorků je také vidět, že naměřené hodnoty po kultivaci 72 hodin se nijak významně neliší od hodnot naměřených po kultivaci 48 hodin. Výjimku opět tvoří pozitivní kontrola, kde rozdíl mezi těmito kultivacemi trochu patrný je. U 24hodinového intervalu kultivace bylo pozorováno snížení MFI u vzorků ovlivněných různými koncentracemi HE proti negativní kontrole. Tento posun se navíc jeví jako konstantní u všech tří koncentrací. Stejný trend lze pozorovat u vzorků po kultivaci 72 hodin, kde se ale vzorek s nejvyšší koncentrací HE více přiblížil hodnotě negativní kontroly. Tento trend je

zesílen u 48hodinového intervalu kultivace, při které už dokonce průměrná hodnota HE15 převyšuje průměrnou hodnotu negativní kontroly.

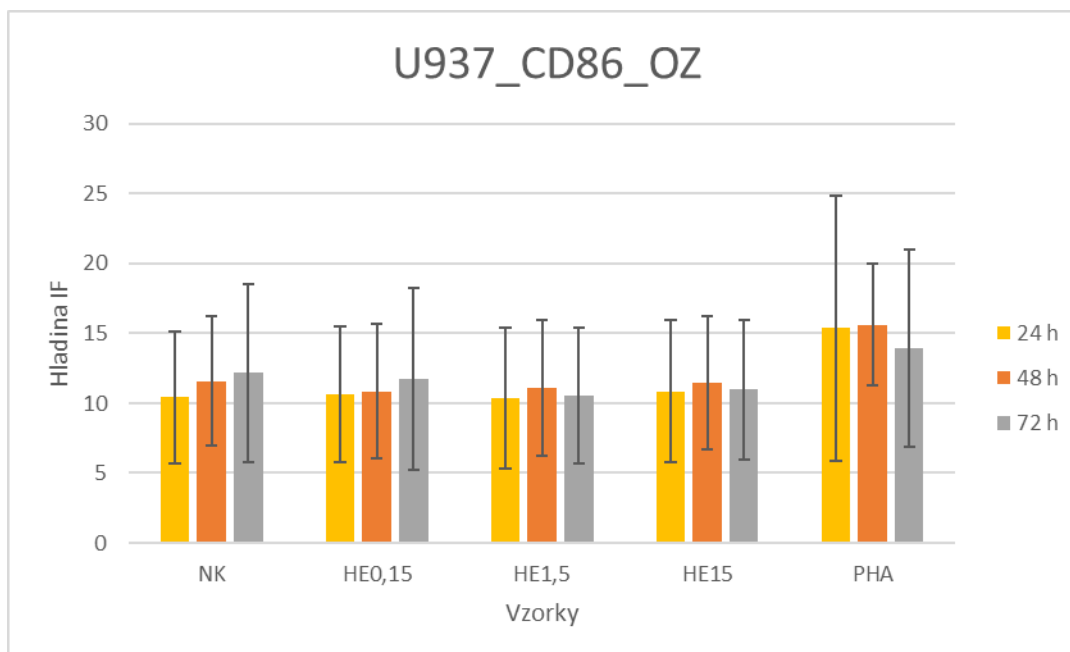


Graf 7: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie U937 při použití markeru CD86. Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence.

### Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD86 v buněčné linii U937 po ozáření 2 Gy

V každém vzorku došlo k naměření vyšší hodnoty MFI u 48hodinového intervalu než u stejných vzorků při měření po kultivaci 24 hodin. U intervalu kultivace 72 hodin docházelo u negativní kontroly a u vzorku s koncentrací HE0,15 mg/ml k navýšení hodnoty MFI proti kratším kultivacím. Vzorky HE1,5, HE15 a PHA proti tomu měly nižší hodnotu MFI imunofluorescence než 24hodinové, respektive 48hodinové intervaly kultivace. Pozitivní kontrola měla naměřené nejvyšší průměrné hodnoty MFI u všech tří intervalů kultivace. Negativní kontrola měla stejně jako všechny ovlivněné vzorky HE téměř totožnou průměrnou hodnotu. Nedá se tedy mluvit o nějakém výrazném trendu v posunu MFI. Stejná situace platí i u 48hodinového intervalu kultivace. Nepatrný posun nastal u kultivace 72 hodin, při kterém se průměrné hodnoty IF u buněk ovlivněných HE nepatrně snížily.





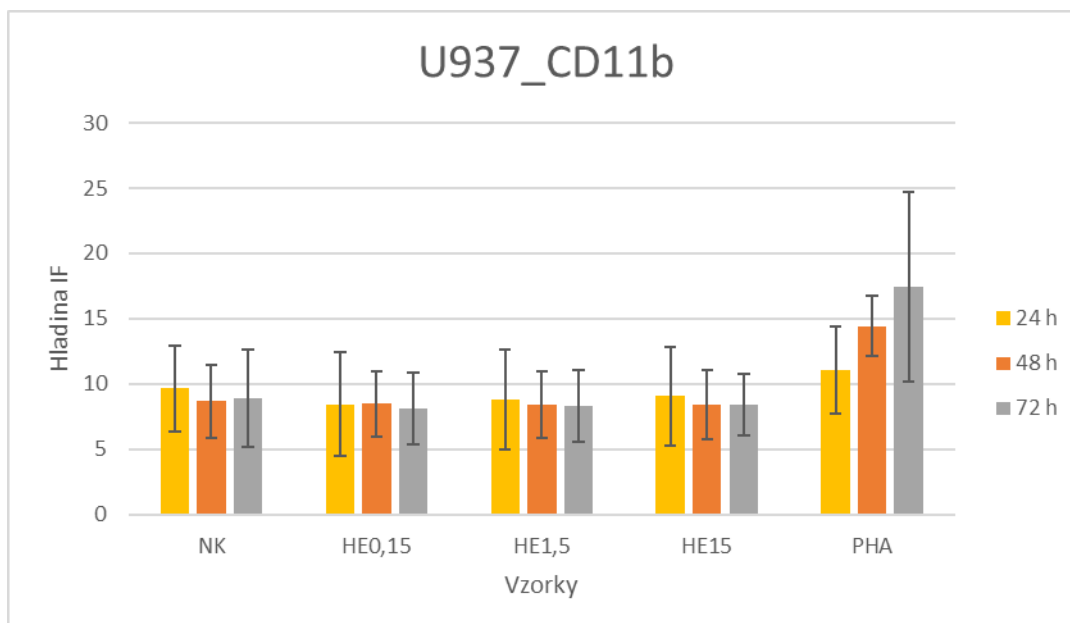
*Graf 8: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie U937 při použití markeru CD86 a ozáření gama zářením 2 Gy. Údaje představují průměrnou hodnotu ± směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence, OZ = ozářené vzorky.*

Při porovnávání hodnot ozářených a neozářených stejných vzorků je patrné, že ozářené buňky ve všech dobách kultivace vykazovaly vyšší hodnoty MFI. Zajímavá situace nastala u vzorků PHA, HE15 a HE1,5, kde u 72hodinového intervalu kultivace byly průměrné hodnoty IF totožné. Nutné je ale říct, že zde byly velké směrodatné odchylky.

### **Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD11b v buněčné linii U937**

Marker CD11b společně s CD18 tvoří heterodimerní komplexní protein CD11, který se podílí na adhezi granulocytů, fagocytóze a aktivaci neutrofilů. Je rozhodující pro transendoteliální migraci monocytů a neutrofilů. Zároveň reguluje vychytávání částic a používá se jako mikrogliální marker pro tkáň nervového systému (BioLegend 2018).

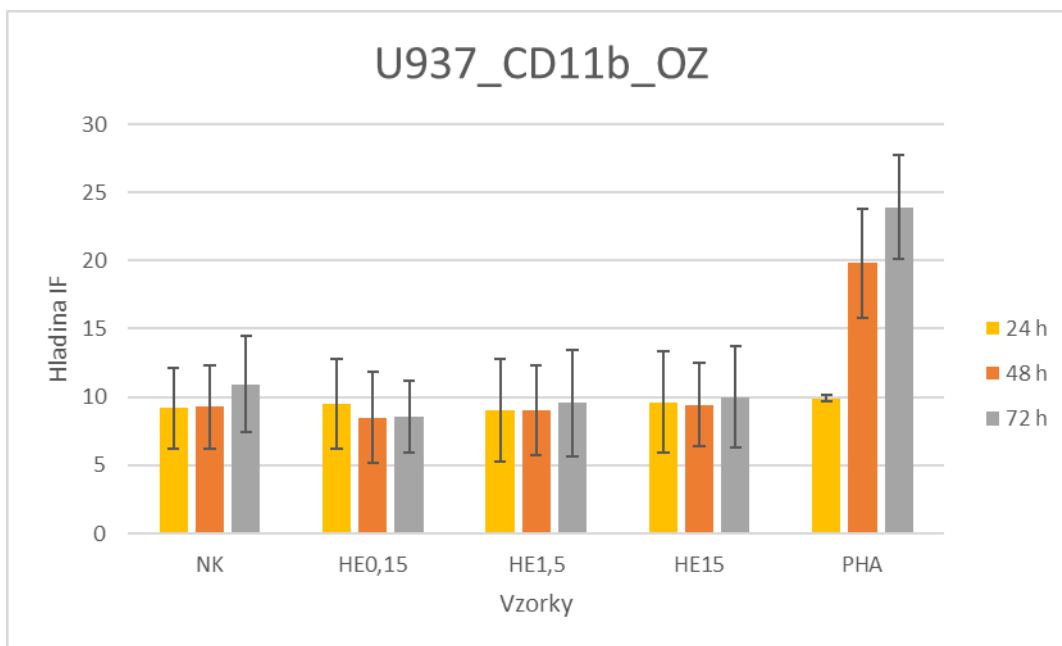
V této linii lze pozorovat, že u každého vzorku (kromě pozitivní kontroly) je průměrná hodnota IF velmi podobná pro kultivaci 48 i 72 hodin. Hodnota pro kultivaci 24 hodin je u každého vzorku (opět s výjimkou pozitivní kontroly) o něco vyšší nebo podobná. Pozitivní kontrola po měření průtokovým cytometrem dosahovala nejvyšších hodnot MFI a tyto se s přibývajícím časem kultivace zvyšovaly. V této linii bylo zaznamenáno snížení hodnoty MFI u všech tří časů kultivace i všech vzorků ovlivněných HE v porovnání s negativní kontrolou. Tento trend však byl nepatrný.



*Graf 9: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie U937 při použití markeru CD11b. Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence.*

### **Vliv suplementace HE na změnu MFI znaku CD11b v buněčné linii U937 po ozáření 2 Gy**

Při porovnání vlivu doby kultivace na ozářené buňky jsme zjistili, že u vzorku HE0,15 byla nejvyšší hodnota naměřena po 24 hodinách kultivace. U všech ostatních vzorků byla nejvyšší hodnota zaznamenána po kultivaci 72 hodin. Pozitivní kontrola zde stejně jako u neozářených buněk dosahovala jednoznačně nejvyšších hodnot. 24hodinový interval kultivace neměl na buňky v podstatě žádný efekt při hodnocení změny MFI. Při kultivaci 48 hodin bylo vidět snížení u HE ovlivněných buněk, nicméně tento posun se s přibývajícím koncentrací HE zvyšoval, až nakonec překonal i průměrnou hodnotu u negativní kontroly. U kultivace 72 hodin bylo toto snížení jednoznačné u všech vzorků ovlivněných třemi různými koncentracemi HE proti hodnotám naměřených u neovlivněných buněk.



*Graf 10: Hodnota imunofluorescence u buněčné linie U937 při použití markeru CD11b a ozářením gama zářením 2 Gy. Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka. Zkratky: NK = negativní kontrola, HE0,15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 0,15 mg/ml, HE1,5 vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 1,5 mg/ml, HE15 = vzorek s hovězím extraktem o koncentraci 15 mg/ml, PHA = phytohaemagglutinin, IF = imunofluorescence, OZ = ozářené vzorky.*

Při porovnání ozářených a neozářených buněk u této linie, je patrný efekt délky kultivace buněk. Zatímco při kultivaci 24 hodin byly naměřeny vyšší hodnoty pro ozářené buňky pouze u vzorků ovlivněných HE, při kultivaci 48 a 72 hodin už byly vyšší hodnoty naměřeny u všech ozářených buněk proti buňkám neozářeným.

## 5 Diskuze

Juvenil je alkohol-éterový extrakt z hovězí tkáně vyvinutý jako přírodní doplněk stravy, který pozitivně působí na imunitní systém a mohl by pomoci v nádorové terapii. Bylo zjištěno, že Juvenil působí především na orgánové úrovni a tím ovlivňuje celý organismus. Juvenil má pozitivní účinek na mikrobiotu střev (Kubelkova a Macela 2020), snižuje životaschopnost lidské nádorové plicní buněčné linie (Duskova et al. 2019), zvyšuje imunitu u dětí vystaveným znečištěnému ovzduší (Svozil et al. 2020) a nemá žádné vedlejší škodlivé nebo toxické účinky na organismus. Účinek na mikrobiotu střev by mohl být základním mechanismem sekundárního pozitivního ovlivnění imunitního systému Juvenilem. Podobného pozitivního účinku dosáhla i Nova et al. (2007), která zkoumala vliv probiotik na lidský organismus v různých fázích lidského života. HE pravděpodobně nepůsobí přímo na jednotlivé funkční systémy, jako je imunitní systém, neurohormonální systém nebo zažívací systém, ale působí zprostředkovaně přes modulaci střevních mikrobiot polysystémově. Juvenil obsahuje široké spektrum látek. Mezi nimi například aminokyseliny, peptidy a oligopeptidy, vitamíny, minerály, malé množství fosfolipidů a nukleotidy. Všechny tyto molekuly jsou samy o sobě prospěšné pro lidský organismus. Zdá se, že velmi důležitou složkou Juvenilu jsou nukleotidy, které ovlivňují vývoj, prokrvení, tloušťku stěny střev a opravu celého gastrointestinálního traktu (Uauy et al. 1994), hromadění lipidů v játrech (Carver 1994), podporují vývoj a růst v postnatálním období (Šíma 2008) a jsou významnou složkou mateřského mléka (de Vrese a Schrezenmeir 2008).

Juvenil má prokazatelně pozitivní výsledky na orgánové úrovni, a proto jsem se zaměřil na jeho vliv v rámci buněk přirozené i specifické imunity. Použil jsem proto tři lidské buněčné linie: Ramos (B-lymfocyty), Jurkat (T-lymfocyty) a U937 (makrofágy).

Buněčná linie Ramos posloužila pro nastavení celého pokusu a vzhledem k nejednoznačné metodice a k malému počtu využitelných dat nebyla do analýzy zahrnuta.

Z analýz vyplývá, že signifikantní ovlivnění nebylo vidět, nicméně výsledky ukazují, že metodika fungovala dobře, buňky neumíraly a Juvenil má na buňky účinek. Z výsledků byly vidět určité trendy.

U buněčné linie Jurkat dosahovaly vzorky nejvyšších hodnot při kultivaci 48 hodin. Výjimku tvoří vzorky ozářené 2 Gy a měřené na změnu znaku CD69. U této jediné podkategorie docházelo se stoupající dobou kultivace k poklesu hodnoty MFI. Nejvyšších hodnot MFI zde dosahoval interval 24 hodin, nicméně jak je v grafech znázorněno, u této

doby kultivace byly nejvyšší směrodatné odchylky. U několika dalších vzorků byly naměřeny nejvyšší hodnoty v jiné době kultivace, nicméně vždy to bylo pouze u jednotlivých vzorků ne v rámci celé kategorie a vždy to bylo o zanedbatelný rozdíl oproti MFI při kultivaci 48 hodin. Z toho vyplývá, že pro expresi aktivačních markerů je u buněčné linie Jurkat nejvhodnější kultivace 48 hodin. Interval kultivace 24 hodin není pro buňky dostačující. Při analýze dat vycházely u této doby kultivace jednoznačně nejvyšší směrodatné odchylky. To by mohlo být způsobené nedostatečným množstvím buněk ve vzorku. Při analýze na průtokovém cytometru jsem totiž pozoroval nejmenší počet buněk při této době kultivace. To ukazuje na to, že buňky potřebují delší čas pro namnožení.

Při měření MFI znaku CD25 u této buněčné linie byl trend v posunu MFI jednoznačně pozorován pouze u vzorků ovlivněných HE, kultivovaných 48 hodin a ozářených 2 Gy. U této kategorie byly naměřeny vyšší hodnoty MFI u HE vzorků oproti negativní kontrole. Navýšení oproti negativní kontrole nebylo nijak výrazné, pouze u vzorku HE1,5 je pozorována o něco vyšší exprese. To by mohlo ukazovat na to, že HE působí protektivně při koncentraci 1,5 mg/ml a za velmi specifických podmínek.

Při měření MFI znaku CD69 se trend jeví ještě jednoznačnější. U všech neozářených buněk v této kategorii při všech dobách kultivace byly naměřeny nižší hodnoty MFI u vzorků doplněných o HE oproti negativní kontrole. To by mohlo ukazovat na to, že HE má spíše inhibiční účinek než stimulační. U ozářených buněk je stejný trend vidět také, nicméně je omezen pouze na interval kultivace 48 hodin. To by mohlo ukazovat na sníženou aktivitu buněk při použití HE po kultivaci 48 hodin.

Při porovnání ozářených a neozářených Jurkat vykazovaly ozářené buňky vyšší hodnoty MFI obou měřených znaků než buňky neozářené. Stejných výsledků dosáhl i Voos et al. (2018), který porovnával expresi CD25 u Jurkat buněk s lymfocyty a zjistil, že IZ způsobuje zvýšenou expresi CD25 u Jurkat buněk. Jedinou výjimku tvoří 48hodinový interval kultivace u znaku CD69, u kterého všechny ozářené vzorky dosahovaly nižších hodnot než jejich neozářené varianty. Tuto anomálii bych připisoval velkým odchylkám měření. Zvýšená exprese CD69 u ozářených Jurkat buněk je v souladu s výsledky (Mori 2011). Ten testoval expresi markeru CD69 u Jurkat buněk po napadení bakterií *Helicobacter pylori*, která je zodpovědná za chronickou gastritidu a karcinom žaludku. V mém experimentu sice žádné bakterie použity nebyly, ale stresový faktor byl u buněk reprezentován gama zářením 2 Gy a v obou případech došlo ke zvýšené expresi povrchového markeru CD69.

Co se buněčné linie U937 týká, tak z hlediska časové kultivace se nedá mluvit o jednoznačné době kultivace, při které by byly naměřeny nejvyšší hodnoty MFI. Vždy záleží na sledovaném znaku. Při měření znaku CD206 byly naměřeny nejvyšší hodnoty MFI u 24hodinového intervalu kultivace, kde ale byly opět vysoké směrodatné odchylky. U znaku CD86 byly výsledky ohledně časového intervalu značně nejednoznačné. Jednoznačné byly pouze hodnoty pro 24hodinový interval kultivace, kde oproti předchozímu znaku byly naměřeny nejnižší hodnoty. Při měření znaku CD11b byly u neozářených buněk naměřeny o něco vyšší hodnoty MFI u 24hodinového intervalu než u zbylých dvou intervalů kultivace, nicméně u jejich ozářené varianty už byly nejvyšší hodnoty naměřeny po kultivaci 72 hodin (výjimku tvoří vzorek HE0,15, který po ozáření vykazoval nejvyšší hodnoty u kultivace 24 hodin).

Posun v hodnotách MFI znaku CD206 u vzorků s HE oproti negativní kontrole nebyl jednoznačný ani u ozářených ani u neozářených buněk. Překvapující je, že u tohoto znaku nefungovala pozitivní kontrola, jelikož u ní byly naměřeny nižší hodnoty MFI než u ostatních vzorků. Vypadá to tedy tak, že aktivační znak není po použití PHA exprimován.

Při měření MFI znaků CD86 a CD11b byla vidět jistá symetrie v posunu hodnot MFI. Tento trend v posunu však byl rozdílný u ozářených a u neozářených buněk. Zatímco u neozářených buněk došlo ke snížení hodnoty MFI u všech časových intervalů (jedinou výjimku tvoří vzorek HE15, kde hodnota MFI znaku CD86 u 48hodinového intervalu překračuje hodnotu negativní kontroly), u ozářených buněk byly naměřeny nižší hodnoty MFI pouze u 72hodinového intervalu, zbylé dva intervaly zůstaly oproti negativní kontrole v podstatě beze změny. Zde by se dalo hovořit o inhibičním efektu použití HE.

Při porovnání ozářených a neozářených buněk v této buněčné linii vykazovaly ozářené buňky obecně vyšší hodnoty MFI oproti neozářeným variantám ve všech časových intervalech. Zajímavá situace ale nastala u znaku CD86, kde po kultivaci 72 hodin u vzorků PMA, HE15 a HE1,5 byly naměřeny identické hodnoty jak pro ozářené, tak pro neozářené buňky. Zajímavostí je také porovnání ozářených a neozářených buněk u znaku CD11b. zde při kultivaci 24 hodin byly naměřeny vyšší hodnoty MFI pouze u vzorků ovlivněných HE, nicméně u obou kontrol tyto rozdíly byly malé. Trend vyšších hodnot MFI u ozářených buněk, než u buněk neozářených zůstal u zbylých dvou kultivací zachován.

## Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo vyhodnotit změny v expresi vybraných aktivačních znaků po 24, 48 a 72 hodinách kultivace u tří lidských buněčných liniích (Ramos, Jurkat, U937). K buňkám byl přidán hovězí extrakt ve třech koncentracích (15 mg/ml; 1,5 mg/ml a 0,15 mg/ml), kdy ani jedna z nich nevedla k prokazatelnému zvýšení aktivace buněk, ale ani nedošlo k negativnímu ovlivnění. Buňky byly též po přidání tohoto extraktu vystaveny ionizujícímu záření pro zjištění jeho možného radioprotektivního účinku, ale ani ten nebyl prokázán.

Z výsledků je tedy patrné, že přidání hovězího extraktu k buňkám nemělo vliv na jejich aktivaci ani viabilitu. A ačkoliv mezi jednotlivými skupinami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl, tak z jednotlivých trendů lze říct, že přidání extraktu vedlo:

- u buněčné linie Jurkat:
  - při měření znaku CD25 k:
    - zvýšení MFI u ozářených buněk a kultivovaných 48 hodin.
  - při měření znaku CD69 k:
    - snížení MFI u neozářených buněk.
    - snížení MFI u ozářených buněk a kultivovaných 48 hodin.
- u buněčné linie U937:
  - při měření znaku CD86 k:
    - snížení MFI u neozářených buněk.
    - snížení MFI u ozářených buněk a kultivovaných 72 hodin.
  - při měření znaku CD11b k:
    - snížení MFI u neozářených buněk.
    - snížení MFI u ozářených buněk a kultivovaných 72 hodin.

Z důvodu vysoké variability dat nebyla buněčná linie Ramos do analýz zahrnuta.

V rámci dalšího výzkumu působení přípravků na bázi hovězího extraktu by bylo vhodné doplnit dosavadní výsledky o souhrnné experimenty *in vivo*, jelikož se ukazuje, že pro prokázání jejich pozitivních účinků na organismus je potřeba komplexních metabolických drah a souhrnu buněčných systémů jednotlivých funkčních celků organismu.

## Seznam použité literatury

ABRAHAM, Robert T. a Arthur WEISS, 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology* [online]. **4**(4), 301–308. ISSN 1474-1733, 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri1330

ACEHAN, Devrim, Xuejun JIANG, David Gene MORGAN, John E HEUSER, Xiaodong WANG a Christopher W AKEY, 2002. Three-Dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation. *Molecular Cell* [online]. **9**(2), 423–432. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(02)00442-2

ALLARAKHA, Shaziya, 2021. What Are the 3 Functions of the Nucleus? Metabolism & Weight Loss. *MedicineNet* [online] [vid. 2022-04-28]. Dostupné z: [https://www.medicinenet.com/what\\_are\\_the\\_3\\_functions\\_of\\_the\\_nucleus/article.htm](https://www.medicinenet.com/what_are_the_3_functions_of_the_nucleus/article.htm)

ANBARLOU, Azadeh, Amir ATASHI, Masoud SOLEIMANI, Mahshid AKHAVANRAHNAMA, Mahbobeh BOHLOLI a Majid MOSSAHEBI-MOHAMMADI, 2015. Differential characteristics of CD133+ and CD133– Jurkat cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* [online]. **51**(6), 556–561. ISSN 1071-2690, 1543-706X. Dostupné z: doi:10.1007/s11626-015-9869-z

ATCC, 2022. *U-937 / ATCC* [online] [vid. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/crl-1593.2>

AXELSSON, Susanne, Anders MAGNUSON, Anna LANGE, Aseel ALSHAMARI, Elisabeth Hultgren HÖRNQUIST a Olof HULTGREN, 2020. A combination of the activation marker CD86 and the immune checkpoint marker B and T lymphocyte attenuator (BTLA) indicates a putative permissive activation state of B cell subtypes in healthy blood donors independent of age and sex. *BMC Immunology* [online]. **21**(1), 14. ISSN 1471-2172. Dostupné z: doi:10.1186/s12865-020-00343-2

AZZAM, Edouard I., Jean-Paul JAY-GERIN a Debkumar PAIN, 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters* [online]. **327**(1–2), 48–60. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2011.12.012

BAMOLA, V. Deepak, Arnab GHOSH, Raj Kishor KAPARDAR, Banwari LAL, Simrita CHEEMA, Priyangshu SARMA a Rama CHAUDHRY, 2017. Gut microbial diversity in health and disease: experience of healthy Indian subjects, and colon carcinoma and inflammatory bowel disease patients. *Microbial Ecology in Health and Disease* [online]. **28**(1), 1322447. ISSN 1651-2235. Dostupné z: doi:10.1080/16512235.2017.1322447

BARFORD, David, 2011. Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3605–3624. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2011.0069

BARTEK, Jiri, Claudia LUKAS a Jiri LUKAS, 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **5**(10), 792–804. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm1493

BASTINGS, Jacco J.A.J., Hans M. VAN EIJK, Steven W. OLDE DAMINK a Sander S. RENSEN, 2019. d-amino Acids in Health and Disease: A Focus on Cancer. *Nutrients* [online]. **11**(9), 2205. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11092205



- BENDERITTER, Marc, L. VINCENT-GENOD, Jean-Pierre POUGET a P. VOISIN, 2003. The Cell Membrane as a Biosensor of Oxidative Stress Induced by Radiation Exposure: A Multiparameter Investigation. *Radiation Research* [online]. **159**(4), 471–483. ISSN 0033-7587, 1938-5404. Dostupné z: doi:10.1667/0033-7587(2003)159[0471:TCMAAB]2.0.CO;2
- BERNHARD, Eric J., Amit MAITY, Ruth J. MUSCHEL a W. Gillies MCKENNA, 1995. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression: A review. *Radiation and Environmental Biophysics* [online]. **34**(2), 79–83. ISSN 0301-634X, 1432-2099. Dostupné z: doi:10.1007/BF01275210
- BETTERS, Dawn M., 2015. Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* [online]. **6**(5) [vid. 2022-03-29]. ISSN 21500878. Dostupné z: doi:10.6004/jadpro.2015.6.5.4
- BIOLEGEND, 2018. *PE anti-human CD11b Antibody CD11b, LM2* [online] [vid. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.biolegend.com/en-us/products/pe-anti-human-cd11b-antibody-16303?GroupID=BLG10092>
- BIOLEGEND, 2021. *APC anti-human CD25 Antibody anti-CD25 - BC96* [online] [vid. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.biolegend.com/en-us/products/apc-anti-human-cd25-antibody-614?GroupID=BLG1983>
- BMEDIC ONLINE, 2022. *Buněčný cyklus a mitóza* [online]. [vid. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://bmedic-online.cz/lekce/mitoza/>
- BRATTON, Donna L., Valerie A. FADOK, Donald A. RICHTER, Jenai M. KAILEY, Lindsay A. GUTHRIE a Peter M. HENSON, 1997. Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(42), 26159–26165. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.42.26159
- BREIMER, Lh, 1988. Ionizing radiation-induced mutagenesis. *British Journal of Cancer* [online]. **57**(1), 6–18. ISSN 0007-0920, 1532-1827. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.1988.2
- BRITANNICA, The Editors of Encyclopaedia, 2019. cytoplasm | Definition & Function | Britannica. *Britannica* [online] [vid. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/cytoplasm>
- BROWN, Michael a Carl WITTWER, 2000. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* [online]. **46**(8), 1221–1229. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/46.8.1221
- CARVER, Jane D., 1994. Dietary Nucleotides: Cellular Immune, Intestinal and Hepatic System Effects. *The Journal of Nutrition* [online]. **124**(suppl\_1), 144S-148S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/124.suppl\_1.144S
- CARVER, Jane D, 2018. Dietary Nucleotides: Cellular Immune, Intestinal and Hepatic System Effects1»2. 5.
- CIBRIÁN, Danay a Francisco SÁNCHEZ-MADRID, 2017. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European Journal of Immunology* [online]. **47**(6), 946–953. ISSN 00142980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201646837

COLLINS, Kathleen, Tyler JACKS a Nikola P. PAVLETICH, 1997. The Cell Cycle and Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **94**(7), 2776–2778. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/PNAS.94.7.2776

COOPER, Geoffrey M., 2000. Peroxisomes. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* [online]. [vid. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9930/>

CROSS, Frederick R., Nicolas E. BUCHLER a Jan M. SKOTHEIM, 2011. Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3532–3544. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2011.0078

DANIAL, Nika N a Stanley J KORSMEYER, 2004. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* [online]. **116**(2), 205–219. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(04)00046-7

DARLEY-USMAR, Victor M., Neil HOGG, Vanessa J. O'LEARY, Michael T. WILSON a Salvador MONCADA, 1992. The Simultaneous Generation of Superoxide and Nitric Oxide Can Initiate Lipid Peroxidation in Human Low Density Lipoprotein. *Free Radical Research Communications* [online]. **17**(1), 9–20. ISSN 8755-0199. Dostupné z: doi:10.3109/10715769209061085

DE VRESE, Michael a Juergen SCHREZENMEIR, 2008. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. In: Ulf STAHL, Ute E. B. DONALIES a Elke NEVOIGT, ed. *Food Biotechnology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, s. 1–66 [vid. 2022-05-09]. ISBN 978-3-540-70535-2. Dostupné z: doi:10.1007/10\_2008\_097

DODD, Dylan, Matthew H. SPITZER, William VAN TREUREN, Bryan D. MERRILL, Andrew J. HRYCKOWIAN, Steven K. HIGGINBOTTOM, Anthony LE, Tina M. COWAN, Garry P. NOLAN, Michael A. FISCHBACH a Justin L. SONNENBURG, 2017. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature* [online]. **551**(7682), 648–652. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature24661

DOMINGO-SANANES, Maria Rosa, Orsolya KAPUY, Tim HUNT a Bela NOVAK, 2011. Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3584–3594. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2011.0087

DU, Changbin, Zhen GAO, Venkatasubbaiah A. VENKATESHA, Amanda L. KALEN, Leena CHAUDHURI, Douglas R. SPITZ, Joseph J. CULLEN, Larry W. OBERLEY a Prabhat C GOSWAMI, 2009. Mitochondrial ROS and radiation induced transformation in mouse embryonic fibroblasts. *Cancer Biology & Therapy* [online]. **8**(20), 1962–1971. ISSN 1538-4047, 1555-8576. Dostupné z: doi:10.4161/cbt.8.20.9648

DUDDY, Martin E., Andrea ALTER a Amit BAR-OR, 2004. Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation? *The Journal of Immunology* [online]. **172**(6), 3422–3427. ISSN 0022-1767, 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.172.6.3422

DUNPHY, William G., Leonardo BRIZUELA, David BEACH a John NEWPORT, 1988. The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*

[online]. **54**(3), 423–431. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(88)90205-X

DUSKOVA, Klara, Lucie CECHAKOVA, Lenka PLZAKOVA, Zuzana SINKOROVA a Klara KUBELKOVA, 2019. Natural immune booster imuregen significantly affects the proliferation of tumor cells [online]. (88(3)), 106–114. ISSN 2571-113X. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2019.007

ELMORE, Susan, 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. **35**(4), 495–516. ISSN 0192-6233, 1533-1601. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337

FAN, Zusen, Paul J. BERESFORD, David Y. OH, Dong ZHANG a Judy LIEBERMAN, 2003. Tumor Suppressor NM23-H1 Is a Granzyme A-Activated DNase during CTL-Mediated Apoptosis, and the Nucleosome Assembly Protein SET Is Its Inhibitor. *Cell* [online]. **112**(5), 659–672. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(03)00150-8

FERNÁNDEZ-RIEJOS, Patricia, R GOBERNA a Victor SÁNCHEZ-MARGALET, 2008. Leptin promotes cell survival and activates Jurkat T lymphocytes by stimulation of mitogen-activated protein kinase. *Clinical and Experimental Immunology* [online]. **151**(3), 505–518. ISSN 0009-9104, 1365-2249. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03563.x

FOREVER HEALTHY PRODUCTS, 2022. *Forever Healthy, LLC*. [online] [vid. 2022-05-24]. Dostupné z: <https://foreverhealthyproducts.com/>

GIOIA, Louis, Azeem SIDDIQUE, Steven R. HEAD, Daniel R. SALOMON a Andrew I. SU, 2018. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics* [online]. **19**(1), 334. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-018-4718-6

GIULIANI, Anna Lisa, Alba Clara SARTI a Francesco DI VIRGILIO, 2019. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunology Letters* [online]. **205**, 16–24. ISSN 01652478. Dostupné z: doi:10.1016/j.imlet.2018.11.006

GORBUNOV, Nikolai V., Katherine L. POGUE-GEILE, Michael W. EPPERLY, William L. BIGBEE, Romesh DRAVIAM, Billy W. DAY, Niel WALD, Simon C. WATKINS a Joel S. GREENBERGER, 2000. Activation of the Nitric Oxide Synthase 2 Pathway in the Response of Bone Marrow Stromal Cells to High Doses of Ionizing Radiation. *Radiation Research* [online]. **154**(1), 73–86. ISSN 0033-7587, 1938-5404. Dostupné z: doi:10.1667/0033-7587(2000)154[0073:AOTNOS]2.0.CO;2

GREEN, Douglas R. a John C. REED, 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* [online]. **281**(5381), 1309–1312. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.281.5381.1309

HACOCK, Ronald a Teni BOULIKAS, 1982. Functional Organization in the Nucleus. In: *International Review of Cytology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 165–214 [vid. 2022-04-28]. ISBN 978-0-12-364479-4. Dostupné z: doi:10.1016/S0074-7696(08)61674-5

HALL, Eric J. a James G. KEREIAKES, 2001. 69 - Effects of Ionizing Radiation on Cells. In: Nicholas SPERELAKIS, ed. *Cell Physiology Source Book (Third Edition)* [online]. San Diego: Academic Press, s. 1185–1201. ISBN 978-0-12-656976-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012656976-6/50161-X

- HANNUN, Yusuf A. a Lina M. OBEID, 2018. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **19**(3), 175–191. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm.2017.107
- HARBOUR, J. William a Douglas C. DEAN, 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & Development* [online]. **14**(19), 2393–2409. ISSN 0890-9369, 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.813200
- HOWARD, Alma a S.R. PELC, 1986. Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* [online]. **49**(2), 207–218. ISSN 0020-7616. Dostupné z: doi:10.1080/09553008514552501
- HUGHES, Jessica R, Vladimir A LEVCHENKO, Stephen J BLANKSBY, Todd W MITCHELL, Alan WILLIAMS a Roger JW TRUSCOTT, 2015. No turnover in lens lipids for the entire human lifespan. *eLife* [online]. **4**, e06003. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.06003
- HUNT, Tim, Kim NASMYTH a Béla NOVÁK, 2011. The cell cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3494–3497. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2011.0274
- CHASSAING, Benoit, Omry KOREN, Julia K. GOODRICH, Angela C. POOLE, Shanthi SRINIVASAN, Ruth E. LEY a Andrew T. GEWIRTZ, 2015. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* [online]. **519**(7541), 92–96. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature14232
- CHOI, Kyung-Mi, Chang-Mo KANG, Eun CHO, Seong KANG, Seung LEE a Hong-Duck UM, 2007. Ionizing radiation-induced micronucleus formation is mediated by reactive oxygen species that are produced in a manner dependent on mitochondria, Nox1, and JNK. *Oncology Reports* [online]. [vid. 2022-04-26]. ISSN 1021-335X, 1791-2431. Dostupné z: doi:10.3892/or.17.5.1183
- CHRISTINE HSIAO, Chia-Hung, Norikiyo UENO, Jian Q. SHAO, Kristin R. SCHROEDER, Kenneth C. MOORE, John E. DONELSON a Mary E. WILSON, 2011. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of Leishmania. *Microbes and Infection* [online]. **13**(12–13), 1033–1044. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2011.05.014
- IGNEY, Frederik H. a Peter H. KRAMMER, 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* [online]. **2**(4), 277–288. ISSN 1474-175X, 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc776
- JAHAN-TIGH, Richard R., Caitriona RYAN, Gerlinde OBERMOSER a Kathryn SCHWARZENBERGER, 2012. Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **132**(10), 1–6. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2012.282
- JAROSZESKI, Mark J. a Gilbert RADCLIFF, 1999. Fundamentals of flow cytometry. *Molecular Biotechnology* [online]. **11**(1), 37–53. ISSN 1559-0305. Dostupné z: doi:10.1007/BF02789175
- JEMAL, Ahmedin, Rebecca SIEGEL, Elizabeth WARD, Yongping HAO, Jiaquan XU a Michael J THUN, 2009. Cancer Statistics, 2009. *CA CANCER J CLIN* [online]. **59**(4), 225–49. Dostupné z: doi:10.3322/caac.20006

JONES, Leigh A., Duane P. HARLAND, B.B. JARROLD, John E. CONNOLLY a M.G. DAVIS, 2018. The walking dead: sequential nuclear and organelle destruction during hair development. *British Journal of Dermatology* [online]. **178**(6), e440–e440. ISSN 00070963. Dostupné z: doi:10.1111/bjd.16748

KANG, Min H. a C. Patrick REYNOLDS, 2009. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* [online]. **15**(4), 1126–1132. ISSN 1078-0432, 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0144

KARL, J. Philip, Adrienne M. HATCH, Steven M. ARCIDIACONO, Sarah C. PEARCE, Ida G. PANTOJA-FELICIANO, Laurel A. DOHERTY a Jason W. SOARES, 2018. Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9**, 2013. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.02013

KERGONOU, Jean-François, Monique BRAQUET a Guy ROCQUET, 1981. Influence of Whole-Body  $\gamma$  Irradiation upon Rat Liver Mitochondrial Fractions. *Radiation Research* [online]. **88**(2), 377. ISSN 00337587. Dostupné z: doi:10.2307/3575669

KHONG, Pek-Lan, Hans RINGERTZ, V. DONOGHUE, Donald FRUSH, M. Madan REHANI, K. APPELGATE a R. SANCHEZ, 2013. ICRP Publication 121: Radiological Protection in Paediatric Diagnostic and Interventional Radiology. *Annals of the ICRP* [online]. **42**(2), 1–63. ISSN 0146-6453, 1872-969X. Dostupné z: doi:10.1016/j.icrp.2012.10.001

KISCHKEL, F. C., S. HELLBARDT, I. BEHRMANN, M. GERMER, M. PAWLITA, P. H. KRAMMER a M. E. PETER, 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal* [online]. **14**(22), 5579–5588. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x

KLONISCH, Thomas, Emilia WIECHEC, Sabine HOMBACH-KLONISCH, Sudharsana R. ANDE, Sebastian WESSELBORG, Klaus SCHULZE-OSTHOFF a Marek LOS, 2008. Cancer stem cell markers in common cancers – therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine* [online]. **14**(10), 450–460. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2008.08.003

KROCOVA, Zuzana, Anetta HÄRTLOVA, Dagmar SOUCKOVA, Lucie ZIVNA, Michal KROCA, Emil RUDOLF, Ales MACELA a Jiri STULIK, 2008. Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Microbial Pathogenesis* [online]. **45**(2), 79–85. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2008.01.010

KUBELKOVA, Klara, Martin HUBALEK, Pavel REHULKA, Helena REHULKOVA, David FRIEDECKY, Jitka ZAKOVA a Ales MACELA, 2021. Molecular characterization of alcohol-ether extract from bovine tissue. *Military Medical Science Letters* [online]. **90**(3), 120–136. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2021.012

KUBELKOVA, Klara a Ales MACELA, 2019. A short history of imuregen - an original tissue extract. *Military Medical Science Letters* [online]. **88**(3), 115–120. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2019.008

KUBELKOVA, Klara a Ales MACELA, 2020. Microbiota-gut-brain signaling: a minireview. *Military Medical Science Letters* [online]. **89**(1), 41–51. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2020.002

- KUBELKOVA, Klara, Ivan RYCHLIK, Magdalena CRHANOVA, Daniela KARASOVA, Dasa SLIZOVA, Jitka ZAKOVA, Lenka LUKSIKOVA a Ales MACELA, 2020. Gut microbiota alterations by nutritional supplement imuregen. *Military Medical Science Letters* [online]. (89), 1–11. ISSN 0372-7025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2020.008
- LAJTHA, L. G., R. OLIVER a F. ELLIS, 1954. Incorporation of 32P and Adenine 14C into DNA by Human Bone Marrow Cells In Vitro. *British Journal of Cancer* [online]. **8**(2), 367–379. ISSN 0007-0920, 1532-1827. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.1954.38
- LANGERAK, Petra a Paul RUSSELL, 2011. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3562–3571. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2011.0070
- LEE, Yongchan a Michael OVERHOLTZER, 2019. After-Death Functions of Cell Death. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. **92**(4), 687–694. ISSN 1551-4056.
- LEROUX-ROELS, Geert, Arnaud MARCHANT, Jack LEVY, Pierre VAN DAMME, Tino F. SCHWARZ, Yves HORSMANS, Wolfgang JILG, Peter G. KREMSNER, Edwige HAELTERMAN, Frédéric CLÉMENT, Julian J. GABOR, Meral ESEN, Annick HENS, Isabelle CARLETTI, Laurence FISSETTE, Fernanda TAVARES DA SILVA, Wivine BURNY, Michel JANSSENS, Philippe MORIS, Arnaud M. DIDIERLAURENT, Robbert VAN DER MOST, Nathalie GARÇON, Pascale VAN BELLE a Marcelle VAN MECHELEN, 2016. Impact of adjuvants on CD4+ T cell and B cell responses to a protein antigen vaccine: Results from a phase II, randomized, multicenter trial. *Clinical Immunology* [online]. **169**, 16–27. ISSN 15216616. Dostupné z: doi:10.1016/j.clim.2016.05.007
- LEY, Ruth E., Peter J. TURNBAUGH, Samuel KLEIN a Jeffrey I. GORDON, 2006. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* [online]. **444**(7122), 1022–1023. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/4441022a
- LI, Larry, 2016. Mitosis - Definition, Stages, Function and Purpose. *Biology Dictionary* [online]. [vid. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://biologydictionary.net/mitosis/>
- LI, Qinrui, Ying HAN, Angel Belle C. DY a Randi J. HAGERMAN, 2017. The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. **11**, 120. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2017.00120
- LUMEN, 2022. *Mutations / Microbiology* [online] [vid. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mutations/>
- MA, Shumei, Boyu KONG, Bing LIU a Xiaodong LIU, 2013. Biological effects of low-dose radiation from computed tomography scanning. *International Journal of Radiation Biology* [online]. **89**(5), 326–333. ISSN 0955-3002, 1362-3095. Dostupné z: doi:10.3109/09553002.2013.756595
- MACEY, Marion G., 2007. *Flow Cytometry: Principles and Applications* [online]. Totowa, NJ, UNITED STATES: Humana Press [vid. 2022-03-19]. ISBN 978-1-59745-451-3. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/pqopenlayer/detail.action?docID=371832>
- MAGEE, Jeffrey A., Elena PISKOUNOVA a Sean J. MORRISON, 2012. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell* [online]. **21**(3), 283–296. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2012.03.003

- MAHONEY, Brent P., Natarajan RAGHUNAND, Brenda BAGGETT a Robert J. GILLIES, 2003. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. *Biochemical Pharmacology* [online]. **66**(7), 1207–1218. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-2952(03)00467-2
- MATYÁŠOVÁ, Simona, 2011. *Změny v expresi genů B buněčné linie Ramos RA-1 po infekci Francisella tularensis*. Praha. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.
- MCDONALD, J. Tyson, Kwanghee KIM, Andrew J. NORRIS, Erina VLASHI, Tiffany M. PHILLIPS, Chann LAGADEC, Lorenza DELLA DONNA, Josephine RATIKAN, Heather SZELAG, Lynn HLATKY a William H. MCBRIDE, 2010. Ionizing Radiation Activates the Nrf2 Antioxidant Response. *Cancer Research* [online]. **70**(21), 8886–8895. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0171
- MENDOZA-CORONEL, E. a Mauricio CASTAÑÓN-ARREOLA, 2016. Comparative evaluation of *in vitro* human macrophage models for mycobacterial infection study. *Pathogens and Disease* [online]. **74**(6), ftw052. ISSN 2049-632X, 2049-632X. Dostupné z: doi:10.1093/femspd/ftw052
- MENON, A., M. L. SHROYER, Jennifer L. WAMPLER, C. B. CHAWAN a Arun K. BHUNIA, 2003. In vitro study of Listeria monocytogenes infection to murine primary and human transformed B cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* [online]. **26**(3), 157–74. ISSN 0147-9571. Dostupné z: doi:10.1016/S0147-9571(02)00039-5
- MINN, Andy J., C. M. RUDIN, L. H. BOISE a C. B. THOMPSON, 1995. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* [online]. **86**(5), 1903–1910. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V86.5.1903.bloodjournal8651903
- MORGAN, William F. a Marianne B. SOWA, 2005. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **102**(40), 14127–14128. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0507119102
- MORI, Naoki, 2011. Induction of CD69 expression by *cag* PAI-positive *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology* [online]. **17**(32), 3691. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v17.i32.3691
- MURRAY, A.W. a T. HUNT, 1993. *The Cell Cycle: An Introduction* [online]. B.m.: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-509529-6. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=4nmOovzIc0IC>
- MUSILOVÁ, Darja, 2009. Buněčný cyklus. *Galaktis* [online] [vid. 2022-05-24]. Dostupné z: <http://galaktis.cz/clanek/bunecny-cyklus/>
- NATH, Niharika, Mitali CHATTOPADHYAY, Liliya POSPISHIL, Lucyna Z. CIECIURA, Satindra GOSWAMI, Ravinder KODELA, Joseph E. SAAVEDRA, Larry K. KEEFER a Khosrow KASHFI, 2010. JS-K; a nitric oxide-releasing prodrug, modulates  $\beta$ -catenin/TCF signaling in leukemic Jurkat cells: Evidence of an S-nitrosylated mechanism. *Biochemical Pharmacology* [online]. **80**(11), 1641–1649. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2010.08.011
- NEUZIL, Jiri, Marina STANTIC, Renata ZOBALOVA, Jaromira CHLADOVA, Xiufang WANG, Lubomir PROCHAZKA, Lanfeng DONG, Ladislav ANDERA a Stephen J. RALPH, 2007. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: What's in the name? *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **355**(4), 855–859. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.159

NHGRI, National Human Genome Research Institute, 2022a. Endoplasmic Reticulum (Smooth). *Genome.gov* [online] [vid. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Endoplasmic-Reticulum-Smooth>

NHGRI, National Human Genome Research Institute, 2022b. Lysosome. *Genome.gov* [online] [vid. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Lysosome>

NIELSEN, Marlene Christina, Rasmus HVIDBJERG GANTZEL, Joan CLÀRIA, Jonel TREBICKA, Holger Jon MØLLER a Henning GRØNBÆK, 2020. Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Cells* [online]. **9**(5), 1175. ISSN 2073-4409. Dostupné z: [doi:10.3390/cells9051175](https://doi.org/10.3390/cells9051175)

NIGG, Erich A., 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **2**(1), 21–32. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Dostupné z: [doi:10.1038/35048096](https://doi.org/10.1038/35048096)

NOVA, Esther, Julia WÄRNBERG, Sonia GÓMEZ-MARTÍNEZ, Ligia E. DÍAZ, Javier ROMEO a Ascensión MARCOS, 2007. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *British Journal of Nutrition* [online]. **98**(S1), S90–S95. ISSN 0007-1145, 1475-2662. Dostupné z: [doi:10.1017/S0007114507832983](https://doi.org/10.1017/S0007114507832983)

O'CONNOR, Clare a Jill U. ADAMS, 2010. Essentials of Cell Biology. *Scitable by Nature Education* [online] [vid. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/>

O'FARRELL, Patrick H., 2011. Quiescence: early evolutionary origins and universality do not imply uniformity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3498–3507. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: [doi:10.1098/rstb.2011.0079](https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0079)

PAUWELS, Ernest K. J. a Michel BOURGUIGNON, 2011. Cancer induction caused by radiation due to computed tomography: a critical note. *Acta Radiologica* [online]. **52**(7), 767–773. ISSN 0284-1851, 1600-0455. Dostupné z: [doi:10.1258/ar.2011.100496](https://doi.org/10.1258/ar.2011.100496)

PICOT, Julien, Coralie L. GUERIN, Caroline LE VAN KIM a Chantal M. BOULANGER, 2012. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* [online]. **64**(2), 109–130. ISSN 0920-9069, 1573-0778. Dostupné z: [doi:10.1007/s10616-011-9415-0](https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0)

PINES, Jonathon a Iain HAGAN, 2011. The Renaissance or the cuckoo clock. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3625–3634. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: [doi:10.1098/rstb.2011.0080](https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0080)

PRASAD, Ankush, Michaela SEDLÁŘOVÁ, Anastasiia BALUKOVA, Alina OVSII, Marek RÁC, Michal KŘUPKA, Shigenobu KASAI a Pavel POSPÍŠIL, 2020. Reactive Oxygen Species Imaging in U937 Cells. *Frontiers in Physiology* [online]. **11**, 552569. ISSN 1664-042X. Dostupné z: [doi:10.3389/fphys.2020.552569](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.552569)

PUCK, Theodore T. a Jan STEFFEN, 1963. Life Cycle Analysis of Mammalian Cells: I. A Method for Localizing Metabolic Events within the Life Cycle, and Its Application to the Action of Colcemide and Sublethal Doses of X-Irradiation. *Biophysical Journal* [online]. **3**(5), 379–397. ISSN 0006-3495. Dostupné z: [doi:10.1016/S0006-3495\(63\)86828-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(63)86828-9)



PUERTA-GUARDO, Henry, Arturo RAYA-SANDINO, Lorenza GONZÁLEZ-MARISCAL, Victor H. ROSALES, José AYALA-DÁVILA, Bibiana CHÁVEZ-MUNGÍA, Daniel MARTÍNEZ-FONG, Fernando MEDINA, Juan E. LUDERT a Rosa María DEL ANGEL, 2013. The Cytokine Response of U937-Derived Macrophages Infected through Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Disrupts Cell Apical-Junction Complexes and Increases Vascular Permeability. *Journal of Virology* [online]. **87**(13), 7486–7501. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00085-13

RABINOWITZ, M. a H. SWIFT, 1970. Mitochondrial nucleic acids and their relation to the biogenesis of mitochondria. *Physiological Reviews* [online]. **50**(3), 376–427. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.1970.50.3.376

RAI, Nirendra K., Kamalakar TRIPATHI, Deborshi SHARMA a Vijay K. SHUKLA, 2005. Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* [online]. **4**(3), 138–144. ISSN 1534-7346, 1552-6941. Dostupné z: doi:10.1177/1534734605280018

RASHID, Mamun-Ur, Egijia ZAURA, Mark J. BUIJS, Bart J. F. KEIJSER, Wim CRIELAARD, Carl Erik NORD a Andrej WEINTRAUB, 2015. Determining the Long-term Effect of Antibiotic Administration on the Human Normal Intestinal Microbiota Using Culture and Pyrosequencing Methods. *Clinical Infectious Diseases* [online]. **60**(suppl\_2), S77–S84. ISSN 1537-6591, 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1093/cid/civ137

RAVICHANDRAN, Kodi S., 2003. “Recruitment Signals” from Apoptotic Cells: Invitation to a Quiet Meal. *Cell* [online]. **113**(7), 817–820. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(03)00471-9

READING, Richard, 2012. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Child: Care, Health and Development* [online]. **38**(6), 910–910. ISSN 03051862. Dostupné z: doi:10.1111/cch.12006\_2

REISZ, Julie A., Nidhi BANSAL, Jiang QIAN, Weiling ZHAO a Cristina M. FURDUI, 2014. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. **21**(2), 260–292. ISSN 1523-0864, 1557-7716. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2013.5489

RENEHAN, Andrew G., Catherine BOOTH a Christopher S. POTTEN, 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* [online]. **322**(7301), 1536–1538. ISSN 09598138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.322.7301.1536

REX, Elizabeth B., Suzie KIM, Jake WIENER, Navin L. RAO, Marcos E. MILLA a Daniel DISEPIO, 2015. Phenotypic Approaches to Identify Inhibitors of B Cell Activation. *SLAS Discovery* [online]. **20**(7), 876–886. ISSN 24725552. Dostupné z: doi:10.1177/1087057115585724

REYA, Tannishtha, Sean J. MORRISON, Michael F. CLARKE a Irving L. WEISSMAN, 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* [online]. **414**(6859), 105–111. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/35102167

RICHTER, J., P. SIMA, I. PFEIFER, V. KRÁL, D. JÍLEK, I. STIBOROVA, S. RICHTEROVÁ, J. PEŠKOVÁ, D. SLIZOVÁ a L. DOBIÁŠOVÁ, 2004. Protective and immunomodulative influence of supplementing DNA: comparing of clinical testing and experimental model. (NJ 6888-3), 1–61.

RICHTER, Josef, Ivana STIBOROVA, Vlastimil KRÁL, Vladimír SVOZIL, Vaclav VETVICKA a Lucie RAJNOHOVÁ DOBIÁŠOVÁ, 2017. Glucan Supplementation Regulates Secretory Immunity and Stress. *American Journal of Immunology*. 6.

ROGERS, Kara, 2021. Golgi apparatus. *Encyclopedia Britannica* [online] [vid. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Golgi-apparatus>

SARKAR, Amar, Soili M. LEHTO, Siobhán HARTY, Timothy G. DINAN, John F. CRYAN a Philip W.J. BURNET, 2016. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. *Trends in Neurosciences* [online]. **39**(11), 763–781. ISSN 01662236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2016.09.002

SHIOW, Lawrence R., David B. ROSEN, Naděžda BRDIČKOVÁ, Ying XU, Jinping AN, Lewis L. LANIER, Jason G. CYSTER a Mehrdad MATLOUBIAN, 2006. CD69 acts downstream of interferon- $\alpha/\beta$  to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* [online]. **440**(7083), 540–544. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature04606

SCHNEIDER, Ulrich, Hans-Ulrich SCHWENK a Georg BORNKAMM, 1977. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer* [online]. **19**(5), 621–626. ISSN 00207136, 10970215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.2910190505

SINGH, Ajit a Harwant SINGH, 1982. Time-scale and nature of radiation-biological damage: Approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* [online]. **39**, 69–107. ISSN 00796107. Dostupné z: doi:10.1016/0079-6107(83)90014-7

SUEZ, Jotham, Tal KOREM, David ZEEVI, Gili ZILBERMAN-SCHAPIRA, Christoph A. THAISS, Ori MAZA, David ISRAELI, Niv ZMORA, Shlomit GILAD, Adina WEINBERGER, Yael KUPERMAN, Alon HARMELIN, Ilana KOLODKIN-GAL, Hagit SHAPIRO, Zamir HALPERN, Eran SEGAL a Eran ELINAV, 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* [online]. **514**(7521), 181–186. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature13793

SUNDSTRÖM, Christer a Kenneth NILSSON, 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer* [online]. **17**(5), 565–577. ISSN 00207136, 10970215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.2910170504

SVOZIL, Vladimír, Josef RICHTER a Vaclav VETVICKA, 2020. High exposure to pollution requires nutritional improvements in children. (1(2)), 30–34.

ŠÍMA, Petr, 2008. VÝZNAM NUKLEOTIDŮ JAKO SLOŽKY VÝŽIVY PRO RŮST, REGENERACI A IMUNITU. *Interní medicína pro praxi*. (10(12)), 555–557. ISSN 1803-5256.

TANG, Ho Man a Ho Lam TANG, 2018. Anastasis: recovery from the brink of cell death. *Royal Society Open Science* [online]. **5**(9), 180442. ISSN 2054-5703. Dostupné z: doi:10.1098/rsos.180442

TENUZZO, B., M. DWIKAT a L. DINI, 2008. Static magnetic field selects undifferentiated myelomonocytes from low-glutamine concentration stimulated U937 cells. *Tissue and Cell* [online]. **40**(3), 177–184. ISSN 00408166. Dostupné z: doi:10.1016/j.tice.2007.11.005

- TESTIMONIALS REVIEW, 2019a. Complete Ingredients of IMUREGEN Nucleotide. *Testimony Reviews* [online] [vid. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://testimonials.review/complete-ingredients-of-imuregen-nucleotide/>
- TESTIMONIALS REVIEW, 2019b. History of Imuregen. *Testimony Reviews* [online] [vid. 2022-04-29]. Dostupné z: <https://testimonials.review/history-of-imuregen/>
- THOMPSON, Larry H., 2012. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. **751**(2), 158–246. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2012.06.002
- TRAPANI, Joseph A. a Mark J. SMYTH, 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* [online]. **2**(10), 735–747. ISSN 1474-1733, 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri911
- TRETIAKOVA, Irina, Dagmar BLAESIUS, Lucia MAXIA, Sebastian WESSELBORG, Klaus SCHULZE-OSTHOFF, Jindrich CINATL, Martin MICHAELIS a Oliver WERZ, 2008. Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis* [online]. **13**(1), 119–131. ISSN 1360-8185, 1573-675X. Dostupné z: doi:10.1007/s10495-007-0150-0
- UAUY, Ricardo, Richard QUAN a Angel GIL, 1994. Role of Nucleotides in Intestinal Development and Repair: Implications for Infant Nutrition. *The Journal of Nutrition* [online]. **124**(suppl\_8), 1436S-1441S. ISSN 0022-3166, 1541-6100. Dostupné z: doi:10.1093/jn/124.suppl\_8.1436S
- UHLMANN, Frank, Céline BOUCHOUX a Sandra LÓPEZ-AVILÉS, 2011. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3572–3583. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2011.0082
- URBAN, Tomáš, 2014. *Print page* [online] [vid. 2022-05-18]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=1479&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1479&typ=html)
- VAN WERVEN, Folkert J. a Angelika AMON, 2011. Regulation of entry into gametogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3521–3531. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2011.0081
- VARMA, Neelam a Shano NASEEM, 2011. Application of flow cytometry in pediatric hematology-oncology. *Pediatric Blood & Cancer* [online]. **57**(1), 18–29. ISSN 15455009. Dostupné z: doi:10.1002/pbc.22954
- VECTORSTOCK, 2022. Electromagnetic spectrum diagram vector image on VectorStock. *VectorStock* [online] [vid. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/electromagnetic-spectrum-diagram-vector-1571487>
- VÉGH, Vladimír a Tereza VÉGH, 2008. Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii. *Pediatric pro praxi*. (9(6)), 388–392. ISSN 12130494.
- VOOS, Patrick, Sebastian FUCK, Fabian WEIPERT, Laura BABEL, Dominique TANDL, Tobias MECKEL, Stephanie HEHLGANS, Claudia FOURNIER, Anna MORONI, Franz RÖDEL a Gerhard THIEL, 2018. Ionizing Radiation Induces Morphological Changes and

Immunological Modulation of Jurkat Cells. *Frontiers in Immunology* [online]. **9**, 922. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.00922

WAJANT, Harald, 2002. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science* [online]. **296**(5573), 1635–1636. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1071553

WANG, Gang, Shuo HUANG, Yuming WANG, Shuang CAI, Haitao YU, Hongbing LIU, Xiangfang ZENG, Guolong ZHANG a Shiyao QIAO, 2019. Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **76**(20), 3917–3937. ISSN 1420-682X, 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-019-03190-6

WARDMAN, Peter a Clemens VON SONNTAG, 1995. [3] Kinetic factors that control the fate of thyl radicals in cells. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 31–45 [vid. 2022-04-26]. ISBN 978-0-12-182152-4. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(95)51108-3

WATANABE, Kiyotada, Syu-Ichi KANNO, Ayako TOMIZAWA, Shin YOMOGIDA a Masaaki ISHIKAWA, 2012. Acacetin induces apoptosis in human T cell leukemia Jurkat cells via activation of a caspase cascade. *Oncology Reports* [online]. **27**(1), 204–209. ISSN 1791-2431. Dostupné z: doi:10.3892/or.2011.1498

WICHA, Max S., Suling LIU a Gabriela DONTU, 2006. Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Research* [online]. **66**(4), 1883–1890. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3153

WILLIAMS, Gareth H a Kai STOEBER, 2007. Cell cycle markers in clinical oncology. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. **19**(6), 672–679. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2007.10.005

WILLIAMS, Gareth H a Kai STOEBER, 2012. The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology* [online]. **226**(2), 352–364. ISSN 00223417. Dostupné z: doi:10.1002/path.3022

WU, Yaojiong a Philip Yuguang WU, 2009. CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns. *Stem Cells and Development* [online]. **18**(8), 1127–1134. ISSN 1547-3287, 1557-8534. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2008.0338

YAMAMORI, Tohru, Hironobu YASUI, Masayuki YAMAZUMI, Yusuke WADA, Yoshinari NAKAMURA, Hideo NAKAMURA a Osamu INANAMI, 2012. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **53**(2), 260–270. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033

YANAGIDA, Mitsuhiro, Nobuyasu IKAI, Mizuki SHIMANUKI a Kenichi SAJIKI, 2011. Nutrient limitations alter cell division control and chromosome segregation through growth-related kinases and phosphatases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **366**(1584), 3508–3520. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2011.0124

YIEMWATTANA, Ichaya, Jatuporn NGOENKAM, Pussadee PAENSUWAN, R KRIANGKRAI, B CHUENJITKUNTAWORN a Sutatip PONGCHAROEN, 2011. Essential role of the adaptor protein Nck1 in Jurkat T cell activation and function. *Clinical and Experimental Immunology* [online]. **167**(1), 99–107. ISSN 0009-9104, 1365-2249. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04494.x

ZEISS, Caroline J., 2003. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Veterinary Pathology* [online]. **40**(5), 481–495. ISSN 0300-9858, 1544-2217. Dostupné z: doi:10.1354/vp.40-5-481

ZETTERBERG, Anders a Olle LARSSON, 1985. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **82**(16), 5365–5369. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.82.16.5365